Nouveaux réactifs de chimie bio-orthogonale pour l'imagerie in vivo et la thérapie des cancers

Jason Beaufrez

▶ **To cite this version:**

Jason Beaufrez. Nouveaux réactifs de chimie bio-orthogonale pour l'imagerie in vivo et la thérapie des cancers. Chimie organique. Normandie Université; Erasmus universiteit (Rotterdam, Pays-Bas), 2022. Français. NNT : 2022NORMC260 . tel-04043259

HAL Id: tel-04043259

https://theses.hal.science/tel-04043259

Submitted on 23 Mar 2023

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.

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité CHIMIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

En cotutelle internationale avec Erasmus University Rotterdam , PAYS BAS

Nouveaux réactifs de chimie bio-orthogonale pour l'imagerie in vivo et la thérapie des cancers

Présentée et soutenue par
JASON BEAUFREZ

Thèse soutenue le 13/12/2022 devant le jury composé de		
MME SANDRINE LAMANDE LANGLE	Maître de conférences HDR, Université de Lorraine	Rapporteur du jury
M. JOHNNY VERCOUILLIE	Maître de conférences HDR, UNIVERSITE DE TOURS	Rapporteur du jury
M. BERTRAND KUHNAST	Directeur de recherche, CEA Paris-Saclay	Membre du jury
M. YANN SEIMBILLE	Professeur assistant, University medical center Rotterdam	Membre du jury
M. JACQUES ROUDEN	Professeur des universités, ENSICAEN	Président du jury

Thèse dirigée par CECILE PERRIO (Imagerie et Stratégies Thérapeutiques pour Cancers et Tissus Cerebraux)

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 508 NC Normande de Chimie

IST2 Imagerie & Strategies Therapeutiques pour les Cancers & Tissus Cerebraux

« Il est bien extraordinaire qu'elle ait échappé jusqu'ici à l'œil attentif des Physiciens & des Chimistes, et on doit en conclure que dans les sciences comme dans la morale il est difficile de vaincre les préjugés dont on a été originairement imbu, et de suivre une autre route que celle dans laquelle on est accoutumé de marcher. ».

Antoine-Laurent de Lavoisier (1743-1794)[1]

[1] [Découverte de la réaction de décomposition et de recombinaison de l'eau], M. Antoine-Laurent de Lavoisier, *Traité élémentaire de chimie*, Cuchet, Paris, M. DCC. LXXXIX, folio, 101.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier tous les membres du jury pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ces travaux. Je remercie Dr. Sandrine Langle et Dr. Johnny Vercouillie pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Dr. Bertrand Kuhnast et Pr. Jacques Rouden pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de faire partie de ce jury de thèse.

Je remercie sincèrement Mme. Cécile Perrio (ma directrice de thèse et chef de l'équipe LDM-TEP), ainsi que M. Yann Seimbille (mon co-directeur de thèse et chef de l'équipe de chimie radiopharmaceutique) pour m'avoir fait découvrir votre domaine passionnant de la radiochimie, et avoir encadré ses travaux de recherche. Merci pour vos corrections, votre temps, vos conseils, vos idées, votre motivation, votre soutien et votre confiance. Merci pour tout, sans vous cette thèse n'aurait jamais été possible !

Je remercie ensuite M. Benoît Haelewyn (directeur général du GIP Cyceron) de m'avoir accueilli au sein du GIP Cyceron. De même, je remercie M. Lamri Adoui (directeur de de l'université de Normandie), M. Pierre Denise (directeur de l'université de Caen), M. R.C.M.E Engels (Rector Magnificus de l'université d'Erasmus MC de Rotterdam) et M. J.P.T.M. van Leeuwen (directeur de la faculté de médecine d'Erasmus MC de Rotterdam) pour avoir accepté cette thèse et cette collaboration internationale franco-néerlandaise.

Je remercie après les écoles doctorales. Merci Mme Isabelle Dez (directrice de l'école doctorale EDNC508) et Frank van Vliet (directeur de l'école doctorale MolMed) pour m'avoir permis d'assister à toutes ces formations passionnantes ainsi que dans la partie administrative de cette thèse. Merci à Mme Sylviane Fournet pour son implication dans ces démarches administratives. Plus particulièrement, je remercie Mme. Sandrine Maviel [Direction de la Recherche et de l'Innovation (DRI)] pour la mise en place de la cotutelle internationale et son aide précieuse dans les démarches administratives entre les universités. Je remercie aussi Mme. Annet Bout-Tellegen pour son aide avec Hora Finata.

Je remercie également Mme Myriam Bernaudin (directrice de l'unité ISTCT à Cyceron) et M. G. Krestin (directeur du département de radiologie et de médecine nucléaire d'Erasmus MC) pour m'avoir accueilli au sein de leur unité.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe LDM-TEP (par ordre alphabétique) : Jérôme Delamare, Fabien Fillesoye, Raphaël Gillet, Fabienne Gourand, Stéphane Guillouet, Méziane Ibazizene, Alexis Lator, Sandrine Lehuan, Clémence Maingueneau, Mathilde Pauton, Cécile Perrio, Pauline Poutrel et Olivier Tirel. Merci pour votre accueil, votre aide et votre

soutien quotidien pendant ces deux ans et demi années passés ensemble. Plus personnellement, merci Fabien, Raphaël, Stéphane, Alexis, Sandrine et Clémence pour ces repas et les pauses que vous avez partagé avec moi. Merci Fabien pour les expérimentations biologiques, pour tes explications et ton soutien. Merci Jérôme pour tes explications sur le cyclotron et tes conseils avisés en radioprotection. Merci Stéphane pour ton aide avec les automates. Merci Méziane pour tes précieux conseils en HPLC. Merci Sandrine pour ton aide administratif, ton soutien, ta bonne humeur et toutes ces discussions. Merci Clémence pour m'avoir écouté parler de tétrazines toute la journée et ton soutien. Merci Olivier pour le cyclotron, toute la maintenance et tout le bricolage. Merci à Stéphane, Méziane et Fabienne pour votre confiance pour Empower 3. Merci à tous les autres membres de Cyceron. Plus particulièrement à Carole Loslier (Comptable) pour toutes ces commandes et ces annonces de colis. Merci à Jérôme Fraisse pour ton aide dans la gestion déchet. Merci à Audrey Bodet et Séverine Levillain pour nos discussions et votre soutien. Merci à Antoine Nourry et Geoffrey Vingtrois pour leur précieux dépannages informatiques. Merci à Laetitia Biree pour la camionnette. Merci aux doctorants biologistes de m'avoir fait partager votre passion. Merci à tous les autres membres de Cyceron pour votre travail.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe de chimie radiopharmaceutique (par ordre alphabétique) : Circe van der Heide, Dylan Chapeau, Eline Hoojiman, Erik De Blois, Erika Murce Silva, Evelien Spaan, Hanyue Ma, Marc Stroet, Mark Hoorens, Maryana Handula, Prisciana Paraiso, Sabine Nauta et Sofia Koustoulidou. Merci pour votre accueil, votre aide et votre soutien quotidien pendant cette année passée ensemble. Merci Dylan pour ton aide dans la maintenance du laboratoire. Merci Mark pour tes conseils aux laboratoires. Merci Erika et Priciana pour vos discussions et votre soutien. Je remercie aussi l'équipe de biologie pour votre confiance dans l'utilisation des peptides radiomarqués que nous préparions au quotidien. Merci Lilian van den Brink pour les expérimentations biologiques. Merci à tous les autres membres d'Eramsus MC pour votre travail.

Je remercie aussi M. Vincent Reboul pour avoir accepté d'être mon enseignant référent. Merci d'avoir été à l'écoute et de m'avoir rassuré.

Je remercie encore tous mes financeurs (CEA, CNRS, LabEx IRON, EUR XL-Chem, université de Caen et Eramsus MC). En particulier, Mme Audrey Gosseline Robine (Manager de projet EUR XL-Chem) pour l'aide financière à la mobilité internationale.

Je remercie aussi tout le corps enseignant de l'UFR Science et technique. Je remercie Olivier Marie, Guillaume Clet, Jaâfar El Fallah pour m'avoir fait confiance, et m'avoir confié des étudiants de première année pour les cours magistraux et les travaux dirigés de chimie structurel. Merci Anthony Ghanem (secrétariat) pour l'organisation des salles et du matériel. Également, un merci pour Emmanuel Pfund et Karine Thomas pour m'avoir fait confiance et m'avoir confié des étudiants de seconde année pour les travaux pratiques de chimie organique.

Je remercie aussi tous les membres de l'ENSICaen. Guillaume Morcel (magasinier de l'ENSICaen) pour les devis et la préparation des commandes de produits chimiques. Rémi Legay et Hussein Elsiblani pour leur aide dans les acquisitions RMN. Fabien Le Cavelier et Jarsale Karine pour les analyses HRMS et infrarouges. Merci aux doctorants responsables de la carboglace (Thomas, Ronan, Léo et Quentin) pour vos discussions lors de la collecte hebdomadaire.

Je remercie aussi mes amis. Merci à Lucile, à Laure, à Virginie, à Étienne, à Anthony, à Aurélien, à Yoan, à Charly et tous les autres qui m'ont soutenu, écouté, et réconforté durant cette période de thèse. Merci d'avoir supporté mes appels. Je vous adore.

Merci à tous les membres de ma famille et plus particulièrement mes parents pour leur amour et leurs soutiens inconditionnels. Je vous aime.

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué de près comme de loin à ce projet. Enfin, je vous remercie, vous, chers lecteurs qui aurez la patience, et l'envie d'en apprendre plus sur ce sujet passionnant au cours des quelques pages de ce manuscrit. Je vous souhaite une bonne lecture et que vous y trouvez la passion qui a porté ce projet.

Sommaire

REMERCIEMENTS **5**
SOMMAIRE **9**
LISTE DES ABRÉVIATIONS **11**
LISTE DES FIGURES **15**
LISTE DES SCHÉMAS **17**
LISTE DES TABLEAUX **21**
PRODUCTION SCIENTIFIQUE **23**
FORMATION, CONFÉRENCE ET ENSEIGNEMENT **25**
AVANT-PROPOS **29**
PRÉSENTATION GÉNÉRALE **31**
1 INTRODUCTION GÉNÉRALE **36**
A. LES RADIOISOTOPES POUR L'IMAGERIE ET LE THÉRANOSTIQUE 36
B. IMAGERIES TEMP ET TEP[5] 38
C. RADIOTHÉRAPIE VECTORISÉE 39
D. RADIOPHARMACEUTIQUES POUR LA MÉDECINE NUCLÉAIRE 41
E. RADIOCHIMIE DU FLUOR-18 41
F. MARQUAGE AVEC LES RADIOMÉTAUX 46
G. RADIOMARQUAGE DE BIOMÉDICAMENTS 47
H. CHIMIE « CLICK » APPLIQUÉE AUX MARQUAGES DE MACROMOLÉCULES 50
I. APPLICATION DE LA CHIMIE « CLICK » À LA STRATÉGIE DE PRÉ-CIBLAGE 53
J. RÉACTION IEDDA 55
K. SYNTHÈSE DES TÉTRAZINES 59
L. RÉACTION DE PINNER 60
M. PARTENAIRES RADIOFLUORÉS DE LA RÉACTION IEDDA 62
N. CRITÈRES POUR UN RÉACTIF TÉTRAZINIQUE RADIOACTIF D'IEDDA 63
O. TÉTRAZINES HYDROPHILES 65
P. PRÉSENTATION DU PROJET ET STRATÉGIE ENVISAGÉE 69
Q. RÉACTION D'OUVERTURE DU CYCLE SULTONE 70
R. RÉACTION D'OUVERTURE DES SULTONES APPLIQUÉE À LA CHIMIE ET RADIOCHIMIE DU FLUOR 75
S. ORGANISATION ET PLAN DES TRAVAUX 78
2 SYNTHÈSE DES TÉTRAZINESULTONES **81**
A. SYNTHÈSE DES SULTONES 81
B. SYNTHÈSE DES TÉTRAZINESULTONES 94
C. CONCLUSION GÉNÉRALE 133
3 DÉVELOPPEMENT DES SULFOTÉTRAZINES POUR L'IMAGERIE ET ÉVALUATION DE LA [^{18}F]FLUOROSULFOTÉTRAZINE [^{18}F]79 ..... **137**
A. SYNTHÈSE DE LA FLUOROSULFOTÉTRAZINE [^{18}F]79 138

B. RADIOSYNTHÈSE DE LA [^{18}F]FLUOROSULFOTÉTRAZINE [^{18}F]79 142
C. ÉVALUATION DE LA TÉTRAZINE RADIOACTIVE DANS SON MILIEU DE FORMULATION. 156
D. VALORISATION DES TÉTRAZINES SULTONES POUR LES AUTRES MODALITÉS D'IMAGERIE 161
E. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 166

4 DÉVELOPPEMENT ET RADIOMARQUAGE À L'INDIUM-111 ET AU LUTÉTIUM-177 D'ANALOGUES DU NEOBOMB1 171

A. NEOBOMB1 ET SON RÉCEPTEUR GRPR 171
B. SYNTHÈSE DE LA SÉQUENCE FQWAVGH-DMH4A 185
C. FONCTIONNALISATION DE LA SÉQUENCE PEPTIDIQUE FQ(TRT)W(BOC)AVGH(TRT) PAR PEG_N 191
D. APPLICATION IEDDA 232
E. RADIOCHIMIE DE L'INDIUM-111 (^{111}IN) ET DU LUTÉTIUM-177 (^{177}LU) 236
F. TESTS *IN VITRO* 243
G. CONCLUSION GÉNÉRALE 246

CONCLUSION GÉNÉRALE 249

PARTIE EXPÉRIMENTALE DU CHAPITRE 2 ET 3 253

A. SYNTHETIZED COMPOUND LIST 253
B. GENERAL METHODS 257
C. SYNTHESIS 261

PARTIE EXPÉRIMENTALE DU CHAPITRE 4 305

A. SYNTHESIZED COMPOUND LIST 305
B. GENERAL METHODS 313
C. SYNTHESIS 323

BIBLIOGRAPHIE 355

RÉSUMÉ 418

ABSTRACT 418

Liste des abréviations

Abbréviation française (anglaise)	Signification
%DA (%AD)	*dose initiale ajoutée*
%DI (%ID)	*dose initiale injectée*
[^{18}F]FACBC	*acide carboxylique anti-1-amino-3-[^{18}F]fluorocyclobutane*
[^{18}F]FDHT	*16beta-^{18}F-fluoro-5alpha-dihydrotestostérone*
[^{18}F]FES	*[^{18}F]fluoroestradiol*
2-Cl-Trt	*résine de chlorure de 2-chlorotrityle*
Ac	*acétyle*
Aca	*acide 6-aminohexanoïque*
ACN	*acétonitrile*
AIBN	*azobisisobutyronitrile*
APTS	*acide paratoluènesulfonique*
ARN$_m$ (RNA$_m$)	*acide ribonucléique messager*
AVC	*accidents vasculaires cérébraux*
BB1 (NMB)	*neuromédine B*
BB2	*neuromédine C*
BB3	*récepteur orphelin de GRPR*
BB4	*récepteur de bombésine*
BBN	*bombésine*
BC	*cancer du sein*
BHE	*barrière hémato-encéphalique*
B-MORF	*morpholine*
Boc	*tert-butoxycarbonyle*
BPDS	*disulfonate de bathophénanthroline disodique*
BTTP	*acide 3-(4-((bis((1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl)amino)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propane-1-sulfonique*
Bu	*butyle*
CAN	*nitrate de cérium et d'ammonium*
CBT	*2-cyano-6-aminobenzothiazole*
CB-TE2A	*acide 2,2'-(1,4,8,11-tétraazabicyclo[6.6.2]hexadécane-4,11-diyl)diacétique*

Abbréviation française (anglaise)	Signification
LAL	*limulus amoebocyte lysate*
CPL (LC)	*chromatographie en phase liquide*
LDA	*diisopropylamidure de lithium*
LogD$_{7,4}$	*coefficient de partage octanol/tampon à pH 7,4*
LogP	*coefficient de partage octanol/eau*
LUMO	*orbitale moléculaire la plus basse inoccupée*
T$_{fus}$ (Mp)	*température de fusion*
Me	*méthyle*
MS	*spectrométrie de masse*
Ms	*mésylate*
MUT-DS	*afficorps (anticorps et ligands d'affinité) anti-HER2 à 2 hélices*
n	*neutron*
Na Asc	*ascorbate de sodium*
NBS	*N-bromosuccinimide*
NCS	*isothiocyanate*
NHS	*N-hydroxysuccinimide*
NOAC	*cycloaddition oxyde de nitrile-alcyne*
NODA	*acide 1,4,7-triazacyclononane-1,4-diacétique*
NOTA	*acide 2,2',2''-(1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triyl)triacétique*
***n*Pr**	*n-propyle*
NPY1R	*récepteur du neuropeptide Y1*
OxymaPure	*cyano(hydroxyimino)acétate d'éthyle*
p	*proton*
***p*ADA**	*N-(4-(l3-méthyl)phényl)-2-(2-oxo-2l3-éthoxy)acétamide*
PB	*solution phosphate tamponnée*
PBO	*peroxyde de benzoyle*
PBS	*tampon phosphate salin (commercial)*
PC	*cancer de la prostate*

CCM (TLC)	*chromatographie sur couche mince*
CCO	*cis-cyclooctène*
CPG (GC)	*chromatographie en phase gazeuse*
CQ	*contrôle qualité*
CSH	*surface hybride chargée*
CSIC	*cycloadditions intermoléculaires ou intramoléculaires entre un sulfonate et un carbanion*
TDM (CT)	*tomodensitométrie*
CuAAC	*cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre (I)*
CXCR4	*récepteur de chimiokine C-X-C de type 4*
dba	*dibenzylidèneacétone*
DBF	*dibenzofulvène*
DBU	*1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène*
DCC	*N,N'-dicyclohexylcarbodiimide*
DCE	*1,2-dichloroéthane*
DCM	*dichlorométhane*
RCD (DCY)	*rendement corrigé de la décroissance*
DIC	*N,N'-diisopropylcarbodiimide*
DIPA	*N,N-diisopropylamine*
DIPEA	*N,N-diisopropyléthylamine*
DMA	*N,N-diméthylacétamide*
DMAP	*4-diméthylaminopyridine*
DMF	*N,N-diméthylformamide*
DMH4A	*2,6-diméthylheptan-4-amine*
DMP	*périodinane de Dess-Martin*
DMSO	*diméthylsulfoxyde*
DO3AtBu	*DOTA avec 3 groupements tert-butyles*
DOPA	*3,4-dihydroxy-6-[^{18}F]-fluoro-L-phénylalanine*
DOTA	*acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique*
DPBS	*solution saline de tampon phosphate (Gibco Dulbecco's) à pH 7,0-7,2 contenant du calcium et du magnésium*
dppb	*1,4-bis(diphénylphosphino)butane*
dppe	*1,2-bis(diphénylphosphino)éthane*
dppf	*1,1'-bis(diphénylphosphino)ferrocène*
PEG	*polyéthylène glycol*
pH	*potentiel hydrogène*
Ph	*phényle*
PHL	*demi-vie plasmatique*
PIDA	*diacétate d'iodobenzène*
pK_A	*logarithme négatif de la constante d'acidité K_a d'un équilibre acido-basique*
ppm	*partie par million*
PPTS	*toluènesulfonate de pyridium*
PSMA	*antigène membranaire spécifique de la prostate*
PVDF	*polyfluorure de vinylidène*
PyBOP	*hexafluorophosphate de (benzotriazol-1-yloxy)tri(1-pyrrolidinyl)phosphonium*
QMA	*méthylammonium quaternaire*
Q-Tof	*quadripôle à temps de vol*
RCD ou RCY	*rendement radiochimique corrigé de la décroissance*
RCP	*pureté radiochimique*
RCPG	*récepteurs couplés aux protéines G*
R_f	*facteur de rétention*
RGD	*arginine (R), glycine (G) et aspartate (D)*
RIT	*radioimmunothérapie*
RMN (NMR)	*spectroscopie par résonance magnétique nucléaire*
RT	*radiothérapie*
RTE	*radiothérapie externe*
RTI	*radiothérapie interne*
RTM	*radiothérapie métabolique*
RTV	*radiothérapie vectorisée*
RuAAC	*cycloaddition azoture-alcyne catalysée au ruthénium(II)*
S/DVB	*styrène/divinylbenzène*
SA	*streptavidine*
SARS	*sarcophagine (3,6,10,13,16,19-hexazabicyclo[6,6,6]icosane)*
***s*-collidine**	*2,4,6-collidine*
SEC	*chromatographie d'exclusion stérique*
SN	*substitution nucléophile*

dppp	*1,3-bis(diphénylphosphino)propane*
DTPA	*acide diéthylènetriamine-pentaacétique*
EDC.HCl	*hydrochlorure de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide*
EDG	*groupement électrodonneur*
EDT	*éthanedithiol*
ESI	*ionisation par électronébulisation*
Et	*éthyle*
EWG	*groupement électroattracteur*
FA	*acide formique*
FAM	*carboxyfluorescéine*
FCH	*fluorocholine*
FDA	*administration des aliments et des médicaments*
FDG	*fluorodésoxyglucose*
FET	*fluoroéthyltyrosine*
FLT	*fluorothymidine*
FMISO	*fluoromisonidazole*
FMO	*orbitales moléculaires frontières*
Fmoc	*fluorénylméthoxycarbonyle*
fQWAVGH	*séquence peptidique [D-phényle (f), glutamine (Q), tryptophane (W), alanine (A), valine (V), glycine (G) et histidine (H)]*
FR	*récepteur du folate*
GA	*acide glutarique*
GMP	*bonnes pratiques de fabrication*
GP	*groupe partant*
GRAF	*glutamate, rhodopsine, adhésion, frisé/goût 2, sécrétine*
GRP	*peptide libérant de la gastrine*
GRPR	*récepteur du peptide relarguant de la gastrine*
HATU	*hexafluorophosphate de 2-(7-aza-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium*
HBTU	*hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthylaminium*
HCTU	*hexafluorophosphate de O-(1H-6-chlorobenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium*
SPAAC	*cycloaddition azoture-alcyne promue par tension de cycle*
SPANC	*cycloaddition nitrone-alcyne promue par tension de cycle*
SPE	*extraction en phase solide*
SPECT	*tomodensitométrie d'émission monophotonique*
SPPS	*synthèse peptidique en phase solide*
SPS	*système de purification de solvant*
SPSAC	*cycloaddition sydnone-alcyne promue par tension de cycle*
SSTR	*récepteur de la somatostatine*
SUV	*valeur d'absorption standardisée*
SWNt	*nanotubes de carbone à paroi unique*
TAC	*courbes d'activité temporelle*
TAG	*glycoprotéine associée à la tumeur*
TBA	*tétra-n-butylammonium*
TBHP	*hydroperoxyde de tert-butyle*
TBTA	*tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl]amine*
TBTU	*tétrafluoroborate de 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium*
tC18	*silice greffée trois fois par des chaines de alcanes de 18 carbones*
TCO	*trans-cyclooctène*
TEMP	*tomographie par émission monophotonique*
TEP (PET)	*tomographie par émission de positons*
TETA	*acide 1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane-N,N',N'',N'''-tétraacétique*
Tf	*trifluorométhanesulfonate*
TFA	*acide trifluoroacétique*
TFE	*2,2,2-trifluoroéthanol*
TFP	*2,3,5,6-tétrafluorophénol*
THF	*tétrahydrofurane*
THPTA	*tris(3-hydroxypropyltriazolylméthyl)amine*
TIPS	*triisopropylsilyle*
TMEDA	*tétraméthyléthylènediamine*

HER2	*récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain*
HFIP	*1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol*
HMDS	*bis(triméthylsilyl)amide*
HOBt	*1-hydroxybenzotriazole*
HOMO	*orbitale moléculaire la plus haute occupée*
HPLC	*chromatographie liquide haute performance*
HRMS	*spectrométrie de masse haute résolution*
HSAB	*théorie des acides et des bases durs et doux (Pearson)*
HSS	*silice à haute résistance*
IC_{50}	*concentration inhibitrice médiane*
IEDDA	*Diels-Alder à demande inverse d'électron*
***i*Pr**	*isopropyle*
IR	*infrarouge*
IRM (MRI)	*imagerie par résonance magnétique*
IUPAC	*union internationale de chimie pure et appliquée*
K_{222}	*2,2,2-cryptand*
TMP	*2,2,6,6-tétraméthylpipéridine*
TMS	*triméthylsilyle*
TNBS	*acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique*
TRITA	*acide 1,4,7,10-tétraazacyclotridécane-N,N',N'',N'''-tétraacétique*
Trt	*trityle*
Ts	*p-toluènesulfonyle*
TSTU	*tétrafluoroborate de 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthylisouronium*
Tz	*tétrazine*
UHPLC	*chromatographie liquide ultra-haute performance*
UI	*unités infectieuses*
UV	*ultraviolet*
VCAM	*molécule d'adhésion des cellules vasculaires*
VIP-R1	*récepteur 1 du polypeptide intestinal vasoactif*
VOIs	*volume d'intérêts*
XS	*sensibilité extrême*

Liste des figures

Figure 1 : Principe des imageries TEP et TEMP.[5] 39
Figure 2: Différentes catégories de thérapies selon l'origine et le scellement. 40
Figure 3: Production du fluor-18 par cyclotron en A) et B) selon le principe de fonctionnement en C) régit par la réaction nucléaire D) et la purification des fluorures en E). 42
Figure 4: Radiotraceurs au fluor-18 couramment utilisés en TEP et l'image TEP associée chez l'homme atteint de métastases. 45
Figure 5 : Principe de la chimie « click ». 51
Figure 6: Stratégie de pré-ciblage. 54
Figure 7: Différence entre une cycloaddition de Diels-Alder et la cycloaddition IEDDA. 57
Figure 8 : Evaluation in vivo de tétrazine dérivés du [^{18}F]FDG de Keinänen et al (A) Structure, B) Biodistribution chez la souris et C) Imagerie TEP).[173] 66
Figure 9: Gain de contracte en TEP d'un tétrazine aliphatique (B) comparativement à une tétrazine diphénylique (A).[155] 66
Figure 10: Objectifs et stratégie des travaux de thèse. 70
Figure 11 : Influence de la concentration en sultone de départ **3** sur le rendement. 89
Figure 12 : Influence du temps de l'étape d'alkylation lors de la synthèse de la sultone propargylique **15**. 90
Figure 13: Spectre de masse ESI$^+$ de la LC-MS des tétrazinesultones **26** (A) et **28** (B). 100
Figure 14: Spectre de masse ESI$^+$ de la LC-MS de la synthèse à partir de la sultone **40** (A) de la tétrazine bissultone **41** (B), et de la synthèse à partir de la sultone **15** (C) ou de la sultone **40** (D), de la tétrazine sultone **42** (E). 106
Figure 15 : Spectre de masse ESI$^+$ de la LC-MS de la synthèse de la tétrazine sultone **46** (B) à partir de la tétrazine **45** (A). 108
Figure 16 : Ligand fréquemment utilisé dans la CuAAC par solubilité dans l'eau croissant.[350] 119
Figure 17 : Spectre de masse ESI$^+$ des tétrazines sultones issues de CuAAC. 133
Figure 18 : Spectre de masse de la fluorosulfotétrazine issu de l'analyse LC-MS de la réaction de fluoration de la tétrazine sultone **79** avec CsF, K_{222} et Cs_2CO_3. 139
Figure 19 : Radio-CCM de la fluoration de la sultone propargylique **15**. 145
Figure 20 : Marquage en 3 étapes pour la synthèse de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** analysé par HPLC et radioCCM). 150
Figure 21 : Chromatogrammes HPLC semi-préparative en fin de radiosynthèse automatisée de la **[^{18}F]79**. 152
Figure 22 : Analyse HPLC analytique de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** formulée avec l'activité détectée par e-SAT/IN en A), l'UV détectée par la barrette d'iode en B) et comparée à l'UV de la fluorosulfotétrazine **79** en C). 153
Figure 23 : Analyses de **[^{18}F]79** pour le contrôle qualité avec en la CCM en (A) et le chromatogramme HPLC en (B). 154
Figure 24 : Étude de la stabilité de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** formulée (A) dans le sérum physiologique et (B) dans le PBS. 157
Figure 25 : (A) Images TEP/CT de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** chez la souris SWISS mâle ; (B) TAC pour la voie urinaire ; (C) TAC pour la voie hépatobiliaire ; (D) TAC pour les poumons et le cœur ; (E) TAC pour le cerveau, les muscles et les os ; (F) Biodistribution dans les principaux organes. 158

Figure 26: Radiochromatogrammes HPLC et CCM A-B) du CQ de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** formulée après radiosynthèse, C-D) du plasma prélevé à 30 min après injection iv, E-F) du même échantillon de plasma que C-D) analysé 135 min plus tard (plaque CCM F) deux fois plus longue que B) et D)). 160
Figure 27 : Analyse HRMS du brut de la synthèse de la DOTA-sulfotétrazines **80** (A), et de la 6-FAM-sulfotétrazine **82** (B). 165
Figure 28: Cellule du cancer de la prostate (à gauche) et structure du récepteur GRPR à droite. 175
Figure 29 : Cinétique de chargement de la résiné 2-Cl-Trt par l'histidine (à gauche), exemple de régression linéaire de l'absorbance à 301 nm en fonction du poids du prélèvements de résine après 4 h de chargement (à droite). 187
Figure 30 : Cinétique de déprotection Fmoc au 4-Mepip (à gauche) et optimisation des lavages (à droite). 188
Figure 31 : Comparaison des protocoles sur la pureté de la séquence peptidique fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **109** après clivage sans traitements..... 190
Figure 32 : Analyse de masse ESI$^+$ (LC-MS) de la séquence peptidique clivée fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **111**. 191
Figure 33 : Analyses LC-MS (ESI$^+$) des peptides **124**, **125**, **126** et **127** avec n = 8, 12, 2 et 36. 198
Figure 34: Analyses LC-MS des peptides **156** et **157**. 216
Figure 35 : Analyses LC-MS des peptides **178** et **179** obtenus par CuAAC en SPPS à partir du peptide **166**. 222
Figure 36 : Analyses LC-MS des peptides **187**, **188** et **189**. 226
Figure 37 : Analyses LC-MS des produits de IEDDA entre le peptide **178** issus de la CuAAC et quatre tétrazines commerciales..... 234
Figure 38: Analyses LC-MS des produits de IEDDA entre le peptide **179** issus de la CuAAC et quatre tétrazines commerciales. 235
Figure 39: Contrôle qualité issus du marquage directe des DOTA-PEG$_{11}$-NH-CH$_2$-Ph-pydzcco-NH-(CH$_2$)$_2$-PEG$_n$-HTrz-(CH$_2$)$_3$-fQWAVGH-DMH4A **[^{111}In]206** et **[^{177}Lu]207** (n = 23).... 239
Figure 40 : Tests sur membranes (test IC$_{50}$ in vitro). 244
Figure 41 : Test de pré-ciblage in vitro. 245
Figure 42 : Fume hood equipped with 5 cm lead-shielded (left) and hot cell (right). 294
Figure 43: TRACER lab FX N Pro module. 299

Liste des schémas

Schéma 1 : Objectif du projet. 32
Schéma 2 : Exemple d'agents cryptants. 43
Schéma 3: Type de marquage au fluor-18 nucléophile. 44
Schéma 4: Quelques exemples d'autres types de fluorations nucléophiles en série aromatiques.[32,,] 44
Schéma 5 : Principaux représentants de la famille des polyamines macrocycliques utilisés en radiochimie. 46
Schéma 6 : Macrocycle pré-activé généralement utilisé en radiochimie pour fonctionnaliser les molécules d'intérêts. 47
Schéma 7: Groupements prosthétiques les plus utilisés en fluor-18 par réactivité. 49
Schéma 8: Exemples de groupements prosthétiques appliqués aux liaisons hétéroatomes - fluor-18. 50
Schéma 9: Quelques exemples de réaction "click" les plus couramment utilisés dans les applications de marquages. 52
Schéma 10: Principaux groupements prosthétiques pour la CuAAC en fluor-18. 53
Schéma 11: Quelques exemples de réactions "click" bioorthogonales couramment utilisées dans les applications de marquages. 55
Schéma 12: Quelques exemples de groupements prothétiques développés à partir de la chimie bioorthogonale (adapté de Pretze et al).[60] 55
Schéma 13: Cycloaddition IEDDA [4+2] entre une tétrazine et un trans-cyclooctène. 56
Schéma 14: Quelques exemples de structures tétrazines et alcynes en fonction des effets électroniques (adapté de Oliveira et al).[116] 58
Schéma 15: Différentes voies de synthèses possibles des tétrazines. 59
Schéma 16 : Évolutions récentes de la réaction de Pinner. 60
Schéma 17: Principaux diénophiles radiofluorés.[102,112,,,,,] 62
Schéma 18: Quelques exemples de tétrazines radiomarquées.[155,,,,,,] 63
Schéma 19 : Quelques exemples des sultones les utilisés dans la littérature avec la nomenclature commerciale. 71
Schéma 20 : Réaction d'ouverture des sultones par addition nucléophile de fluorure [^{18}F]F$^-$ d'après Schmitt et al.[191] 75
Schéma 21 : Stratégie générale de synthèse des tétrazine sultones. 81
Schéma 22 : Fonctionnalisation de 1,4-butanesultone par des aldéhydes ou cétones (A : -67 °C, 5 h ; B : -78 °C, 3 h). 85
Schéma 23 : Synthèse de tétrazines aldéhydiques **283** et **284** (A) selon Quinton et al[254] et **288** (B) selon Wieczorek et al.[255] 86
Schéma 24 : Fonctionnalisation de 1,4-butanesultone par des dérivés bromés (A : -78 °C, 3 h puis -60 °C, 1 h ; B : -78 °C, 5 h ; C : -78 °C, 30 min ; D : -78 °C, 3 h) 87
Schéma 25 : Stratégies envisagées pour obtenir les tétrazinesultones à partir des sultones **7** et **24**. 87
Schéma 26 : Optimisation de la synthèse de la sultone **15**. 88
Schéma 27: Sultones retenues pour la suite du projet. 92
Schéma 28 : Voies de synthèse envisagées des tétrazinesultones à partir de la butanesultone **3** commerciale et de de la butanesultone propargylique **15**. 93
Schéma 29 : Synthèses envisagées des tétrazinesultones **26** et **28** par fonctionnalisation de la butanesultone **3**. 94

Schéma 30 : Synthèse de la tétrazine bromée **25** par Wu et You.[258] 95
Schéma 31: Répétition du protocole de Wu et You.[258] 95
Schéma 32 : Synthèse de la 3-(bromométhyl)-6-méthyltétrazine **25**. 95
Schéma 33 : Synthèse de la 3-(bromométhyl)-6-méthyltétrazine **25** par monobromation radicalaire de la diméthyltétrazine **32**. 96
Schéma 34 : Réaction de Pinner de la bromo-tétrazine **27** à partir du bromonitrile **6**. 97
Schéma 35 : Synthèse en deux étapes de la bromotétrazine **27**. 97
Schéma 36 : Synthèse de la 3-méthyl-6-(p-tolyl)tétrazine **33** (A) selon Lang et al[260] et (B) selon Xiong et al.[262] 97
Schéma 37 : Bromation radicalaire de la 3-méthyl-6-(p-tolyl)tétrazine **33**. 99
Schéma 38 : Fonctionalisation de la butanesultone **3** par les bromotétrazines **25** et **27**. 100
Schéma 39 : Tétrazinesultones obtenues par alkylation de la butanesultone **3** commerciale. 100
Schéma 40 : Couplage de Sonogashira. 101
Schéma 41 : Mécanisme générale communément admis pour la réaction de Sonogashira catalysé au Pd et au Cu. 101
Schéma 42 : Couplage de Sonogashira de 3-amino-6-chlorotétrazines par Novák et Kotschy.[279] 103
Schéma 43 : Couplage de Sonogashira par Ros et al de tétrazine**s** bromées.[281] 103
Schéma 44 : Couplage de Sonogashira à partir de la iodophényltétrazine **37** selon (A) Wieczorek et al[282] et (B) Wang et al.[283] 104
Schéma 45 : Tétrazinesultones envisagées par couplage de Sonogashira. 104
Schéma 46 : Synthèse des tétrazinebissultone **41** et tétrazinesultone **42**. 106
Schéma 47 : Synthèse des tétrazinesultones **42** et **46**. 107
Schéma 48 : O-Méthylation de la 3,6-dichlorotétrazine **36** et formation du sous-produit **47**. 107
Schéma 49 : Synthèse de la 3-(4-chlorophényl)-6-méthyltétrazine **38** selon Lang et al,[292] et selon Lambert et al.[294] 109
Schéma 50 : Synthèse des 3-(4-halogénophényl)-6-méthyltétrazines **38**, **39** et **37**. 112
Schéma 51 : Synthèse de la tétrazinesultone **52**. 112
Schéma 52 : Tétrazinesultones obtenue par couplage de Sonogashira à partir de la dichlorotétrazine **36** et de la 4-iodophényltétrazine **37**. 113
Schéma 53 : Stratégie de synthèse de tétrazinesultones par CuAAC. 113
Schéma 54 : Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre un azoture et un alcyne. 114
Schéma 55 : Mécanisme de la CuAAC couramment admis proposé par Sharpless et al (à gauche),[312] et Fokin et al (à droite).[330] 115
Schéma 56 : Synthèse des azidotétrazines par 3 stratégies différentes. 122
Schéma 57 : Synthèse des tétrazines tosylées **55** et **L386** selon Denk et al,[126] Gong et al,[376] et Wu et al.[175] 125
Schéma 58 : Synthèse optimisée de la tétrazine tosylée **55**. 127
Schéma 59 : Voie de synthèse alternative pour la 3-(3-azidopropyl)-6-méthyltétrazine **55**. . 127
Schéma 60 : Synthèse de l'azidotétrazine **61**. 128
Schéma 61 : Synthèse de l'azidotétrazine **65** via la tétrazine tosylée **58**. 129
Schéma 62 : Synthèse des azidotétrazines **64** et **65** à partir des bromotétrazines **25** et **27**. ... 130
Schéma 63 : Synthèse des azidotétrazines à partir des bromonitriles **66**, **67** et **6**. 131
Schéma 64 : Synthèse totale la plus efficace de l'azidotétrazine **65**. 132
Schéma 65 : CuAAC entre les azidotétrazines **64**, **61** et **65** et la sultone propargylique **15**. . 132
Schéma 66 : Bilan des tétrazinesultones obtenues. 134
Schéma 67 : Sulfotétrazines cibles destinées à être valorisées en imagerie TEP et optique. . 137
Schéma 68: Fluoration de la tétrazine sultone **78**. 138
Schéma 69. Stratégie de synthèse de la fluorosulfotétrazine **79** en 3 étapes. 139

Schéma 70: Fluoration de la sultone propargylique **15**. 140
Schéma 71 : Radiofluoration de la tétrazine sultone **[^{18}F]79** et analyses HPLC et radioCCM avec (A) [^{18}F]KF/K_{222}/K_2CO_3 dans CH_3CN ; (B) [^{18}F]KF/K_{222}/KH_2PO_4 ; (C) [^{18}F]KF/K_{222}/ K_2CO_3/PPTS. 144
Schéma 72 : Radiofluoration de la sultone propargylique **15** et comparaison entre **[^{18}F]84** purifié par HPLC semi-préparative (A-B) et SPE (D-E) suivant respectivement l'activité détectée par e-SAT/IN en A) et D), l'UV détectée par la barrette d'iode en B) et E), et comparée à l'UV de l'acide fluorosulfonique **84** à la même concentration en C), et saturée en F). 146
Schéma 73 : CuAAC entre l'acide fluorosulfonate **[^{18}F]84** et l'azidotétrazine **65**. 147
Schéma 74 : Marquage en 3 étapes pour la synthèse de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79**. 149
Schéma 75 : Valorisation des Tz-sultones pour la radiochimie des radiométaux, et pour l'imagerie optique par fluorescence. 162
Schéma 76 : Synthèse modèle entre la sultone benzylique **5**, et des dérivés DOTA et 6-FAM. 163
Schéma 77: Synthèse de tétrazine sufonate model **94** et **95**, et application à la DOTA-sulfotétrazines **80** et au 6-FAM-sulfotétrazine **82**. 164
Schéma 78. Synthèse de la fluorosulfotétrazine **79** et évaluation in vivo. 166
Schéma 79 : Valorisation des tétrazinesultones pour la radiochimie des radiométaux et pour l'imagerie optique par fluorescence. 167
Schéma 80 : Comparaison d'espaceur pour la bombésine BBN[7-14].[466] 179
Schéma 81 : Autres espaceurs.[468,445] 180
Schéma 82: Synthèse de la séquence peptidique fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **109** (suivant la notation 1 lettre des acides aminés). 186
Schéma 83 : Synthèse des peptides **124**, **125**, **126** et **127** par couplage peptidique en SPPS. 193
Schéma 84 : Principaux agents de couplage (A), additifs (B) et bases (C) utilisés pour la synthèse peptidique en phase solide (SPPS) après déprotection Fmoc des acides aminés par la 4-méthylpipéridine (D).[513,514,515,516] 195
Schéma 85 : Pré-activation du PEG_{36} par le NHS. 200
Schéma 86 : Pré-activation du PEG_{36} par le TFP. 201
Schéma 87 : Pré-activation du PEG_{36} par le $SOCl_2$. 202
Schéma 88 : Clivage de la séquence peptidique fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **109** par HFIP à 20%. 205
Schéma 89 : Principaux réactifs (A) et additifs (B) de clivages pour la résine 2-Cl-Trt. [488,489] 206
Schéma 90 : Clivage optimisé de la séquence fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **111** par FA/TFE/TIPS/DCM (10/10/10/70). 207
Schéma 91 : Stratégie 1 de couplage en solution. 208
Schéma 92 : Stratégie 2 de couplage optimisé en solution. 209
Schéma 93 : Synthèse des peptides **125**, **156** et **157** avec n = 1, 2 ou 3. 213
Schéma 94 : Peptide **139**, **140** et **141** protégé et déprotégé partiellement ou totalement. 214
Schéma 95 : Synthèse des peptides **164**, **165** et **166** fixés sur la résine 2-Cl-Trt et fonctionnalisés par des azotures ou un alcyne. 219
Schéma 96 : Synthèse des peptides **178** et **179** par CuAAC en SPPS. 221
Schéma 97 : Synthèse des peptides **187**, **188** et **189** suivant la stratégie 1. 224
Schéma 98 : Synthèse des peptides **184**, **185** et **186** suivant la stratégie 2. 227
Schéma 99 : CuAAC en solution entre l'alcyne-peptide **186** et le 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine. 229
Schéma 100 : CuAAC en solution entre l'alcyne-peptide **186** et le 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine. 230

Schéma 101 : Réaction IEDDA entre les peptides porteurs d'un TCO **178** et **179** issus de la CuAAC et quatre tétrazines commerciales. 233
Schéma 102 : Stratégies de marquage utilisées pour marquer les peptides. 236
Schéma 103 : Marquage direct des peptides **199** et **200** (avec n = 3 ou 23) par l'indium-111 (^{111}In) ou le lutétium-177 (^{177}Lu). 237
Schéma 104 : Marquage indirect des peptides **178** et **179** (avec n = 3 ou 23) par l'indium-111 (^{111}In) **201** ou le lutétium-177 (^{177}Lu) **202**. 240
Schéma 105 : Suivie par HPLC de la stratégie de marquage par l'indium-111 (^{111}In) ou le lutétium-177 (^{177}Lu) via IEDDA. 242

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux radionucléides pour l'imagerie et la thérapie.[4] 37
Tableau 2 : Différents types de composés radioactifs en fonction de leur taille (adapté de James et al).[5] 41
Tableau 3 : Cinétique et stabilité de 9 tétrazines avec le (E)-cyclooct-4-ènol (TCO) par spectrophotométrie à λ = 515 nm (1-2 h).[140] 59
Tableau 4 : Influence des groupements sur la cinétique et l'efficacité de l'IEDDA.[135] 67
Tableau 5 : Tétrazines hydrophiles développés par Mathias et coll pour le pré-ciblage avec blocage (souris xénogreffée d'une tumeur LS174T ciblé par un anticorps anti-TAG72-CC49-TCO et + [^{18}F]Tz à 1 h post-injection). 68
Tableau 6 : Résumée de la littérature sous Scifinder^{n} de l'ouverture des sultones par les amines et les alcools. 74
Tableau 7 : Bibliographie de la fluoration des sultones par ouverture de cycle. 77
Tableau 8A : Sultones fonctionnalisées en α du soufre par des aldéhydes, cétones ou esters. 83
Tableau 9 : Influence de la température dans la synthèse de la sultone propargylique **15**. 90
Tableau 10 : Synthèse de la 3-méthyl-6-(p-tolyl)tétrazine **33**. 98
Tableau 11 : Synthèse de la tétrazinesultone **40**. 105
Tableau 12 : Synthèse de la 3-(4-bromophényl)-6-méthyltétrazine **39** dans la littérature. 110
Tableau 13 : Synthèse de la 3-(4-iodophényl)-6-méthyltétrazine **37** dans la littérature. 111
Tableau 14 : CuAAC à partir des tétrazines dans la littérature. 118
Tableau 15 : Synthèse d'azidotétrazine dans la littérature. 121
Tableau 16 : Synthèse de tétrazinetosylates à partir de tétrazinealcools dans la littérature. .. 123
Tableau 17 : Quelques paramètres clés de la réaction de cyanation. 126
Tableau 18 : Différents catalyseur pour la réaction de Pinner. 126
Tableau 19 : Synthèse de la tétrazineméthanol **57** dans la littérature. 128
Tableau 20 : CuAAC entre la sultone fluorée **84** et l'azidotétrazine **65**, et réoxydation. 141
Tableau 21 : Contrôle qualité réalisée sur le lot de la **[^{18}F]79** issus de l'optimisation finale sur automate de synthèse. 155
Tableau 22 : Dix principaux types de cancer pour l'estimation des nouveaux cas de cancer et des décès par sexe, États-Unis, 2021 171
Tableau 23 : Expression de GRPR maximal dans les tumeurs humaines d'après Cornelio et al.[392] 172
Tableau 24 : Exemples de peptides analogues de GRP/bombésine. 177
Tableau 25 : Quelques exemples d'analogues de la bombésine fonctionnalisée par un PEG_n. 181
Tableau 26 : Réaction de couplage des PEG_n en SPPS avec différentes quantités d'agents de couplages. 192
Tableau 27 : Réaction de couplage des PEG_n en SPPS à différents temps. 194
Tableau 28 : Tests de différents agents de couplages pour le couplage de PEG_{36} en SPPS activé par NHS. 200
Tableau 29: Tests de différents agents de couplages pour le couplage de PEG_{36} en SPPS activé par TFP. 201
Tableau 30 : Comparaison des couplages directes de PEG_{36} en SPPS avec ou sans activation. 203
Tableau 31 : Influence du pourcentage d'HFIP sur le clivage de la séquence peptidique fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **109**. 205

Tableau 32 : Tests de différents mélanges de clivage pour le peptide **109**. 206
Tableau 33 : Influence des agents de couplage en C-terminal pour le peptide **135**. 210
Tableau 34 : Comparaison des couplages directes de PEG_n en SPPS et en solution. 211
Tableau 35 : Multiple couplage de PEG_{12} en SPPS. 214
Tableau 36 : Multiple couplage de PEG_{12} en SPPS. 214
Tableau 37 : Comparaison des couplages directes et multiples de PEG_n en SPPS et en solution. 216
Tableau 38 : Influence du cuivre et du solvant sur la synthèse du peptide **170**. 221
Tableau 39 : Influence de l'agent de couplage sur la réactivité et la pureté en solution. 227
Tableau 40 : Comparaison des deux stratégies de synthèse en solution des peptides **187**, **188** et **189**. 228
Tableau 41 : Influence du cuivre et du solvant sur la synthèse du peptide **174**. 229
Tableau 42 : Comparaison de la CuAAC en SPPS et en solution. 231
Tableau 43 : Essais de marquages directs à 90 °C du peptide **200** (n = 23). 238
Tableau 44 : Essais de marquages directs à 90 °C de la DOTA-$dPEG_{11}$-Tz 198. 241
Tableau 45 : List of consumables. 299

Production scientifique

Article

J. Beaufrez, S. Guillouet, F. Fillesoye, Y. Seimbille and C. Perrio. *Synthesis, radiolabeling with fluorine-18, and in vivo behavior by PET imaging of a hydrophilic fluorosulfotetrazine*. **Organic & Biomolecular Chemistry** (OBC) en cours de soumission

Communications par affiche

J. Beaufrez, S. Guillouet, F. Fillesoye, Y. Seimbille and C. Perrio. *Development of a highly hydrophilic [^{18}F]fluorosulfotetrazine for pre-targeting approaches in PET imaging*. **International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences** (iSRS), Nantes, 29 mai au 02 juin 2022.

J. Beaufrez, S. Guillouet, F. Fillesoye, Y. Seimbille and C. Perrio. *Development of a highly hydrophilic [^{18}F]fluorosulfotetrazine for pre-targeting approaches in PET imaging*. **Journée du Groupement de Recherche** (GDR) **Agents d'Imagerie Moléculaire** (AIM), Orléans, 3-5 octobre 2022.

Communications orales

J. Beaufrez, M. Ibazizene, S. Guillouet, Y. Seimbille and C. Perrio. *Radiosynthesis of a hydrophilic ^{18}F-labelled tetrazine for pre-targeting strategy in PET imaging*, **Journée de l'Ecole Doctorale Normande de Chimie** (JEDNC), Caen, 26 novembre 2020.

J. Beaufrez, S. Guillouet, F. Fillesoye, Y. Seimbille and C. Perrio. *Radiosynthesis and in vivo evaluation of a hydrophilic ^{18}F-labelled tetrazine for pre-targeting strategy in PET imaging*, **Journée de l'Ecole Doctorale Normande de Chimie** (JEDNC), Le Havre, 24 juin 2021

J. Beaufrez, M. Ibazizene, S. Guillouet, Y. Seimbille and C. Perrio. *Radiomarquage au fluor-18 d'une tétrazine hydrophile pour des approches de pré-ciblage en imagerie TEP*, **3ème Colloque Français de Chimie du Fluor** (CFCF 2022), Forges-Les-Eaux, 16-19 mai 2022.

Formation, conférence et enseignement

Formations

Formations spécifiques suivies EDNC508	Volume horaire (h)
Formation Chromatographie (Régis Guyon, Laurence Thomas-Hennig) (02/06/2021)	3
Total	3

Formations spécifiques suivies Cyceron	Volume horaire (h)
Neo (CNRS) (20/09/2020)	2
Prise en main et utilisation du TLC Raytest (par Société Raytest) (25/10/2018)	2
Prise en main, formation et utilisation de la suite Empower 3 et du système "System Suitability" (18-20/03/2020)	24
Formation interne à la radioactivité/radioprotection (07/05/2019)	4
Manipulation des extincteurs et évacuation (12/09/2019)	4,5
Total	34,5

Formations spécifiques suivies Erasmus MC	Volume horaire (h)
Formation LC-MS / HPLC (Agilent) (17/03/2021)	4
Instellingsgebonden Regelgeving (IGR) Stralingsbescherming - E-module (11/02/2021)	2
Basiscursus Stralingsbescherming - E-module (11/02/2021)	2
Basic and translational oncology (15/10/2021)	40
Total	48

Formations spécifiques suivies Conférence	Volume horaire (h)
Fluorine Chemistry in synthesis (Hikaru Yanai) (21/09/2018)	1,5
Récentes avancées pour la synthèse de molécules biologiquement actives marquées (D, ^{15}N et ^{13}C) (Jacques Lebreton) (20/12/2018)	2
Breaking the fundamental barriers of Ultrasound imaging: applications in neuroscience (Mickaël Tanter) (14/05/2019)	1,5
Radiochemistry in a flash: advanced synthesis of PET radiotracers for imaging cancer biomarkers (Jason Holland) (10/07/2019)	1,5
Improving Radiochemistry: the M3 Approach (Giancarlo Pascali) (15/07/2019)	1,5
Radiochemistry, Radiotracers and Translation (Tony Gee) (16/09/2019)	1,5
Synthèse de stéroïdes marqués au carbone 13 (Jacques Lebreton) (24/10/2019)	2
Telomerase-targeting radiopharmaceuticals for the selective treatment of cancer (Kate Vallis) (25/10/2019)	1,5
VCAM-1 Targeted Alpha-Particle Therapy for Early Brain Metastases (Aurélien Corroyer-Dulmont) (25/11/2019)	1,5
Vers des vecteurs d'acides nucléiques auto-fabriqués (Cyrille Sabot) (01/04/2022)	1,5
Total	16

Formations spécifiques suivies Webinaire	Volume horaire (h)
Analyse d'impuretés par détection de masse exacte (Waters) (02/02/2021)	1
Analyse et purification de peptides thérapeutiques (Waters)	1
A Novel Screening Workflow for the Analysis of Extractable and Leachable Components from Pharmaceutical Products (Waters) (22/03/2020)	1
5 innovations en MS : comment réinventer la technologie triple quadripolaire ? (Waters) (12/06/2019)	1
Analyse d'impuretés par détection de masse exacte (Waters)	1
Comment réduire les adsorptions non spécifiques (Waters) (29/09/2020)	1
Détection de masse en chromatographie liquide : bénéfices analytiques et aspects pratiques (Waters) (14/12/2020)	1
Détection de masse en chromatographie liquide partie 2 (Waters)	1
Du développement à la production comment simplifier le transfert de méthodes (Waters)	1
Récentes avancées en échange d'ions pour l'analyse de variants de charge (Waters) (19/03/2019)	1
Comment réduire l'effet de matrice ? (Waters) (15/06/2020)	1
Plus de simplicité, plus de rapidité et encore plus d'efficacité en SPE (Waters) (03/07/2020)	1
Quantification des peptides en milieux biologiques (Waters)	1
Nouvelle technologie de colonne pour la rétention de produits polaires (Waters) (17/03/2020)	1
Séparation des protéines par chromatographie d'exclusion stérique (SEC/GPC) (Waters) (05/11/2019)	1
Le vial n'est- il qu'un simple petit bout de verre ? (Waters) (20/06/2019)	1
Atelier technologique virtuel 1 : Colonnes LC (Waters) (17/11/2020)	1
Atelier technologique virtuel 2 : Préparation d'échantillons par SPE (Waters) (27/12/2020)	1
Préparation d'échantillons par SPE : Optimisation et Troubleshooting (Waters) (11/03/2021)	1
A friendly reminder that the HPLC reproducibility (Thermo-scientific) (17/06/2021)	1
Fundamentals and applications of photoredox catalysts in organic and macromolecular synthesis (ACS) (23/05/2021)	1
Generating chemically-viable solutions with drug discovery software (ACS) (22/10/2019)	1
How to ensure effective reliable safe cleaning procedures in your laboratory (Sigma-Aldrich) (23/05/2021)	1
Coupling Thin Layer Chromatography to Mass Spectrometry - a Combination of Two Powerful Analytical Methods (Sigma-Aldrich) (24/05/2021)	1
Find your filter what's best for your process (Sigma-Aldrich) (11/03/2019)	1
Preparative HPLC Part How to Build an Efficient Purification Process (Sigma-Aldrich) (12/03/2019)	1
Solutions for Mass Spectrometry Tips, Tricks and Applications (Sigma-Aldrich) (23/05/2021)	1
SciFinder^{n} et Rétrosynthèse (CAS) (08/04/2020)	1
Optimisez vos recherches avec SciFinder^{n}	1
Total	29

Formations transversales suivies UniCaen	Volume horaire (h)
Publications et intégrité scientifique	3,5
Anglais	30
Protéger, valoriser et diffuser les résultats et produits de la recherche	3
Mener sa thèse comme un projet	18
Structure et fonctionnement de l'enseignement supérieur et de la recherche	3
Développer son réseau professionnel	3,5
Sensibilisation à la Propriété Intellectuelle (Normandie Valorisation, Emilie Boudreaux)	4
Partager et valoriser ses recherches via les réseaux sociaux (CNRS) (22/09/2020)	1
INSPÉ - Module 01 : Pédagogies pour apprendre dans l'enseignement supérieur	12
INSPÉ - G1 - Module 02 : Construire, conduire et évaluer un CM et un TD	12
INSPÉ - G2 - Module 03 : Voix, corps et communication professionnelle (1/2) et (2/2)	6
MOOC Au cœur de la radioactivité médicale	15
MOOC Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche	15
Table Ronde Histoire d'Entrepreneur – Pepite (Mélanie Marin) (13/10/2020)	1
Intelligence économique et stratégie (05/02/2021)	6
ABG - Webinaire Métiers technico-commerciaux (02/02/2021)	1
Entreprenariat (29/06/2021)	2
Sensibilisation au dispositif d'entreprenariat – Pepites (02/07/2021)	3
Total	139

Formations transversales suivies Erasmus MC	Volume horaire (h)
Thesis Production: The first steps (21/01/2021)	1
A new spin office 365	4
The Career Development, CV and LinkedIn workshops (12-15-16-22-23/04/2021)	12
Excel Power Query (07/06/2021)	5
Excel VBA (21/05/2021)	6
MolMed biomedical English writing communication (08-22/04/2021;06-20/05/2021;03-17/06/2021)	18
Personal Leadership and communication (08-21/06/2021)	6,5
Word advanced create large document (05/02/2021)	5
PowerPoint Tricks you didn't know (13/10/2021)	5
Excel advanced (05/10/2021)	6
Microsoft PowerApps (05/11/2021)	7
Total	69

Vulgarisation scientifique

Nature	Public concerné	Volume horaire	Date
Fête de la science 2018	Tout public	6	13 & 14 octobre 2018
Festival de l'Excellence Normande : FÊNO	Tout public	6	12 au 14 avril 2019
Fête de la science 2019	Tout public	5	12 octobre 2019

Enseignements

Nature	Lieu et public concerné	Durée / dates
CM / TD : Chimie théorique	L1BST	06/09/2019-04/12/2019 => 15 h
	L1IBFA	09/09/2020-14/12/2020 => 30 h
TP : Chimie organique	L2BST	05/11/2019-06/12/2019 => 21 h
TP : Chimie générale	L1BST	10/01/2020-15/04/2020 => 40 h
Surveillances d'examen		6 h
Total		112 h

Avant-propos

Cette thèse de chimie qui a débuté en septembre 2018, a été financée pour 3 ans par une allocation de recherche de l'Université Caen Normandie (UCN) sous le régime de cotutelle internationale avec le centre Erasmus MC à Rotterdam aux Pays-Bas. Les travaux ont été développés dans les deux pays, au laboratoire Cyceron à Caen (pendant 2,3 ans) dans l'UMR6030 ISTCT puis depuis le 1er janvier 2022 dans UAR3408-US50 et au laboratoire de Chimie Radiopharmaceutique du Département de Radiologie et de Médecine Nucléaire d'Erasmus MC (pendant 1,2 ans).

Les travaux de thèse ont été fortement impactés par la pandémie de Covid-19, limitant ainsi fortement l'accès aux laboratoires en France et aux Pays-Bas, les collaborations avec les équipes de biologies et décalant de 6 mois le départ pour les Pays-Bas. En particulier, le premier confinement en France a fait perdre la plupart des composés peu stables perdant ainsi un précieux temps à les refaire. Cette thèse a donc fait l'objet d'une prolongation de financement de 6 mois supplémentaires (soit 3,5 ans au total).

Présentation générale

La réaction de cycloaddition de Diels-Alder à demande inverse d'électron entre une tétrazine (Tz) radiomarquée (ou plus généralement fonctionnalisée avec un contrastophore) et un *trans*-cyclooctène (TCO) porté par un peptide ou un anticorps, est une méthode importante de chimie bioorthogonale pour le développement de sondes d'imagerie et d'agents théranostiques. Cette approche permet d'introduire un groupement détectable sur un biomédicament par bioconjugaison avec une très grande efficacité et spécificité. Son extension à des stratégies de pré-ciblage *in vivo* est particulièrement appropriée dans le cas d'utilisation de vecteurs anticorps pour lesquels les pharmacocinétiques sont trop lentes par rapport à la durée de vie du contrastophore, notamment les atomes radioactifs à demi-vie courte. Les stratégies de pré-ciblage sont également très avantageuses pour des applications théranostiques permettant de limiter des effets non spécifiques. Ainsi, la chimie et la radiochimie des tétrazines et des bioconjugués se sont fortement intensifiées ces dernières années. La recherche de nouvelles structures à la fois plus facile d'accès, plus réactives, plus modulables pour l'introduction d'une plus grande variété de contrastophores, et dotées de propriétés pharmacocinétiques les plus appropriées pour les exploitations *in vivo*, représente un enjeu important. Des études récentes dans ce domaine ont montré que le caractère hydrophile des tétrazines et des bioconjugués était une propriété primordiale pour des exploitations *in vivo*, avec un impact en particulier sur leur biodisponibilité et leur pharmacocinétique. Dans ce cadre, le projet de thèse a consisté à développer des tétrazines et des conjugués du NeoBOMB1 originaux dotés de propriétés hydrophiles inédites (Schéma 1).

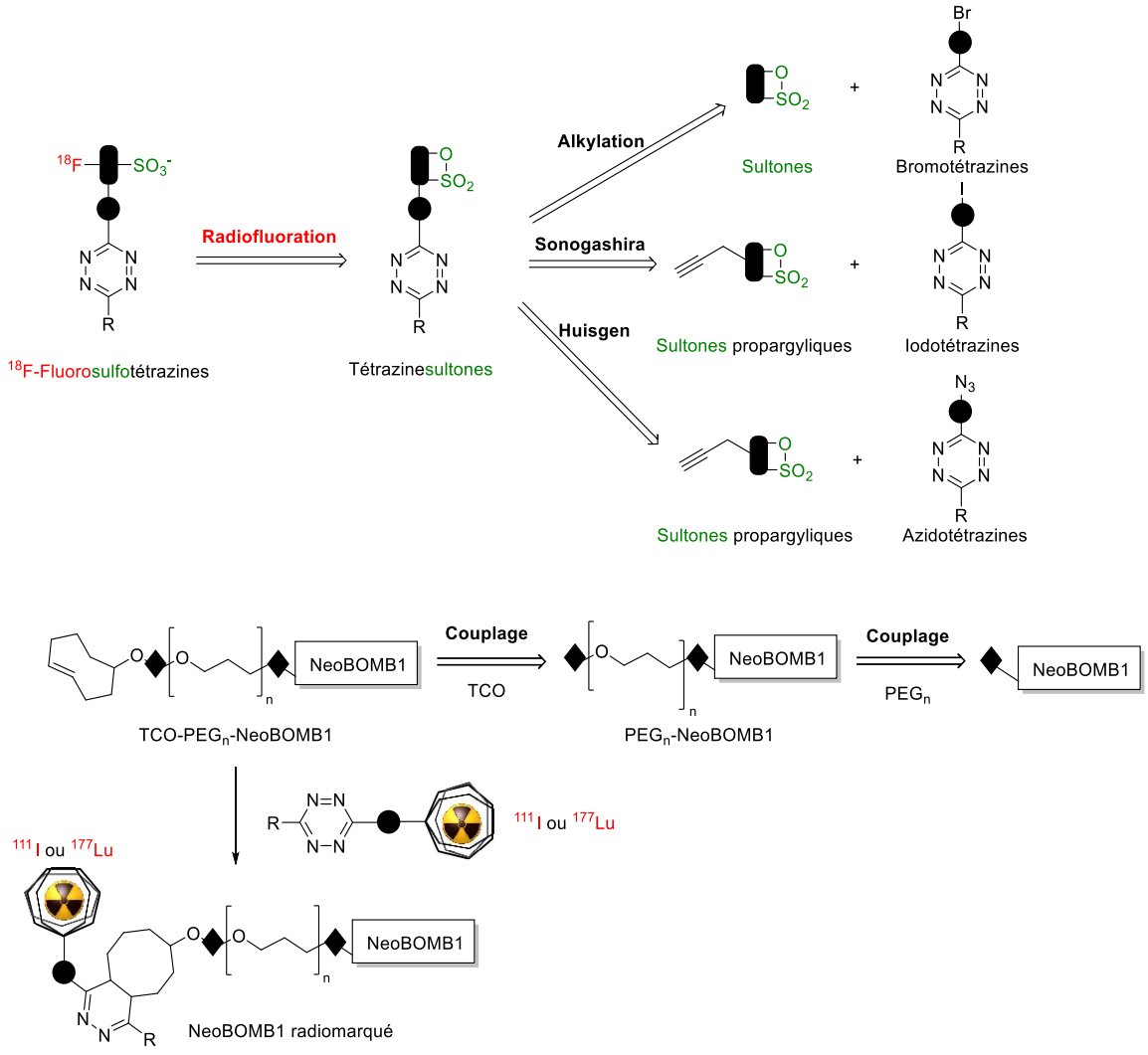


Schéma 1 : Objectif du projet.

Les tétrazines que nous avons visées sont caractérisées par la présence d'un groupement acide sulfonique (groupe sulfo) connu pour procurer des propriétés très hydrophiles à des structures organiques, et d'un atome de fluor-18 pour des applications en imagerie TEP. Nous avons basé leur synthèse sur la réaction d'ouverture de sultones précédemment valorisée au laboratoire en radiochimie du fluor-18, qui engendre de façon concomitante la formation d'une liaison C-^{18}F et la libération de la fonction acide sulfonique (Schéma 1). Dans une première partie, nous avons alors exploré la préparation de tétrazinesultones comme précurseurs potentiels des [^{18}F]fluorosulfotétrazines visées. Trois approches ont été étudiées : 1) la fonctionnalisation de la butanesultone avec une tétrazine bromée appropriée, 2) le couplage de Sonogashira entre la butanesultone propargylique et une tétrazine halogénée et 3) la cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre entre la butanesultone propargylique et une azidotétrazine.

Dans une seconde partie, nous avons mis au point la radiosynthèse d'une [^{18}F]fluorosulfotétrazine, déterminé son hydrophilie et étudié son comportement *in vivo* par imagerie TEP en termes de biodistribution, élimination et stabilité. Nous avons également développé des analogues portant à la place de l'atome de fluor-18 un fluorophore ou une structure DOTA chélatante pour des applications en imagerie optique ou théranostique après marquage avec un radiométal.

Dans une troisième partie, nous avons fonctionnalisé le peptide heptamère NeoBOMB1 avec un groupement *trans*-cyclooctène pour les applications de pré-ciblage. Le peptide NeoBOMB1, développé à Erasmus MC et actuellement dans le portfolio de Novartis, est un antagoniste du récepteur du peptide libérant de la gastrine (GRPR). Il a été radiomarqué par le gallium-68, l'indium-111 et le lutétium-177 pour des applications théranostiques dans le cadre du cancer du sein ou de la prostate. Néanmoins son accumulation dans des organes sains exprimant le GRPR, en particulier le pancréas, induit des effets secondaires liés à la radiotoxicité. Nous avons alors envisagé d'exploiter les propriétés antagonistes du NeoBOMB1, sa forte rétention tumorale et sa clairance rapide des tissus non-ciblés pour améliorer l'efficacité et la sécurité de la thérapie grâce à l'utilisation d'une stratégie de pré-ciblage basées sur la cycloaddition IEDDA. Différentes longueurs de chaine de polyéthylène glycol ont été introduites entre le TCO et la séquence NeoBOMB1. L'influence de ce paramètre sur la réaction « click » de Diels-Alder entre une tétrazine radiomarquée et les dérivés TCO-PEG$_n$-NeoBOMB1 a été évalué lors d'un test *in vitro* sur des membranes cellulaires exprimant le GRPR.

L'ensemble de ces travaux de recherches ont impliqué des travaux pluridisciplinaires en chimie (synthèse des tétrazinesultones) et en radiochimie avec le marquage au fluor-18 - incluant l'automatisation des radiosynthèses, la production répétée pour les évaluations par imagerie TEP, les études de de biodistribution et de stabilité *in vivo* -, à l'indium-111 et au lutétium-177 avec des tests de réactivité sur membranes.

Ce manuscrit de thèse est composé de 4 chapitres.

Le premier chapitre est consacré à la présentation du contexte du sujet, à sa présentation et son état de l'art. Ce chapitre vise à introduire les notions utiles à la compréhension de ces travaux de thèse : principe et intérêt de l'imagerie moléculaire, et plus précisément l'imagerie TEP, applications théranostiques, méthodes de radiomarquage au fluor-18, chimie click, stratégie de pré-ciblage basée sur la cycloaddition de Diels-Alder à demande inverse d'électron (IEDDA) entre un *trans*-cyclooctène (TCO) et un tétrazine (Tz), dérivés TCO marqués au fluor-18 ou par des radiométaux, synthèse et radiosynthèse des tétrazines. Il se termine par l'intérêt et la justification du développement des tétrazines hydrophiles puis présente le travail envisagé en argumentant les stratégies choisies.

Le deuxième chapitre est dédié aux travaux de synthèse des tétrazinesultones selon les trois voies citées ci-avant.

Le troisième chapitre traite du développement des agents d'imagerie avec le radiomarquage au fluor-18 et l'évaluation d'une [^{18}F]fluorosulfotétrazine, ainsi que la synthèse de sulfotétrazines fluorescentes et porteuse de structure DOTA.

Le quatrième chapitre décrit la fonctionnalisation du peptide NeoBOMB1 avec différentes longueurs de polyéthylène glycol (PEG). Les résultats de la préparation du NeoBOMB1, et des stratégies de fonctionnalisation par la synthèse peptidique en phase solide (SPPS) ou en solution sont présentées.

Ces chapitres sont suivis d'une conclusion générale avec présentation des perspectives envisagées, de la partie expérimentale (rédigée en anglais), et de la bibliographie.

Les travaux présentés dans les chapitres 2 et 3 ont été réalisés à Caen et ceux relatifs au chapitre 4 à Rotterdam.

Chapitre

I

Introduction générale

1 Introduction générale

Le radiomarquage de biomédicaments, peptides et anticorps, représente un domaine de recherche intense pour la médecine nucléaire dans le but d'applications diagnostiques (par imagerie) et théranostiques, en particulier pour le traitement des cancers. Ce domaine de recherche est aussi complexe et multidisciplinaire mettant en jeu des activités aussi diverses que le radiomarquage et la radiochimie avec une grande variété de radio-isotopes, la chimie des précurseurs, la bioconjugaison, la physicochimie, l'évaluation *in vivo*, l'imagerie, etc. Il fait également appel aux notions de radiopharmaceutiques, vectorisation et ciblage. Ce chapitre rappelle rapidement ces notions générales et présente un état de l'art synthétique du domaine permettant de positionner le projet dans le contexte actuel.

A. Les radioisotopes pour l'imagerie et le théranostique

Les principaux radioisotopes utilisés en médecine nucléaire sont présentés dans le tableau 1. Ils se différencient par leur mode de désintégration, leur demi-vie, l'énergie des particules ou photons émis, leur méthode de production, ainsi que par leur chimie et par la radioprotection qu'ils requièrent.

Leur intérêt en médecine nucléaire dépend de leur mode de désintégration alpha (α), beta (β^+ ou β^-) et gamma (γ) et de l'énergie des particules et photons émis. Schématiquement, les émetteurs β^+ et γ sont utilisés pour l'imagerie TEP et TEMP respectivement.[2,3,4,5] Les émetteurs β^- et α pour la radiothérapie interne vectorisée.

Les radioisotopes utilisés dans le cadre de cette thèse sont le ^{18}F pour la TEP, et les radiométaux ^{111}In et ^{177}Lu pour respectivement la TEMP et la radiothérapie.

[2] Anderson, C. J.; Welch, M. J. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (9), 2219–2234.
[3] Pichler, V.; Berroterán-Infante, N.; Philippe, C.; Vraka, C.; Klebermass, E.-M.; Balber, T.; Pfaff, S.; Nics, L.; Mitterhauser, M.; Wadsak, W. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (9), 1350–1354.
[4] Boros, E.; Packard, A. B. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 870–901.
[5] James, M. L.; Gambhir, S. S. *Physiol. Rev.* **2012**, *92* (2), 897–965.

Atome	$t_{1/2}$	Emission (%)	Energie E_{max} (keV)	Parcours libre maximal dans l'eau (mm)	Application	Production
^{11}C	20 min	β^+	981	4,1	Imagerie TEP	Cyclotron
^{13}N	10 min	β^+	1199	1,8	Imagerie TEP	Cyclotron
^{15}O	2 min	β^+	1732	3,0	Imagerie TEP	Cyclotron
^{18}F	2 h	β^+	635	2,4	Imagerie TEP	Cyclotron
^{64}Cu	13 h	β^-	653	1,4	Imagerie TEP	Cyclotron
^{68}Ga	1 h	β^+	1899	8,2	Imagerie TEP	Générateur
^{89}Zr	3 j	β^+	900	3,8	Imagerie TEP	Cyclotron
^{90}Y	3 j	β^-	2250	11,0	Thérapie	Générateur
^{99m}Tc	6 h	γ	140	-	Imagerie TEMP	Générateur
^{111}In	3 j	γ	245	-	Imagerie TEMP	Cyclotron
^{123}I	13 h	γ	159	-	Imagerie TEMP	Cyclotron
^{131}I	8 j	γ	364	-	Thérapie	Générateur
^{177}Lu	7 j	β^-	498	2,0	Imagerie TEMP Thérapie	Réacteur nucléaire
^{188}Rh	17 h	β^-	2120	10,0	Thérapie	Générateur
^{211}At	7 h	α	7500	0,07	Thérapie	Cyclotron
^{212}Bi	1 h	α	8800	0,04-0,1	Thérapie	Générateur
^{213}Bi	46 min	α	8400	0,04-0,1	Thérapie	Générateur
^{223}Ra	11 j	α	7600	0,06	Thérapie	Générateur
^{225}Ac	10 j	α	8400	0,07	Thérapie	Cyclotron

Tableau 1 : Principaux radionucléides pour l'imagerie et la thérapie.[4]

Quelle que soit l'application, imagerie ou thérapie, les radioisotopes doivent être incorporés sur un vecteur spécifique pour être acheminés spécifiquement sur leur cible moléculaire. Cette incorporation fait appel au radiomarquage et à la radiochimie qui dépend de la nature du radioisotope et du vecteur (petite molécule hétérocyclique, sucre, nucléoside, peptide, protéine, glycoprotéine, anticorps, nanoparticule, etc.), et conduit à la molécule radioactive (appelé radiotraceur dans le cas des applications en imagerie). Ces molécules radioactives peuvent ensuite obtenir une autorisation de mise sur le marché est devient alors des médicaments, appelées radiopharmaceutiques. La médecine nucléaire est basée sur

l'injection, le plus souvent par voie iv, du radiopharmaceutique chez le patient, et sur son devenir *in vivo*.

Le fluor-18 est considéré comme le radioisotope le plus avantageux pour l'imagerie TEP en raison de ses propriétés physiques. En effet, sa demi-vie de 2 h environ est suffisamment longue pour permettre son utilisation dans des délais acceptables pour sa radiochimie et pour les examens d'imagerie, et suffisamment courte pour l'innocuité vis-à-vis du patient. Sa pureté d'émission β^+ (≈97%) est un atout pour la sensibilité. L'énergie cinétique faible du positon émis lui confère le parcours le plus court dans la matière avant de rencontrer l'électron et donc induit la meilleure résolution spatiale. Cependant, il nécessite un cyclotron pour sa production, nécessitant un personnel cyclotroniste compétent et une infrastructure lourde à maintenir. Le gallium-68 présente l'avantage de pouvoir être produit à partir d'un générateur de moindre coût de fonctionnement et de plus grande disponibilité qu'un cyclotron. Toutefois, ses propriétés physiques (demi-vie courte de 68 min, énergie du positon émis élevée de 1890 keV et parcours libre maximal dans l'eau de 8,2 mm) sont moins favorables pour l'imagerie TEP. Le gallium-68 est ainsi 3 fois plus irradiant que le fluor-18. Les demi-vies d'environ 1 h et 2 h pour le ^{18}F et le ^{68}Ga, ne permettent pas de les exploiter pour l'élaboration de radiopharmaceutiques dont la pharmacocinétique est au-delà de quelques heures, comme les anticorps dont la pharmacocinétique peut être de plusieurs jours. L'^{111}In qui possède une demi-vie longue de 2,8 j est en ce sens approprié. Le ^{177}Lu constitue à l'heure actuelle un radioisotope primordial pour la radiothérapie interne vectorisée.

B. Imageries TEMP et TEP[5]

Le principe de l'imagerie TEP est basé sur la détection, à l'extérieur de la matière, par une série de détecteurs disposés en couronne, de deux photons gamma (γ) de haute énergie (511 keV) et diamétralement opposés résultant de l'annihilation du positon (β^+) émis par le radionucléide avec un électron (Figure 1). Des images 2D et 3D peuvent être ensuite reconstituées informatiquement. La TEP est caractérisée par une très bonne sensibilité temporelle mais une faible résolution spatiale (en 2005 : 4-7 mm pour les imageurs cliniques, ~1.5 mm pour les imageurs précliniques).[6,7,8]

La Tomographie par émission monophotonique utilise des radioisotopes émetteurs d'un seul photon gamma (γ). Ces derniers doivent être d'énergie suffisante pour traverser le corps du patient et être détectés par la caméra équipée d'un collimateur (Figure 1). Le collimateur ne laisse passer que les rayons parallèles, pour délimiter les points d'émission des photons. La caméra tourne autour du patient afin d'obtenir, après reconstitution informatique, des images 3D de l'organe étudié. Sa résolution spatiale est légèrement plus faible que celle de la TEP.

[6] Ziegler, S. I. *Nucl. Phys. A* **2005**, *752* (1), 679–687.
[7] Levin, C. S. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2005**, *32* (2), S325–S345.
[8] L. Pimlott, S.; Sutherland, A. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (1), 149–162.

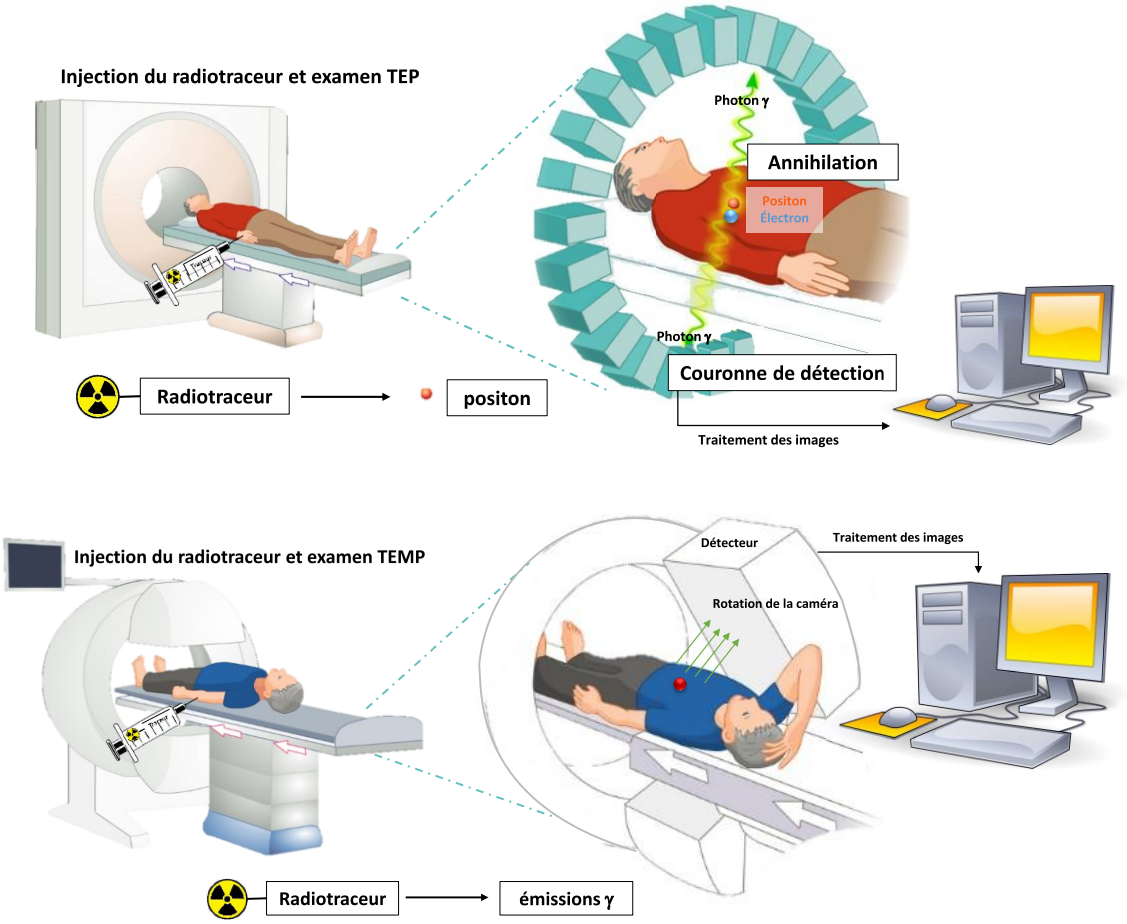


Figure 1 : Principe des imageries TEP et TEMP.[5]

Les imageries TEP et TEMP sont toutes les deux des imageries fonctionnelles et moléculaires. Une imagerie anatomique (IRM ou CT) est nécessaire pour fusionner les images issues de la TEP ou TEMP avec les images anatomiques afin de localiser parfaitement et précisément les signaux radioactifs sur les organes.

C. Radiothérapie vectorisée

La radiothérapie (RT) est une des méthodes utilisées comme acte médical dans le traitement des cancers. Ce traitement utilise les effets des rayonnements ionisants sur une cible biologique, les cellules tumorales. Quand ce faisceau de rayonnements ionisants traverse la cible, une partie de son énergie est transmis à elle en fonction de leurs natures et des propriétés de celle-ci des effets déterministes, tels que la destruction cellulaire, peuvent apparaitre. Ces effets sont recherchés tout en maintenant un niveau d'irradiation des organes ou des tissus sains environnants à un niveau le plus faible possible. Selon l'origine de l'irradiation, la radiothérapie peut être distinguée en plusieurs catégories (Figure 2).

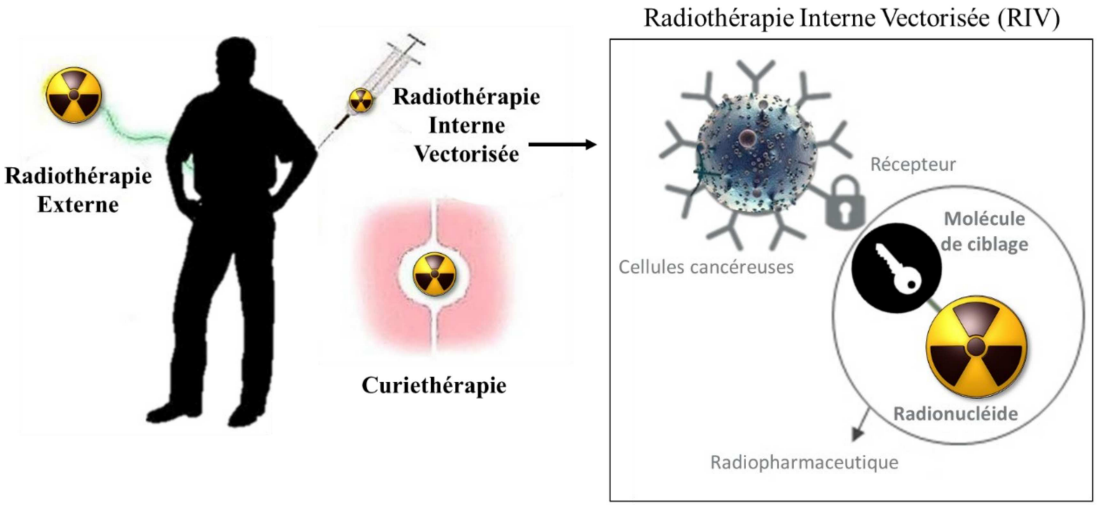


Figure 2: Différentes catégories de thérapies selon l'origine et le scellement.

La radiothérapie externe (RTE) utilise des sources de rayonnements externe à l'organisme (tels que des rayons X, des électrons, des neutrons, des protons ou des particules lourdes), tandis que la radiothérapie interne (RTI) utilise des sources radioactives internes. Parmi les sources internes, la distinction se fait sur le scellement de celle-ci. Une source interne scellée, immobilisée dans une matrice solide, est appelée la curiethérapie, tandis qu'une source interne non scellée est appelée la radiothérapie vectorisée (RTV). La RTV est un traitement systémique utilisant un radionucléide mobile dans l'organisme et porté par un vecteur biologique ciblant spécifiquement la cible tumorale. Elle dépend principalement de lui. Ce vecteur conditionne sa vitesse de déplacement dans le corps et son accès spatial à celui-ci. La RTV reste donc une technique complexe qui n'a pas le même niveau d'exactitude, concernant la quantité d'énergie par unité de masse ou dosimétrie, que la radiothérapie externe ou la curiethérapie.[9] Selon la nature du vecteur biologique, la radiothérapie interne vectorisée peut se distinguer en deux sous catégories : soit la radiothérapie métabolique (RTM) ou soit la radioimmunothérapie (RIT). Pour la première, la radiothérapie métabolique utilise des vecteurs qui participent au métabolisme interne des cellules de la région cible. Dans la seconde, la radioimmunothérapie se sert d'anticorps monoclonaux marqués par un radionucléide pour se fixer aux antigènes membranaires présents à la surface des cellules cibles. Ce concept est apparu pour la première fois en 1957 par Ehrlich *et al.*[10] Depuis, cette approche devient de plus en plus importante en médecine nucléaire, notamment après quelques succès prometteurs dans des applications cliniques.[11]

[9] Wilder, R. B.; Shen, S.; DeNardo, G. L. *Cancer Biother. Radiopharm.* **1999**, *14* (2), 67–70.
[10] Ehrlich, P. *Croonian Lecture* **1957**, *2* (1), 178–195. ; Ehrlich, P. *Proc. R. Soc. Lond.* **1900**, *66* (1), 424–448.
[11] Bournaud, C.; Lombard-Bohas, C.; Habouzit, V.; Carlier, T.; Hindié, E.; Ansquer, C. *Med. Nucleaire* **2019**, *43* (3), 251–266.

D. Radiopharmaceutiques pour la médecine nucléaire

Comme déjà évoqué ci-avant, les radiopharmaceutiques rencontrés en médecine nucléaire présente une grande diversité structurale (Tableau 2). Le [^{18}F]FDG (fluorodésoxyglucose) est surement le radiopharmaceutique le plus connu et le plus utilisé en clinique. C'est un marqueur métabolique qui permet de visualiser la consommation du glucose particulièrement active dans les cellules cancéreuses. Les TEP-[^{18}F]FDG sont utilisées comme examen de première intention en cas de suspicion de cancers et de suivi de traitement. Le [^{18}F]FDG, analogue du glucose, est une molécule de petite taille, mais toutes les structures et les tailles (petite molécule hétérocyclique, sucre, nucléoside, peptide, protéine, glycoprotéine, anticorps, nanoparticule, etc.) sont rencontrées dans les radiopharmaceutiques.

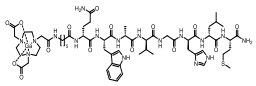
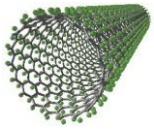
Type	Petites molécules	Peptide	Fragments de protéine	Aptamer	Anticorps	Nanoparticules
Taille	<1 nm	1-4 nm	1-100 nm			1-100 nm
Masse	< 0,5 kDa	0,5-2 kDa	5-10 kDa	5-15 kDa	150 kDa	-
Exemples	L1 [^{18}F]FDG	 L2 [^{68}Ga]Ga-NOTA-Aca-BBN(7-14)	[^{68}Ga]Ga-DOTA-MUT-DS	Molécule beacon	Trastuzumab	 RGD-SWNt

Tableau 2 : Différents types de composés radioactifs en fonction de leur taille (adapté de James et al).[5]

E. Radiochimie du fluor-18

Le fluor-18 est présent sous deux formes en radiochimie : la forme électrophile [^{18}F]F_2 (très peu utilisée) et la forme nucléophile [^{18}F]F^- (majoritairement utilisée). Nous avons choisi de ne présenter dans ce manuscrit que la forme la plus utilisée dans la littérature. La production du fluor-18 est principalement réalisée par irradiation d'une cible d'eau enrichie en oxygène-18 par un faisceau de protons de 18 MeV selon la réaction nucléaire $^{18}O(p,n)^{18}F$. Il est alors obtenu sous forme d'anion [^{18}F]fluorure avec une haute radioactivité spécifique (74-370 GBq/µmole) et une pureté radiochimique supérieur à 98%. L'ion fluorure [^{18}F]F^- ainsi obtenu est en solution dans l'eau enrichie en oxygène-18 par plusieurs sphères de solvatation diminuant significativement sa nucléophilie (Figure 3). Avant d'engager une réaction de marquage, une étape de purification et de « séchage » est réalisée.[12] Le protocole usuel consiste à fixer les ions fluorures [^{18}F]F^- sur une résine QMA (méthyl ammonium quaternaire) échangeuse d'anions,[13] puis à éluer les ions fluorures [^{18}F]F^- en général avec un mélange CH_3CN/H_2O contenant une base (K_2CO_3, Cs_2CO_3 ou $TBAHCO_3$).[14] Le séchage est réalisé par distillation azéotropique du mélange CH_3CN/H_2O sous flux d'azote. Les ions fluorures [^{18}F]F^- séchés sont ensuite mis en

[12] Guillaume, M.; Luxen, A.; Nebeling, B.; Argentini, M.; Clark, J. C.; Pike, V. W. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. A. Appl. Radiat. Isot.* **1991**, *42* (8), 749–762.
[13] Stimson, D. H. R.; Qiao, Z.; Reutens, D. C.; Venkatachalam, T. K.; Bhalla, R. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **2019**, *62* (9), 588–595.
[14] Verhoog, S.; Brooks, A.; Mossine, A.; Sanford, M.; Scott, P. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (1), 1064–1064.

réaction avec le précurseur et les réactifs de marquage dans un solvant aprotique (DMF, CH_3CN ou DMSO).

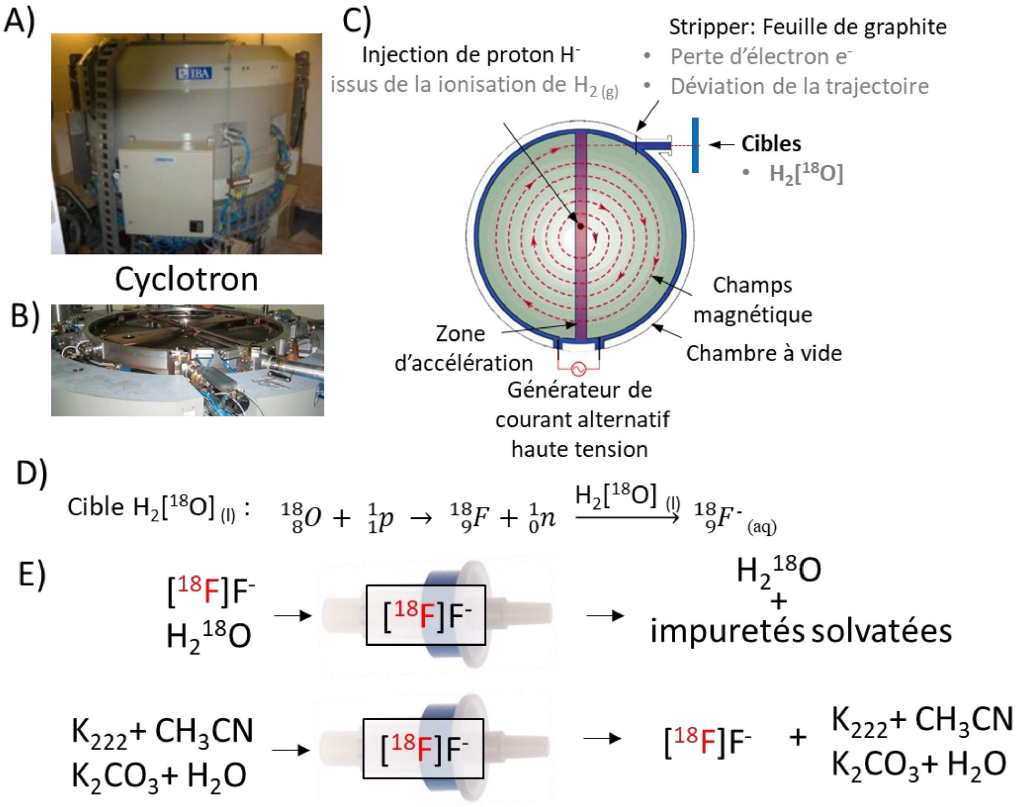
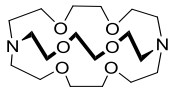


Figure 3: Production du fluor-18 par cyclotron en A) et B) selon le principe de fonctionnement en C) régit par la réaction nucléaire D) et la purification des fluorures en E).

La réactivité des ions fluorures $[^{18}F]F^-$ est également dépendante de la nature de son contre-ion. Ainsi, plus le cation est volumineux (cas du césium Cs et du rubidium Rb), plus il est mou selon la théorie HSAB, meilleure est la nucléophilie de l'ion fluorure. Il en est de même pour le fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) très réactif. Le TBAF a aussi la particularité d'avoir un cation possédant des chaines alcanes favorisant sa solubilité dans un solvant aprotique (DMF, CH_3CN ou DMSO) et donc le marquage. Dans le cas du $[^{18}F]KF$ le plus souvent utilisé, un agent cryptant est ajouté au milieu pour améliorer la solubilité des fluorures dans les milieux aprotiques et augmenter leur nucléophilie. Cet agent cryptant est un complexant qui est capable de piéger le contre ion K^+. Le plus utilisé est le 4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosane, appelé Kryptofix® ou K_{222} (Schéma 2).[15]

[15] Jewett, D. M.; Toorongian, S. A.; Mulholland, G. K.; Watkins, G. L.; Kilbourn, M. R. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. A. Appl. Radiat. Isot.* **1988**, *39* (11), 1109–1111.



L3
Kryptofix® ($K_{2.2.2}$)

Schéma 2 : Exemple d'agents cryptants.

Le marquage au fluor-18 (Schéma 3) en série aliphatique est généralement réalisé par réaction de substitution nucléophile d'ordre 2 (SN_2)[16] à partir d'un substrat portant un groupe nucléofuge tel qu'un ester sulfonique (tosylate,[17] nosylate,[18,19] triflate,[20] mésylate[21]) ou un halogène (I, Br ou Cl).[22] Les réactions sont réalisées dans un solvant polaire aprotique (CH_3CN, DMSO ou DMF) à des températures comprises entre 80 et 110 °C pendant 5 à 30 min comme dans la synthèse du [^{18}F]FDG,[20] [^{18}F]FMISO[23] ou [^{18}F]FCH.[24] En série aromatique, la radiofluoration est réalisée à partir de substrats possédant un bon groupe partant (GP) comme un groupe triméthylammonium ($^{+}NMe_3$),[25] nitro (NO_2).[26] La présence d'un groupement électroattracteur (EWG) en position ortho ou para du nucléofuge est obligatoire pour que la réaction de substitution soit efficace, ce groupe permettant d'appauvrir en électron le cycle aromatique suivant l'ordre : NO_2 > CF_3 > CN > CHO > COR > CO_2R, et en stabilisant le complexe de Meisenheimer par délocalisation des charges.[16,27] La présence d'un groupe électroattracteur n'est pas indispensable dans le cas de substrats hétéroaromatiques π-déficients, par exemple pyridiniques. Plus récemment, les précurseurs diaryliodonium[28,29] ou ylures[30,31] ont été introduits (Schéma 4). Ces derniers se sont révélés très réactifs sans présence de groupes électroattracteurs, et leur radiofluoration est devenue courante. La radiofluoration en série aromatique est habituellement réalisée dans un solvant polaire aprotique (DMSO ou DMF) à des températures comprises entre 100 et 170 °C pendant 10 à 30 min. Enfin, les groupes comme Gouverneur *et al*,[32] Scott *et al*,[33] ou Ritter *et al* [34] ont décrit le radiomarquage au fluor-18 de substrats aromatiques par chimie organométallique à partir de précurseurs halogénés ou boroniques (Schéma 4).[35]

---

[16] Dollé, F.; Roeda, D.; Kuhnast, B.; Lasne, M. *Fluorine and Health*; Tressaud, A., Ed.; Elsevier: Amsterdam, **2008**; 3–65.
[17] Mukherjee, J.; Yang, Z.-Y.; Das, M. K.; Brown, T. *Nucl. Med. Biol.* **1995**, *22* (3), 283–296.
[18] Grierson, J. R.; Shields, A. F. *Nucl. Med. Biol.* **2000**, *27* (2), 143–156.
[19] Oh, S. J.; Mosdzianowski, C.; Chi, D. Y.; Kim, J. Y.; Kang, S. H.; Ryu, J. S.; Yeo, J. S.; Moon, D. H. *Nucl. Med. Biol.* **2004**, *31* (6), 803–809.
[20] Hamacher, K.; Coenen, H. H.; Stöcklin, G. *J. Nucl. Med.* **1986**, *27* (2), 235–238.
[21] Park, H. K.; Kim, J. S.; Im, K. C.; Oh, S. J.; Kim, M. J.; Lee, J.-H.; Chung, S. J.; Lee, M. C. *J. Mov. Disord.* **2009**, *24* (2), 237–245.
[22] Ermert, J. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014* (1), e812973–e812989.
[23] Kämäräinen, E.-L.; Kyllönen, T.; Nihtilä, O.; Björk, H.; Solin, O. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **2004**, *47* (1), 37–45.
[24] DeGrado, T. R.; Baldwin, S. W.; Wang, S.; Orr, M. D.; Liao, R. P.; Friedman, H. S.; Reiman, R.; Price, D. T.; Coleman, R. E. *J. Nucl. Med.* **2001**, *42* (12), 1805–1814.
[25] Dollé, F.; Dolci, L.; Valette, H.; Hinnen, F.; Vaufrey, F.; Guenther, I.; Fuseau, C.; Coulon, C.; Bottlaender, M.; Crouzel, C. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (12), 2251–2259.
[26] Kilbourn, M. R.; Welch, M. J.; Dence, C. S.; Tewson, T. J.; Saji, H.; Maeda, M. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1984**, *35* (7), 591–598.
[27] Angelini, G.; Speranza, M.; Wolf, A. P.; Shiue, C.-Y. *J. Fluorine Chem.* **1985**, *27* (2), 177–191.
[28] Ross, T. L.; Ermert, J.; Hocke, C.; Coenen, H. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (25), 8018–8025.
[29] Pike, V. W.; Aigbirhio, F. I. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, *21* (1), 2215–2216.
[30] 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.
[31] 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. A Facile *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (12), 5222–5227.
[32] Brown, J. M.; Gouverneur, V. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2009**, *48* (46), 8610–8614.
[33] Mossine, A. V.; Brooks, A. F.; Makaravage, K. J.; Miller, J. M.; Ichiishi, N.; Sanford, M. S.; Scott, P. J. H. *Org. Lett.* **2015**, *17* (23), 5780–5783.
[34] R. Brandt, J.; Lee, E.; B. Boursalian, G.; Ritter, T. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (1), 169–179.
[35] Littich, R.; Scott, P. J. H. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2012**, *51* (5), 1106–1109.

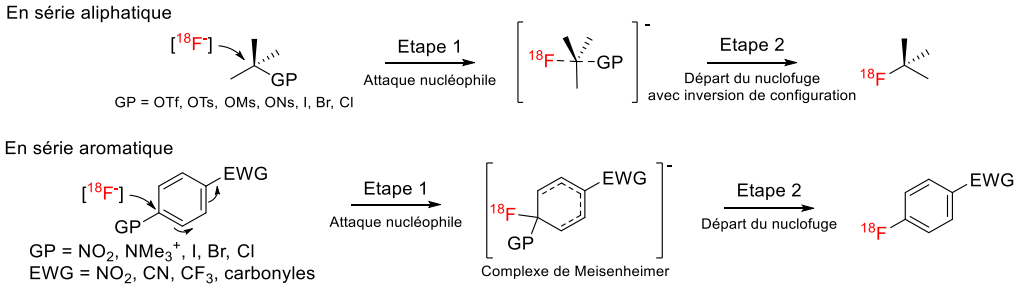


Schéma 3: Type de marquage au fluor-18 nucléophile.

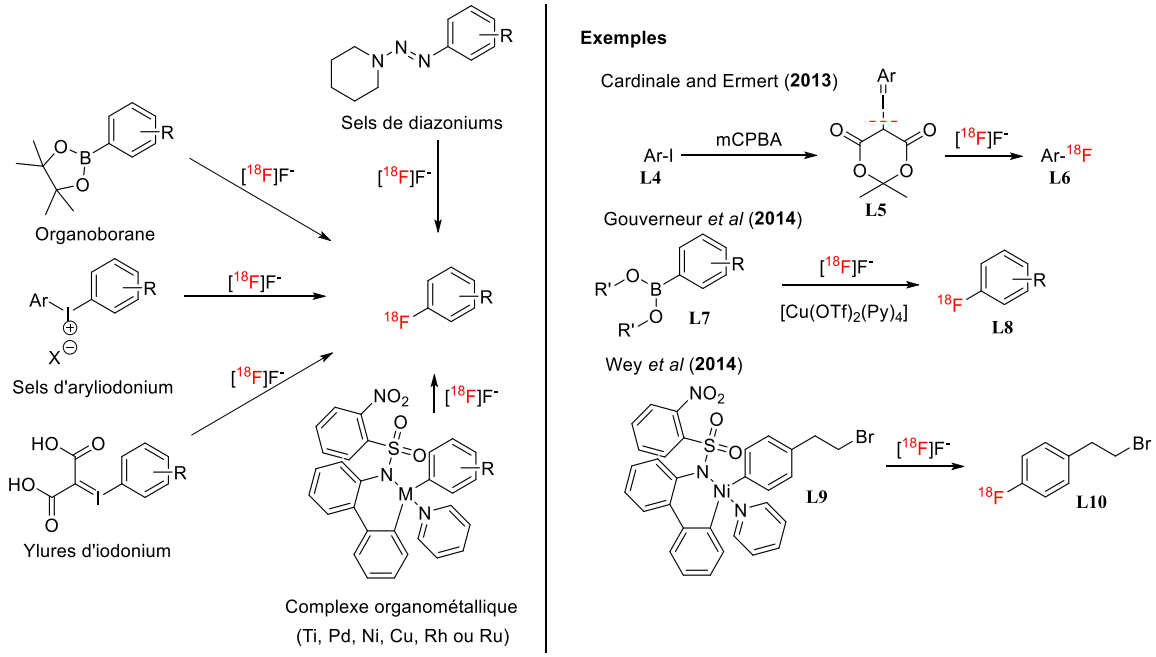


Schéma 4: Quelques exemples d'autres types de fluorations nucléophiles en série aromatiques.[32,36,37]

La figure 4 présente quelques exemples de radiotraceurs marqués au fluor-18 utilisés en clinique et obtenus selon les méthodes énoncées ci-dessus : [^{18}F]FDG,[20] 6-[^{18}F]fluoro-L-DOPA ([^{18}F]DOPA),[38,39] [^{18}F]fluoroestradiol ([^{18}F]FES),[40] [^{18}F]fluorocholine ([^{18}F]FCH),[41,42] [^{18}F]fluoroéthyltyrosine ([^{18}F]FET),[43] [^{18}F]fluorothymidine ([^{18}F]FLT).[44]

[36] Cardinale, J.; Ermert, J. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54* (16), 2067–2069.
[37] Ren, H.; Wey, H.-Y.; Strebl, M.; Neelamegam, R.; Ritter, T.; Hooker, J. M. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5* (7), 611–615.
[38] Garnett, E. S.; Firnau, G.; Nahmias, C. *Nature* **1983**, *305* (5930), 137–138.
[39] Dolle, F.; Demphel, S.; Hinnen, F.; Fournier, D.; Vaufrey, F.; Crouzel, C. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **1998**, *41* (2), 105–114.
[40] Liao, G. J.; Clark, A. S.; Schubert, E. K.; Mankoff, D. A. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57* (8), 1269–1275.
[41] Vali, R.; Loidl, W.; Pirich, C.; Langesteger, W.; Beheshti, M. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2015**, *5* (2), 96–108.
[42] Kluijfhout, W. P.; Vriens, M. R.; BorelRinkes, I. H. M.; de Keizer, B. *Ned. Tijdschr. Geneeskd.* **2021**, *165* (1), D5468–D5478.
[43] Weber, D. C.; Zilli, T.; Buchegger, F.; Casanova, N.; Haller, G.; Rouzaud, M.; Nouet, P.; Dipasquale, G.; Ratib, O.; Zaidi, H.; Vees, H.; Miralbell, R. *Radiat. Oncol.* **2008**, *3* (1), 44–55.
[44] Nikaki, A.; Angelidis, G.; Efthimiadou, R.; Tsougos, I.; Valotassiou, V.; Fountas, K.; Prasopoulos, V.; Georgoulias, P. *Ann. Nucl. Med.* **2017**, *31* (7), 495–505.

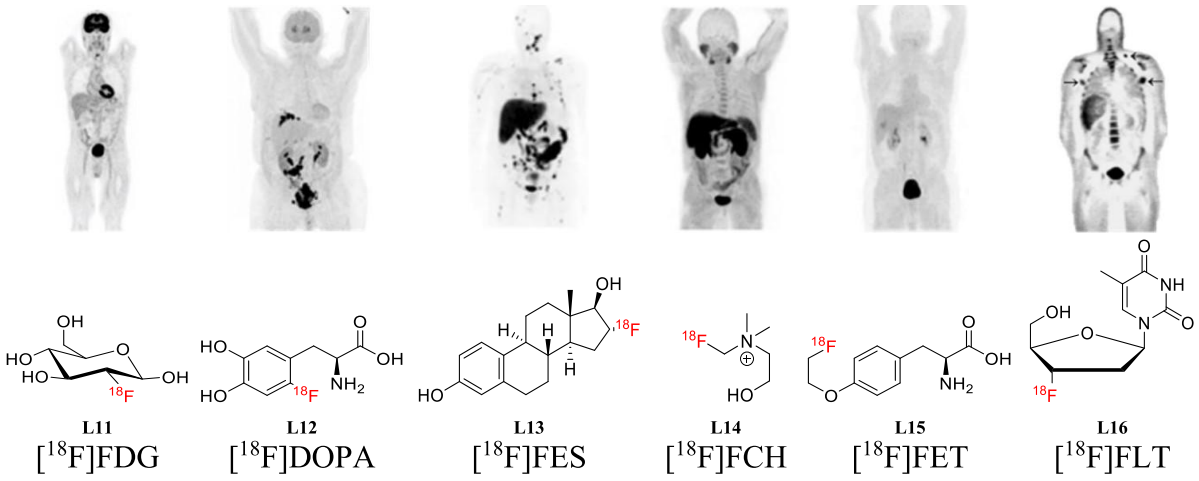


Figure 4: Radiotraceurs au fluor-18 couramment utilisés en TEP et l'image TEP associée chez l'homme atteint de métastases.

Les conditions de radiofluoration qui conduisent à la création de liaisons C-^{18}F sont souvent incompatibles avec des fonctions chimiques sensibles à la température élevée ou aux conditions basiques, ainsi qu'avec la présence de fonctions protonées (alcool, amines acide).[35,45,46,47,48,49] Dans les dernières années, ont été développées les radiofluorations par formation de liaison hétéroatome - fluor-18[50,51] (B-^{18}F,[52,53] Si-^{18}F,[54] Al-^{18}F,[55] Ga-^{18}F[56]). Les conditions sont parfois plus douces (température moins élevées) et compatibles en milieu aqueux. Gauthier *et al* ont écrit une revue détaillant l'évolution de cette chimie aux cours des dernières décennies.[57] Cependant, les liaisons hétéroatome-^{18}F peuvent être facilement hydrolysables.[55,58]

Malgré la diversité de la radiochimie du fluor-18, le radiomarquage de molécules reste un challenge.[59,60,61]

[45] Glaser, M.; Luthra, S. K.; Brady, F. *Int. J. Oncol.* **2003**, *22* (2), 253–267.
[46] Kettenbach, K.; Schieferstein, H.; Ross, T. L. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014* (1), e361329-e361346.
[47] Jacobson, O.; Kiesewetter, D. O.; Chen, X. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26* (1), 1–18.
[48] Campbell, M. G.; Mercier, J.; Genicot, C.; Gouverneur, V.; Hooker, J. M.; Ritter, T. *Nat. Chem.* **2017**, *9* (1), 1–3.
[49] Nerella, S. G.; Bhattacharya, A.; Thacker, P. S.; Tulja, S. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2022**, *32* (4), 455–473.
[50] Chansaenpak, K.; Vabre, B.; Gabbaï, F. P. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (4), 954–971.
[51] Lin, K.-S.; Benard, F.; Perrin, D. M. *Fluorine in Life Sciences: Pharmaceuticals, Medicinal Diagnostics, and Agrochemicals*; Haufe, G., Leroux, F. R., Eds.; Progress in Fluorine Science; Academic Press, **2019**, 519–549.
[52] Nelissen, N.; Laere, K. V.; Thurfjell, L.; Owenius, R.; Vandenbulcke, M.; Koole, M.; Bormans, G.; Brooks, D. J.; Vandenberghe, R. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50* (8), 1251–1259.
[53] Quintela-Fandino, M.; Lluch, A.; Manso, L.; Calvo, I.; Cortes, J.; García-Saenz, J. A.; Gil-Gil, M.; Martinez-Jánez, N.; Gonzalez-Martin, A.; Adrover, E.; de Andres, R.; Viñas, G.; Llombart-Cussac, A.; Alba, E.; Guerra, J.; Bermejo, B.; Zamora, E.; Moreno-Anton, F.; Pernas Simon, S.; Carrato, A.; Lopez-Alonso, A.; Escudero, M. J.; Campo, R.; Carrasco, E.; Palacios, J.; Mulero, F.; Colomer, R. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23* (6), 1432–1441.
[54] Wängler, C.; Kostikov, A.; Zhu, J.; Chin, J.; Wängler, B.; Schirrmacher, R. *Appl. Sci.* **2012**, *2* (2), 277–302.
[55] Archibald, S. J.; Allott, L. *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2021**, *6* (1), 30–58.
[56] Way, J.; Wuest, F. *Nucl. Med. Biol.* **2013**, *40* (3), 430–436.
[57] Bernard-Gauthier, V.; Lepage, M. L.; Waengler, B.; Bailey, J. J.; Liang, S. H.; Perrin, D. M.; Vasdev, N.; Schirrmacher, R. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (4), 568–572.
[58] Bohn, P.; Deyine, A.; Azzouz, R.; Bailly, L.; Fiol-Petit, C.; Bischoff, L.; Fruit, C.; Marsais, F.; Vera, P. *Nucl. Med. Biol.* **2009**, *36* (8), 895–905.
[59] Aluicio-Sarduy, E.; Ellison, P. A.; Barnhart, T. E.; Cai, W.; Nickles, R. J.; Engle, J. W. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **2018**, *61* (9), 636–651.
[60] Pretze, M.; Pietzsch, D.; Mamat, C. *Molecules* **2013**, *18* (7), 8618–8665.
[61] Ishikawa, E. *Immunoassay*; Diamandis, E. P., Christopoulos, T. K., Eds.; Academic Press: San Diego, **1996**, 191–204.

F. Marquage avec les radiométaux

Le marquage avec les radiométaux s'effectue par complexation et non pas par formation de liaison covalente.[62,63,64] Les chélates occupent donc une place centrale en radiochimie, et peuvent être plus adaptés à certains radionucléides qu'à d'autres.[65,66,67] Deng *et al*, ainsi que Price *et al* ont recensé les chélates en fonction du radionucléides utilisé.[66,67] Le technétium-99m est le radionucléide le plus utilisé dans les services de médecine nucléaire, devant l'indium-111, l'yttrium-90, le gallium-68[68] ou le lutétium-177.[69,70] Ces dernières années, d'autres radionucléides tels que le cuivre-64, le cuivre-67 ou encore le zirconium-89 ont émergé, élargissant la gamme de radionucléides utilisables.[69,70] Les chélates préconisés pour la complexation de ces métaux font majoritairement partie de la famille des polyamines (Schéma 5).

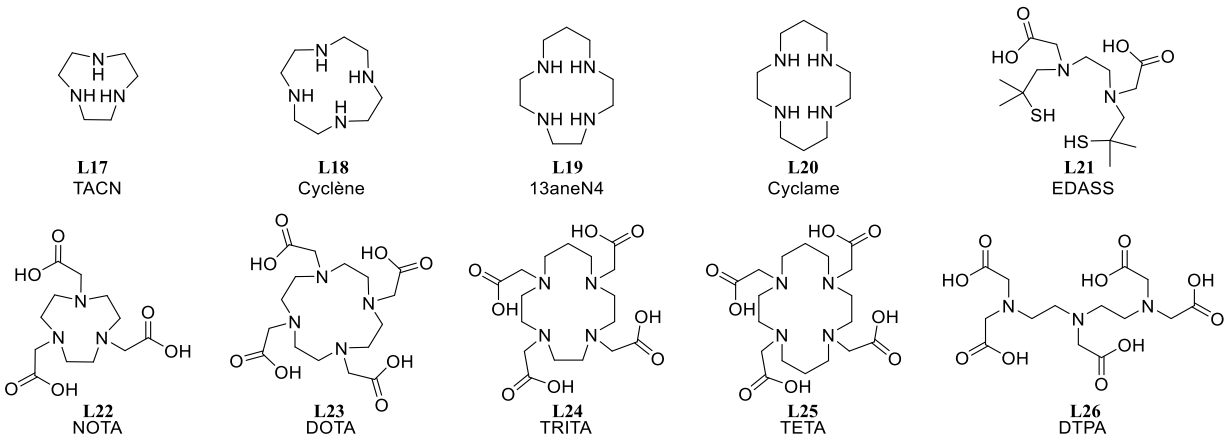


Schéma 5 : Principaux représentants de la famille des polyamines macrocycliques utilisés en radiochimie.

Par exemple, l'un des peptides les plus utilisés en médecine nucléaire dans la pathologie du cancer de la prostate, le PSMA a été marqué avec le Lu-177 par complexation avec le DOTA.[71] Le DOTA a aussi été utilisé avec succès dans une application clinique sur les gliomes pour fonctionnaliser et marquer au gallium-68 la bombésine BBN (1-27).[72] J591 est aussi utilisé dans le cancer de la prostate et comporte quant à lui un NOTA.[73] Quant au TRITA, il est plus adapté au ^{153}Sm ou ^{166}Ho.[74] Les cyclams, dont le TETA fait partie, sont couramment utilisés

[62] Talip, Z.; Favaretto, C.; Geistlich, S.; Meulen, N. P. van der. *Molecules* **2020**, *25* (4), 966–995.
[63] Kazakov, A. G.; Ekatova, T. Y.; Babenya, J. S. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2021**, *328* (2), 493–505.
[64] Do Carmo, S. J. C.; Scott, P. J. H.; Alves, F. *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2020**, *5* (1), 2–23.
[65] M. Rey, A. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17* (31), 3673–3683.
[66] Deng, H.; Wang, H.; Li, Z. *Curr. Drug Targets* **2015**, *16* (6), 610–624.
[67] Price, E. W.; Orvig, C. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *43* (1), 260–290.
[68] Pandey, M. K.; DeGrado, T. R. *Curr. Radiopharm.* **2021**, *14* (4), 325–339.
[69] Kostelnik, T. I.; Orvig, C. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 902–956.
[70] Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson, C. J. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2858–2902.
[71] Sartor, O.; de Bono, J.; Chi, K. N.; Fizazi, K.; Herrmann, K.; Rahbar, K.; Tagawa, S. T.; Nordquist, L. T.; Vaishampayan, N.; El-Haddad, G.; Park, C. H.; Beer, T. M.; Armour, A.; Pérez-Contreras, W. J.; DeSilvio, M.; Kpamegan, E.; Gericke, G.; Messmann, R. A.; Morris, M. J.; Krause, B. J. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385* (12), 1091–1103.
[72] Zhang, J.; Li, D.; Lang, L.; Zhu, Z.; Wang, L.; Wu, P.; Niu, G.; Li, F.; Chen, X. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57* (1), 9–14.
[73] Vallabhajosula, S.; Kuji, I.; Hamacher, K. A.; Konishi, S.; Kostakoglu, L.; Kothari, P. A.; Milowski, M. I.; Nanus, D. M.; Bander, N. H.; Goldsmith, S. J. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46* (4), 634–641.
[74] Marques, F.; Gano, L.; Campello, M. P.; Lacerda, S.; Santos, I. *Radiochim. Acta* **2007**, *95* (6), 335–341.

pour un radiomarquage au ^{64}Cu.[75,76] Ces chélates sont maintenant disponibles commercialement sous forme de réactifs N-hydroxysuccinimide (NHS) ou isothiocyanate (NCS) pour leur couplage aux vecteurs peptidiques ou protéiques (Schéma 6).

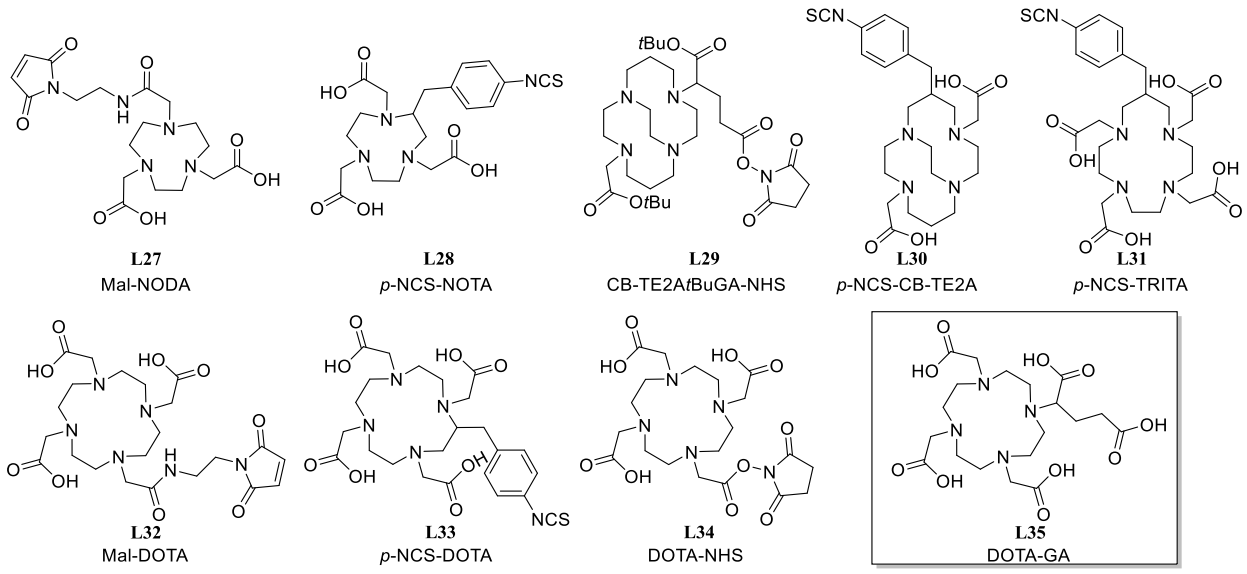


Schéma 6 : Macrocycle pré-activé généralement utilisé en radiochimie pour fonctionnaliser les molécules d'intérêts.

Quant au DOTA et NOTA, ils peuvent être fonctionnalisé d'un acide carboxylique en plus, noté DOTA-GA, pour permettre son couplage sur les composés d'intérêt au lieu de sacrifier une groupe carboxylique clés de la coordination (Schéma 6).[77]

G. Radiomarquage de biomédicaments

Le développement de biomédicaments (Tableau 2) en tant que produits radiopharmaceutiques approuvés pour la clinique est compliqué. En effet, ces vecteurs possiblement de grandes tailles (par exemple les anticorps) restent complexes à radiomarquer directement car ils sont très sensibles à la température, au pH, aux solvants ou aux réactifs.[59,60,61] Comme rappelé précédemment, les réactions de substitution nucléophile, permettant la formation d'une liaison C-^{18}F, nécessitent des conditions dures (températures élevées, conditions très basiques, solvants anhydres et aprotiques). Ces conditions dénaturent les macromolécules et sont donc difficilement compatibles avec un radiomarquage direct au fluor-18. Pour les radiométaux, cela dépendra de la température d'insertion dans le chélate qui peut aller de la température ambiante avec l'acide diéthylènetriamine-pentaacétique (DTPA) jusqu'à

[75] Cooper, G. J. S.; Young, A. A.; Gamble, G. D.; Occleshaw, C. J.; Dissanayake, A. M.; Cowan, B. R.; Brunton, D. H.; Baker, J. R.; Phillips, A. R. J.; Frampton, C. M.; Poppitt, S. D.; Doughty, R. N. *Diabetologia* **2009**, *52* (4), 715–722.
[76] Ali, S. K. I.; Khandaker, M. U.; Al-mugren, K. S.; Latif, Sk. A.; Bradley, D. A.; Okhunov, A. A.; Sulieman, A. *Appl. Radiat. Isot.* **2021**, *173* (1), 109735–109746.
[77] Ballal, S.; Yadav, M. P.; Moon, E. S.; Kramer, V. S.; Roesch, F.; Kumari, S.; Bal, C. *Pharmaceuticals* **2021**, *14* (12), 1212-1230.

des températures supérieures à 100 °C. Par exemple, la complexation de l'indium-111 ou le lutétium-177 par le DOTA est réalisée à 90 °C.[78]

1. Marquage au fluor-18 direct

De telles approches existent mais restent rares. Seulement deux méthodes de marquage direct au fluor-18 ont été trouvées dans la littérature par création de liaison C-^{18}F. L'une des méthodes implique l'ouverture d'un cycle aziridine conduisant à la formation d'un groupe aliphatique $CH_2{}^{18}F$ avec des rendements de 7 à 16%.[79] L'autre utilise la réaction de substitution nucléophile aromatique (SN_{Ar}) à partir d'un précurseur phényltriméthylammonium appauvri en électron par la présence d'un groupe cyano en ortho.[80] Les autres méthodes sont basées sur la formation d'une liaison hétéroatome-^{18}F.[81,82,83,84]

2. Marquage au fluor-18 indirect via un groupement prosthétique

L'approche est appelée « marquage prosthétique ». Elle implique deux étapes, le radiomarquage d'un réactif intermédiaire puis sa conjugaison au vecteur macromoléculaire. Le choix de la réaction de conjugaison entre le groupement prosthétique et la macromolécule est déterminant pour éviter la dénaturation de la macromolécule. Peu de réactions chimiques sont compatibles avec les fonctionnalités de la macromolécule et les conditions doivent être assez douces pour éviter de la dénaturer.

Les seules réactions de fonctionnalisation d'un peptide ou d'une protéine font intervenir les fonctions amines, acides carboxyliques et thiols qui sont très largement présentes sur les macromolécules. Ces fonctions sont respectivement couplées avec des groupes prosthétiques contenant des acides carboxyliques libres ou activés, des amines, des maléimides (réaction de thiol-Michael) et des 1,2-aminoéthanethiol (ou nitrile). Des dizaines de groupements prosthétiques sont référencés dans la littérature (Schéma 7).

[78] Gupta, S.; Batra, S.; Jain, M. *Drug Delivery System*; Jain, K. K., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer: New York, NY, **2014**, 147–157.
[79] 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.
[80] Becaud, J.; Mu, L.; Karramkam, M.; Schubiger, P. A.; Ametamey, S. M.; Graham, K.; Stellfeld, T.; Lehmann, L.; Borkowski, S.; Berndorff, D.; Dinkelborg, L.; Srinivasan, A.; Smits, R.; Koksch, B. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20* (12), 2254–2261.
[81] Schirrmacher, R.; Bradtmöller, G.; Schirrmacher, 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.
[82] Ting, R.; Adam, M. J.; Ruth, T. J.; Perrin, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (38), 13094–13095.
[83] Liu, Z.; Pourghiasian, M.; Radtke, M. A.; Lau, J.; Pan, J.; Dias, G. M.; Yapp, D.; Lin, K.-S.; Bénard, F.; Perrin, D. M. *Angew. Chem.* **2014**, *126* (44), 12070–12074.
[84] 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.

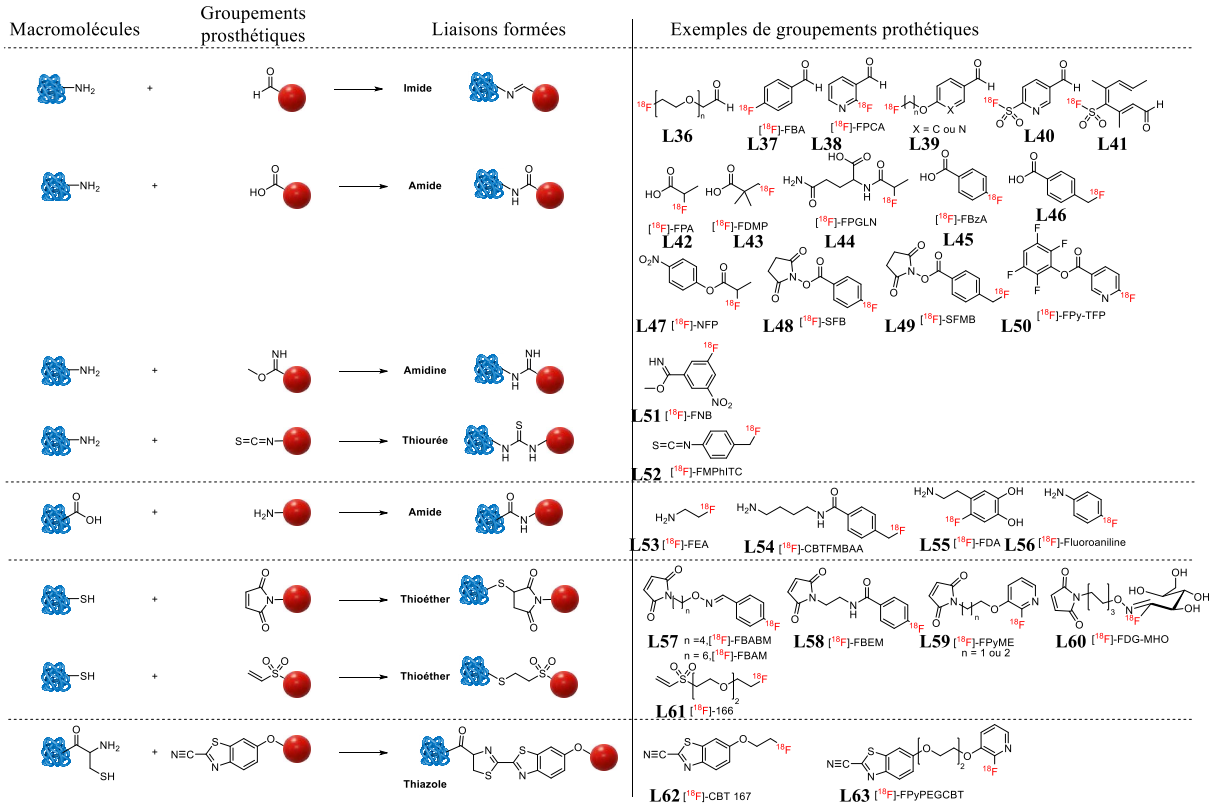


Schéma 7: Groupements prosthétiques les plus utilisés en fluor-18 par réactivité.

Parmi ces réactions, la réaction de Michael entre la cystéine et la maléimide, ainsi que la réaction entre une lysine et l'isothiocyanate sont les plus utilisées. Elles constituent les réactions des méthodes conventionnelles de marquage de protéines ou anticorps. La réaction entre une cystéine et un dithiol, ainsi que la réaction entre une lysine et un N-hydroxysuccinimide (NHS) sont aussi couramment utilisées.[85]

Plus récemment, le groupe de Wu a développé la vinyle-sulfone radiofluorée, un nouveau groupement prosthétique offrant de nouvelles stratégies de marquage indirect par couplage avec les amines, les thiols et les alcools.[57,86] Plusieurs groupements prosthétiques marqués par création de liaison hétéroatome – ^{18}F ont également été développés (Schéma 8).

[85] McKay, C. S.; Finn, M. G. *Chem. Biol.* **2014**, *21* (9), 1075–1101.
[86] 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.

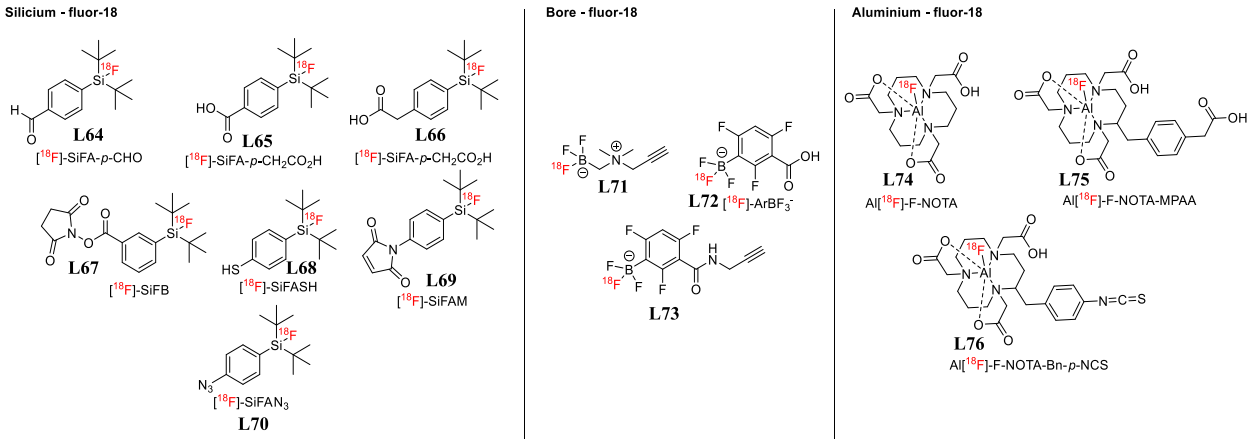


Schéma 8: Exemples de groupements prosthétiques appliqués aux liaisons hétéroatomes - fluor- 18.

L'ensemble de ces différents groupements prosthétiques offrent une multitude de stratégies de marquages des macromolécules en relation avec la réaction de bioconjugaison impliquée.

H. Chimie « click » appliquée aux marquages de macromolécules

En 2001, Sharpless *et al* introduisent le concept de chimie « click » définissant les critères de la réaction idéale (Figure 5).[87] Cette réaction doit utiliser des réactifs facilement disponibles, avoir des conditions de réaction simples (idéalement insensible à l'oxygène et à l'eau), utiliser aucun solvant ou un solvant bénin (comme l'eau) ou facilement éliminable, être modulaire et facilement mise à l'échelle, donner des rendements très élevés, générer uniquement des sous-produits inoffensifs qui peuvent être éliminés facilement, et être stéréospécifique (mais pas nécessairement énantiosélectif). La purification, si nécessaire, doit être effectuée par des méthodes simple, rapide et efficace, non chromatographiques, telles que la cristallisation ou la distillation, et le produit doit être stable, même dans des conditions physiologiques.

La notion de « chimie click » reste assez subjective et englobe un grand nombre de réactions. Les réactions « click » sont toutes thermodynamiquement très favorables (avec une enthalpie de réaction supérieur à 20 kcal mol^{-1}), rapides, quantitatives et très sélectives. Les réactions de chimie « click » peuvent être regroupées dans les classes suivantes (Schéma 9) :[88]

- les cycloadditions, en particulier 1,3-dipolaires [cycloaddition entre les azotures et les alcynes catalysée au cuivre (I) (CuAAC), cycloaddition entre les azotures et les alcynes promue par tension de cycle (SPAAC), cycloaddition entre les nitrones et les alcynes promue par tension de cycle (SPANC), cycloaddition entre les sydnones et les alcynes promue par tension de cycle (SPSAC), cycloaddition entre les azotures et les alcynes

[87] Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. *Drug Discov. Today* **2003**, *8* (24), 1128–1137.
[88] Hartmuth C. Kolb, M. G. Finn, and K. Barry Sharpless, *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2001**, 40, 2004 – 2021.

catalysée au ruthénium (II) (RuAAC), cycloaddition entre les oxydes de nitrile et les alcynes (NOAC), etc] et de Diels-Alder (normale ou à demande inverse d'électron) ;

- les réactions d'ouverture de cycle hétérocycliques tendus tels que les époxydes, les aziridines, les ions aziridiniums et les ions épisulfoniums ;
- la chimie carbonyle du type « non aldol », telle que la formation d'urées, de thio-urées, d'hétérocycles aromatiques, d'éthers oximes, d'hydrazines et d'amides ;
- les transformations des liaisons carbone-carbone, en particulier les oxydations telles que l'époxydation, la dihydroxylation, l'aziridination et l'addition d'halogénure de sulfényle, ainsi que les réactions de Michael.

Figure 5 : Principe de la chimie « click ».

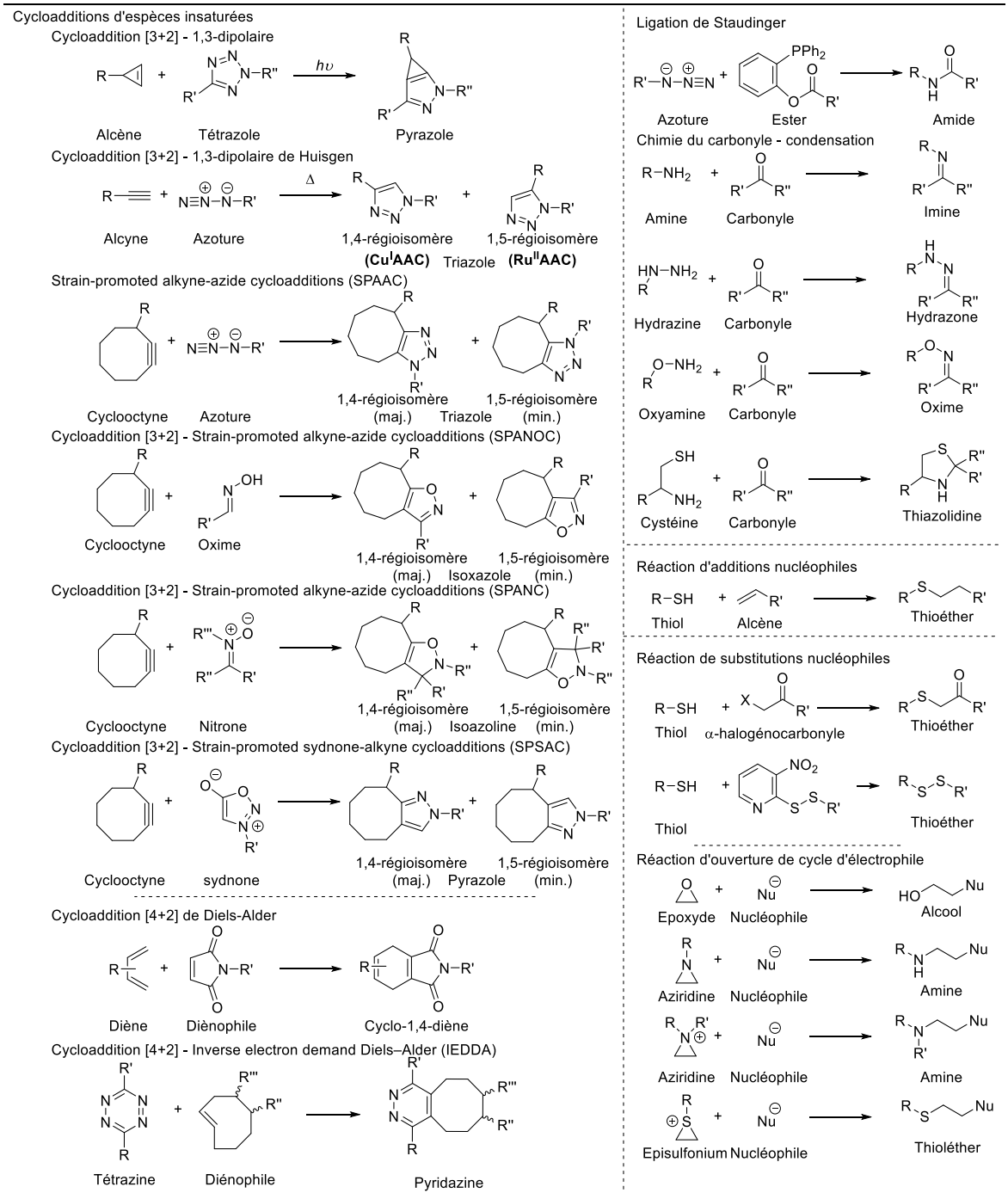


Schéma 9: Quelques exemples de réaction "click" les plus couramment utilisés dans les applications de marquages.

La cycloaddition de Huisgen 1,3-dipolaire catalysé au cuivre (également appelée CuAAC) entre un alcyne et un azoture conduisant à la formation d'un 1,2,3-triazole fait partie des réactions importantes et a été largement exploitée en chimie du fluor-18 (Schéma 10). Par exemple Marik *et al* décrivent la CuAAC entre un alcyne radiofluoré et un azidopeptide.[89] Le radiomarquage de l'alcyne est quantitatif (>98%) et la réaction CuAAC avec CuI, l'ascorbate de sodium et le DIPEA a donné des rendements entre 52 et 99%. Comme toutes les réactions

[89] Marik, J.; Sutcliffe, J. L. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (37), 6681–6684.

catalysées, cette réaction est robuste et polyvalente, mais le problème de cytotoxicité du cuivre limite son utilisation dans les systèmes biologiques. De nombreux ligands sont mis au point pour ces réactions afin de séquestrer le catalyseur et de l'empêcher de franchir les membranes cytoplasmiques. Les résultats sont encourageants pour des marquages *in vitro* mais restent inapplicables pour des applications *in vivo*. Les réactions « click » appliquées aux marquages *in vivo* s'orientent maintenant vers des approches de bioconjugaison sans catalyseur tout en conservant une très bonne cinétique.[90,91]

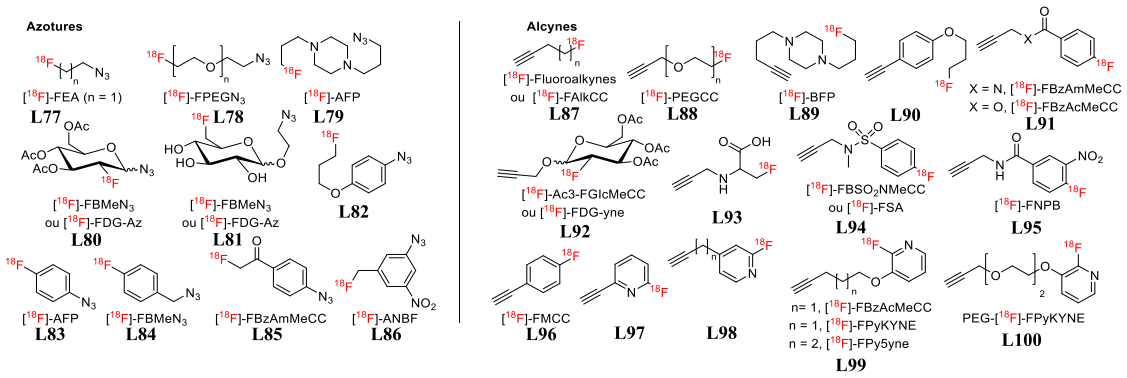


Schéma 10: Principaux groupements prosthétiques pour la CuAAC en fluor-18.

I. Application de la chimie « click » à la stratégie de pré-ciblage

La chimie « click » compatible *in vivo* est appelée chimie bio-orthogonale et est définie pour la première fois par Carolyn R. Bertozzi en 2005. Celle-ci s'est fortement popularisée ces dernières années jusqu'à obtenir le prix nobel de chimie en 2022. Les réactions bioorthogonales sont des transformations qui peuvent se produire dans des organismes vivants sans interférer avec aucun processus biochimique.[92,93] Elles permettent de coupler deux molécules *in vivo*, ce qui a conduit à l'émergence des stratégies de pré-ciblage (Figure 6).[60,94,95,96] Le principe du pré-ciblage implique deux injections, celle au préalable de la macromolécule d'intérêt puis celle de la sonde radioactive une fois la macromolécule fixée sur sa cible moléculaire. Cette stratégie est particulièrement pertinente pour des macromolécules d'intérêt, comme les anticorps, dont la pharmacocinétique est bien plus longue que la demi-vie du radioisotope utilisé.[70,97] Elle est également appropriée pour des applications théranostiques en limitant des irradiations sur des organes sains qui peuvent être fréquentes avec une macromolécule non spécifique marquée par un isotope radioactif. Ces macromolécules peuvent aussi avoir une élimination ou une clairance

[90] Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021.
[91] Nwe, K.; Brechbiel, M. W. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2009**, *24* (3), 289–302.
[92] Devaraj, N. K.; Weissleder, R.. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (9), 816–827.
[93] Carroll, L.; Evans, H. L.; Aboagye, E. O.; Spivey, A. C. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (35), 5772–5781.
[94] 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**, *122* (19), 3447–3450.
[95] Patra, M.; Zarschler, K.; Pietzsch, H.-J.; Stephan, H.; Gasser, G. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (23), 6415–6431.
[96] Knight, J. C.; Cornelissen, B. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2014**, *4* (2), 96–113.
[97] Paintaud, G.; Diviné, M.; Lechat, P. *Therapie* **2012**, *67* (4), 319–327.

trop lente. Cette stratégie peut ainsi améliorer le contraste en imagerie et réduire les doses de rayonnement reçues par les tissus sains.[60,85,96,98,99]

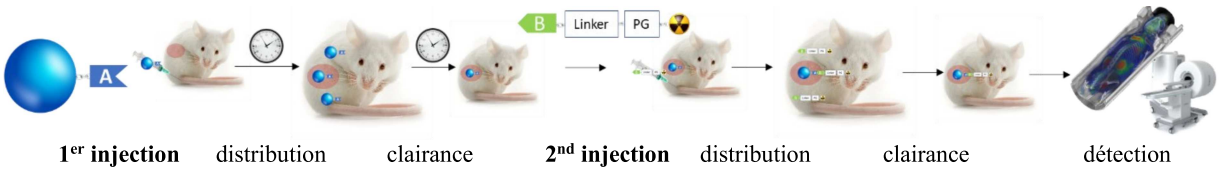


Figure 6: Stratégie de pré-ciblage.

Les approches par pré-ciblage nécessitent au préalable d'introduire sur les macromolécules d'intérêt un groupe fonctionnel approprié, complémentaire de celui porté par la molécule radioactive injectée dans la réaction bio-orthogonale impliquée. La réaction bio-orthogonale est irréversible, sélective, rapide, efficace, même en présence d'un environnement biologique complexe (Schéma 11).[100,101,102] Elles restent toutefois peu nombreuses et se limitent actuellement à la ligature de Staudinger,[103,104] la cycloaddition 1,3-dipolaire entre les azotures et les cyclooctynes (SPAAC),[105,106] la réaction de cycloaddition entre les nitrones et les oléfines (SPANC),[107] la cycloaddition entre 2-cyano-6-aminobenzothiazole (CBT) et les thioamines,[108] et la cycloaddition à demande inverse d'électron (IEDDA).[109,110,111,112]

[98] Versteegen, R. M.; ten Hoeve, W.; Rossin, R.; de Geus, M. A. R.; Janssen, H. M.; Robillard, M. S. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2018**, *57* (33), 10494–10499.
[99] Kenry; Liu, B. *Trends Chem.* **2019**, *1* (8), 763–778.
[100] Algar, W. R.; Dawson, P.; Medintz, I. L. *John Wiley & Sons*, **2017**.
[101] Ramil, C. P.; Lin, Q. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (94), 11007–11022.
[102] Billaud, E. M. F.; Belderbos, S.; Cleeren, F.; Maes, W.; Van de Wouwer, M.; Koole, M.; Verbruggen, A.; Himmelreich, U.; Geukens, N.; Bormans, G. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28* (12), 2915–2920.
[103] H. Staudinger, *Nobel Lecture*, **1953**, 397–419.
[104] Kuhnast, B.; Dolle, F. *Curr. Radiopharm.* **2010**, *3* (3), 174–201.
[105] 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.
[106] Bouvet, V.; Wuest, M.; Wuest, F. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (21), 7393–7399.
[107] McKay, C. S.; Blake, J. A.; Cheng, J.; Danielson, D. C.; Pezacki, J. P. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (36), 10040–10042.
[108] Inkster, J. A. H.; Colin, D. J.; Seimbille, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (12), 3667–3676.
[109] Selvaraj, R.; Liu, S.; Hassink, M.; Huang, C.; Yap, L.; Park, R.; Fox, J. M.; Li, Z.; Conti, P. S. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (17), 5011–5014.
[110] Keliher, E. J.; Reiner, T.; Thurber, G. M.; Upadhyay, R.; Weissleder, R. *ChemistryOpen* **2012**, *1* (4), 177–183.
[111] 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.
[112] 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.

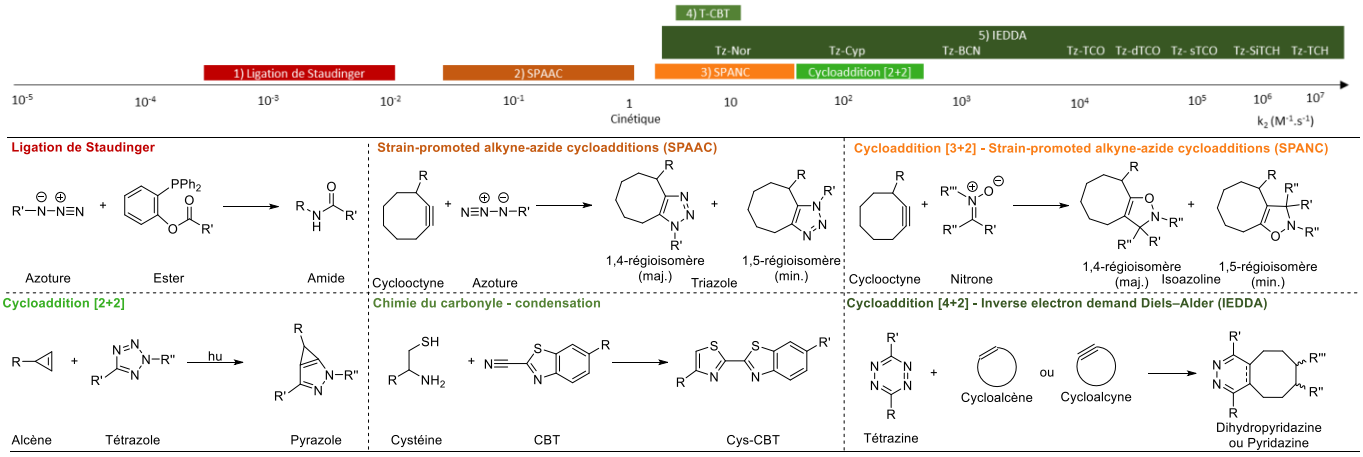


Schéma 11: Quelques exemples de réactions "click" bioorthogonales couramment utilisées dans les applications de marquages.

Parmi ces réactions, la ligature de Staudinger a été la première développée en 2000 par Saxon et Bertozzi.[113] Ensuite, la cycloaddition entre un alcyne et un azoture favorisé par la contrainte (SPAAC) a été décrite en 2004 et n'a cessé de se populariser jusqu'à nos jours.[114,115] Malheureusement, ces deux réactions nécessitent des concentrations importantes, les constantes de vitesse étant relativement faibles pour être compatible avec une approche de pré-ciblage. Ces réactions ont permis toutefois l'apparition de nouveaux groupements prosthétiques pour le marquage au fluor-18, et sont couramment appliqués *in vitro* (Schéma 12).

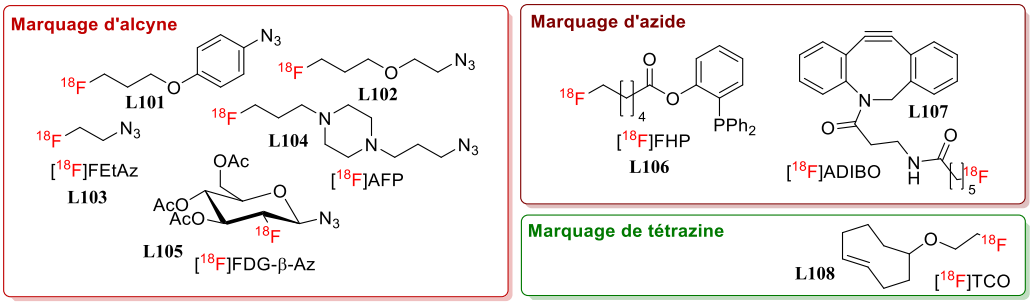


Schéma 12: Quelques exemples de groupements prothétiques développés à partir de la chimie bioorthogonale (adapté de Pretze et al).[60]

J. Réaction IEDDA

La réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons (IEDDA) se distingue par sa cinétique inégalée même dans des conditions douces et aqueuses, sa chimiosélectivité élevée et sa biocompatibilité.[116] Découverte par Carboni et Lindsey,[117] la réaction de l'IEDDA est une

[113] Saxon, E.; Bertozzi, C. R. *Science* **2000**, *287* (5460), 2007–2010.
[114] Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047.
[115] van den Bosch, S. M.; Rossin, R.; Renart Verkerk, P.; ten Hoeve, W.; Janssen, H. M.; Lub, J.; Robillard, M. S. *Nucl. Med. Biol.* **2013**, *40* (3), 415–423.
[116] L. Oliveira, B.; Guo, Z.; L. Bernardes, G. J. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (16), 4895–4950.
[117] Carboni, R. A.; Lindsey Jr, R. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81* (16), 4342–4346.

cycloaddition [4+2] de type Diels-Alder à demande inverse d'électron entre les diènes appauvries en électrons et des diénophiles enrichies en électrons.[118] Sauer *et al* ont démontré en 1962 que les diènes avec une conformation s-cis coplanaire sont bien plus réactifs que les autres diènes.[119] De plus, les cycles imposent aux diènes une conformation *s-cis* et les cycles aromatiques imposent aux diènes cycliques d'être plan. L'introduction d'hétéroatome peut accentuer cette tension du cycle. Leur réactivité peut être augmentée en appauvrissant en électron le cycle aromatique, l'une des façons étant de remplacer le cycle benzénique par un hétérocycle azoté. Sauer *et al* ont comparé la cinétique de réaction à IEDDA entre différents diènes appauvris en électrons.[120] Leurs résultats montrent que les tétrazines sont l'un des diènes les plus appauvris en électrons permettant une cinétique bien plus élevée que les triazines, les pyridazines ou les pyridines.[121] Les recherches se sont concentrées principalement sur les réactions de IEDDA à base de tétrazines. La cycloaddition IEDDA entre une tétrazine (Tz) (diène) et un *trans*-cyclooctène (TCO) (diénophile) est la plus rapide (10^2 et 10^6 $M^{-1}s^{-1}$) en raison des contraintes stériques (configuration de l'alcène E, tension de cycle) et des groupements attracteurs sur le diène, ainsi que les effets électrodonneurs et de répulsions sur le diénophile (Schéma 13).[122] Les réactifs utilisés dans cette cycloaddition sont suffisamment stables, sélectifs et non toxiques pour que cette approche de pré-ciblage soit intéressante pour la conception de nouvelles molécules radiomarquées.[116,123,124] Elle a été introduite en 2008 par Blackman *et al*[125] et développée pour le pré-ciblage en 2014 par Denk *et al*.[126]

Le mécanisme de cette réaction commence par l'addition du diénophile sur les carbones en position 1 et 4 de la tétrazine, produisant un intermédiaire bicyclique très tendu dont l'un des cycles est aromatique et l'autre non (Schéma 13). Le cycle aromatique subit alors une réaction de rétro-Diels-Alder libérant une molécule de diazote sous la forme gazeuse ainsi que la 4,5-dihydropyridazine correspondante. La 1,4-dihydropyridazine instable, notamment issue d'un diénophile alkyle, peut alors s'aromatiser en pyridazine. Dans le cas d'une 1,4-dihydropyridazine stable, la pyridazine finale peut être obtenue par oxydation, par exemple avec le dioxygène de l'air.

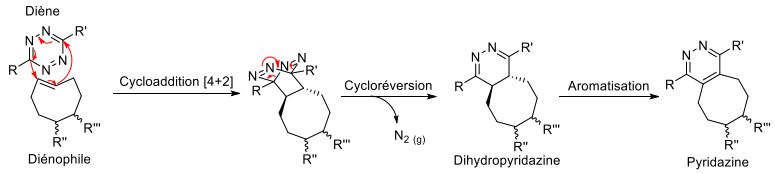


Schéma 13: Cycloaddition IEDDA [4+2] entre une tétrazine et un trans-cyclooctène.

[118] Wu, H.; Devaraj, N. K. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51* (5), 1249–1259.
[119] Sauer, J.; Lang, D.; Mielert, A. *Angew. Chem. - Int. Ed. Eng.* **1962**, *1* (5), 268–269.
[120] Balcar, J.; Chrisam, G.; Huber, F. X.; Sauer, J. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24* (14), 1481–1484.
[121] Kamber, D. N.; Liang, Y.; Blizzard, R. J.; Liu, F.; Mehl, R. A.; Houk, K. N.; Prescher, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (26), 8388–8391.
[122] Ravasco, J. M. J. M.; Coelho, J. A. S.; Trindade, A. F.; Afonso, C. A. M. *Pure Appl. Chem.* **2020**, *92* (1), 15–23.
[123] Boerman, O. C.; Oyen, W. J. G. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52* (8), 1171–1172.
[124] Šečkutė, J.; Devaraj, N. K. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17* (5), 761–767.
[125] Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (41), 13518–13519.
[126] Denk, C.; Svatunek, D.; Filip, T.; Wanek, T.; Lumpi, D.; Fröhlich, J.; Kuntner, C.; Mikula, H. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2014**, *53* (36), 9655–9659.

Les diénophiles utilisés sont généralement le *trans*-cyclooctène, cyclooctyne, cyclopropène, cyclobutène, norbornène ou isonitrile en raison de leur contrainte stérique (configuration de l'alcène E, tension de cycle).[122] Basée sur la théorie des orbitales moléculaires frontières (FMO), la diminution de l'écart énergétique entre l'orbitale moléculaire la plus haute occupée (HOMO) du diénophile et l'orbitale moléculaire la plus basse inoccupée (LUMO) du diène (tétrazine) permet d'augmenter la cinétique et la régiosélectivité de la réaction IEDDA (Figure 7). Des groupements électroattracteurs (EWG) sont ajoutés aux tétrazines pour les appauvrir en électrons et abaisser l'énergie de leur LUMO tandis que des groupements électrodonneurs (ERG/EDG) sont ajoutés à ses diénophiles pour les enrichir en électrons et augmenter l'énergie de leur HOMO.

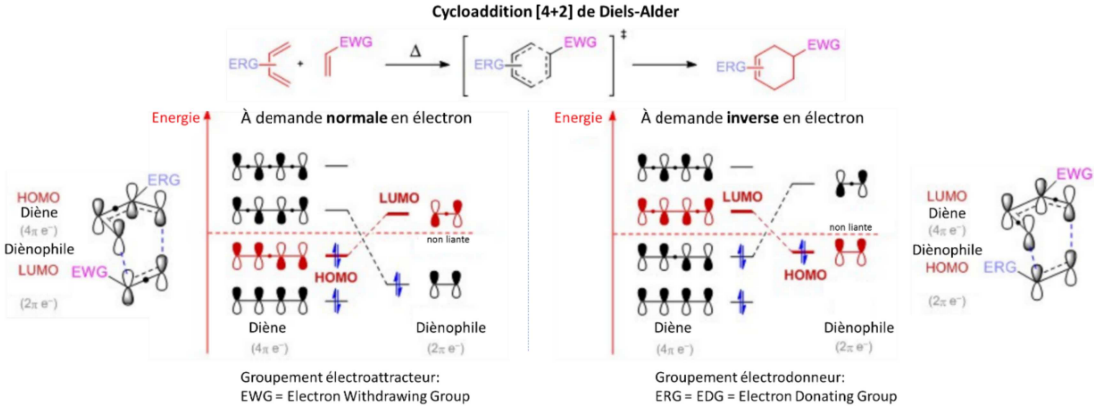


Figure 7: Différence entre une cycloaddition de Diels-Alder et la cycloaddition IEDDA.

Les tétrazines portant un groupement électroattracteur (EWG) présentent une cinétique plus rapide que les tétrazines porteuses d'un groupement électrodonneur (EDG).[127],[128]Les effets stériques des substituants sur la tétrazine impacte également sa réactivité. En général, plus le substituant est petit, plus la tétrazine est réactive. Par exemple, la 3-phényl-1,2,4,5-tétrazines monosubstituée (H-Tz) est 70 fois plus réactive que les tétrazine substituées par un méthyle (Me-Tz) ou phényle (Ph-Tz).[129] De même, la présence d'hétérocycles aromatiques en position 3 et 6 fonctionnalisés avec différents groupements électroattracteurs augmente aussi la vitesse de réaction.[130] Plusieurs revues dans la littérature recensent les effets électroniques des modifications des substituants sur la tétrazine ainsi que ceux sur le partenaire diénophile.[116,131,131,133,134,135] Il en ressort que les TCO sont le plus impacté par leur tension de cycle et la présence d'un groupement donneur en alpha de l'alcène, tandis que la tétrazine est surtout impacté par les effets de répulsion, de symétrie et plus faiblement par les effets électroniques. D'autres facteurs interviennent tels que la distorsion du cycle, l'encombrement

[127] Boger, D. L.; Schaum, R. P.; Garbaccio, R. M. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (18), 6329–6337.
[128] Hamasaki, A.; Ducray, R.; Boger, D. L. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (1), 185–193.
[129] Liang, Y.; Mackey, J. L.; Lopez, S. A.; Liu, F.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (43), 17904–17907.
[130] Wang, D.; Chen, W.; Zheng, Y.; Dai, C.; Wang, K.; Ke, B.; Wang, B. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (23), 3950–3955.
[131] Ravasco, J. M. J. M.; Coelho, J. A. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (9), 4235–4241.

stérique des substituants et l'interaction des solvants pour expliquer leur réactivité (Schéma 14).[116] Ces effets peuvent être regroupés en trois catégories : les effets électroniques des substituants,[116,132] les effets de contrainte cyclique (tension de cycle)[116,132] et les effets de répulsion orbitalaire N-N.[133] Svatunek *et al* ont montré que des effets de distorsion accrues entre les cycles aromatiques et tétrazine peuvent augmenter la réactivité de la molécule.[133] L'étude de ces effets électroniques a permis de développer de nouvelles générations de TCO contraints cycliquement, ainsi que de nouvelles tétrazines asymétriques portant en position 3 un cycle aromatique.[132,134,135]

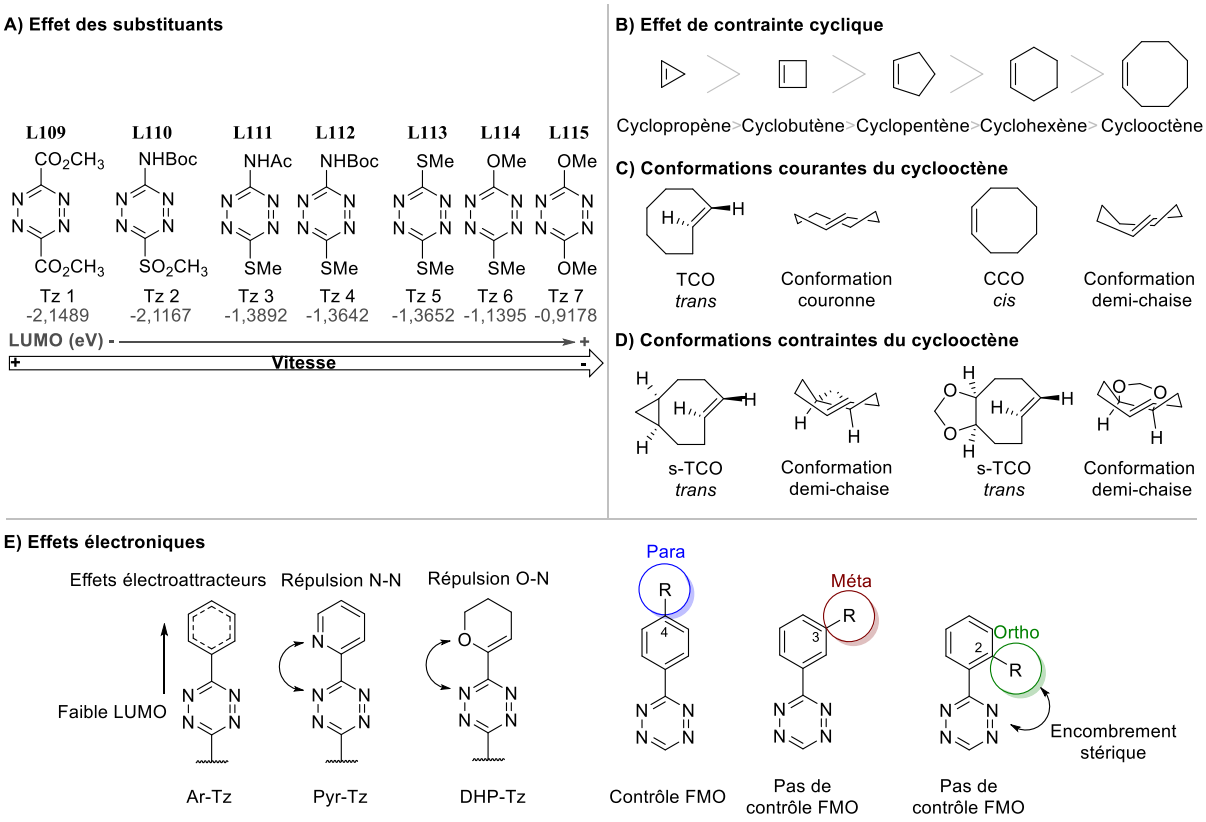


Schéma 14: Quelques exemples de structures tétrazines et alcynes en fonction des effets électroniques (adapté de Oliveira et al).[116]

Plusieurs études de la cinétique des tétrazines ont été réalisées durant cet décenie. Par exemple, comparent la réactivité et la stabilité de 8 aminotétrazines et d'une tétrazine porteuse d'un groupement acide carboxylique (Tableau 3).[140] Ces études montrent qu'il faut un compromis entre la cinétique et la stabilité des tétrazines où la cinétique augmentent suivant le substituant en position 6 sur le cycle tétrazinique : alcane < méthyle < pyridine < pyrimidine < hydrogène.

[132] García-Vázquez, R.; Battisti, U. M.; Herth, M. M. *Pharmaceuticals* **2022**, *15* (6), 685–710.
[133] Svatunek, D.; Wilkovitsch, M.; Hartmann, L.; Houk, K. N.; Mikula, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144* (18), 8171–8177.
[134] Qiu, L.; Mao, W.; Yin, H.; Tan, H.; Cheng, D.; Shi, H. *Contrast Media Mol. Imaging* **2019**, *2019* (1), e9182476-e9182489.
[135] Stéen, E. J. L.; Edem, P. E.; Nørregaard, K.; Jørgensen, J. T.; Shalgunov, V.; Kjaer, A.; Herth, M. M. *Biomaterials* **2018**, *179* (1), 209–245.

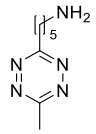
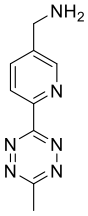
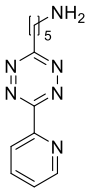
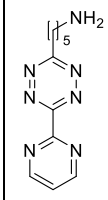
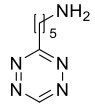
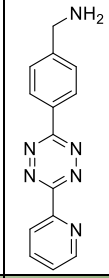
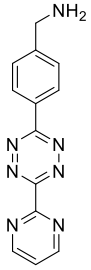
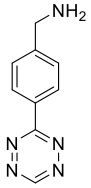
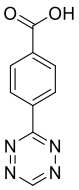
Entrée	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Structure									
Constante de vitesse k_2 (PBS, 37 °C, 10^3 $M^{-1}.s^{-1}$)	0,2	0,8	2,3	4,4	4,9	5,3	22	26	30
Stabilité (%)	90	96	85	75	40	20	23	40	70

Tableau 3 : Cinétique et stabilité de 9 tétrazines avec le (E)-cyclooct-4-ènol (TCO) par spectrophotométrie à λ = 515 nm (1-2 h).[140]

K. Synthèse des tétrazines

Plusieurs revues recensent les différentes voies de synthèse possible des tétrazines (Schéma 15).[116,136,137,138,139] La réaction de Pinner reste la plus utilisée.

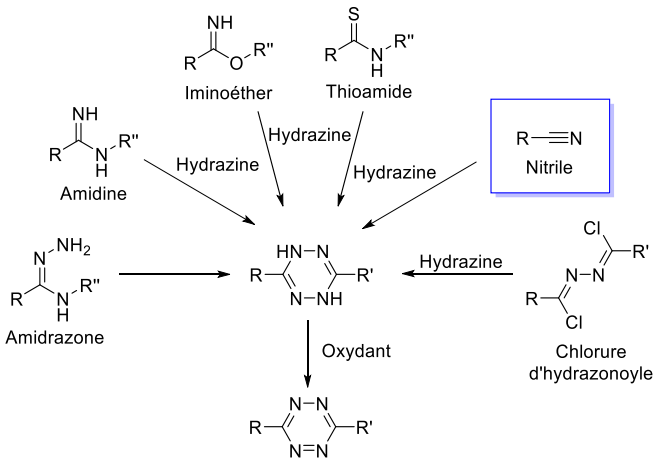


Schéma 15: Différentes voies de synthèses possibles des tétrazines.

[136] Tolshchina, S. G.; Rusinov, G. L.; Charushin, V. N. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2013**, *49* (1), 66–91.
[137] Mavragani, N.; Kitos, A. A.; Brusso, J. L.; Murugesu, M. *Chem. – Eur. J.* **2021**, *27* (16), 5091–5106.
[138] Choi, S.-K.; Kim, J.; Kim, E. *Molecules* **2021**, *26* (7), 1868–1884.
[139] Clavier, G.; Audebert, P. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (6), 3299–3314.

L. Réaction de Pinner

Les premières réactions de Pinner décrites pour la synthèse de 1,2,4,5-tétrazines impliquent la réaction d'un imidoester obtenu à partir d'un nitrile et d'un alcool, avec l'hydrazine (Schéma 16 a). De nos jours, cette réaction est réalisée one-pot sous la forme d'une condensation de deux nitriles aliphatiques ou aromatiques avec l'hydrazine (Schéma 16 b). Les rendements peuvent être satisfaisants dans le cas de la synthèse de tétrazines symétriques avec la mise en jeu d'un seul nitrile. Ils sont souvent faibles pour les tétrazines dissymétriques préparées à partir de deux nitriles différents, les réactions conduisant également à chacune des tétrazines symétriques issues de chacun des nitriles. Les tétrazines monosubstituées sont obtenues en remplaçant l'un des deux nitriles par le formamidine acétate. Les rendements obtenus sont là encore faibles, souvent inférieurs à 22%.[140] De plus, cette réaction n'est pas adaptée à la synthèse d'alkyltétrazines à partir de nitriles aliphatiques.[116] Pour surmonter ces limitations, différents groupes ont travaillé sur des versions catalysées (Schéma 16 c-e).

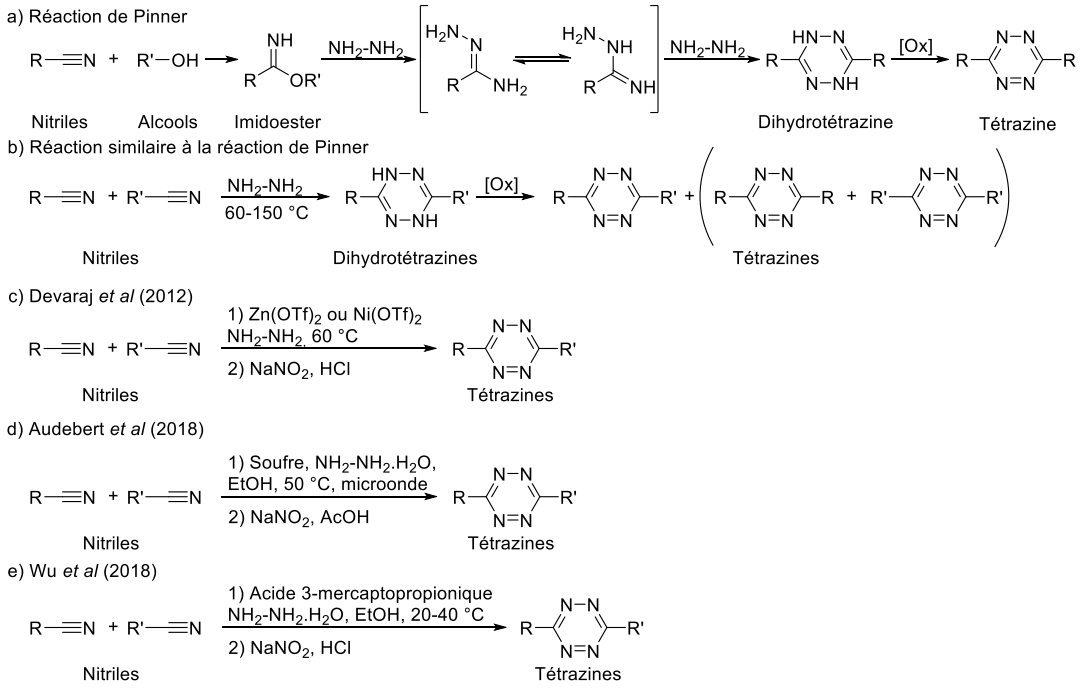


Schéma 16 : Évolutions récentes de la réaction de Pinner.

Tout d'abord, Wiley *et al* ont amélioré le rendement en réalisant la réaction dans des conditions anhydres dans un mélange de méthanol et de triéthylamine.[141] L'ajout de soufre colloïdal conduit à des rendements compris entre 60 et 70% pour les tétrazines disubstituées symétriques.[142] Ensuite ont été introduits des catalyseurs organiques soufrés comme le

[140] Karver, M. R.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (11), 2263–2270.
[141] Wiley, R.; Jarboe, J.; Hayes, F. *J. Org. Chem.* **1957**, *22* (7), 835–836.
[142] Audebert, P.; Sadki, S.; Miomandre, F.; Clavier, G.; Vernières, M. C.; Saoud, M.; Hapiot, P. *New J. Chem.* **2004**, *28* (3), 387–392.

mercaptohydrazine (NH_2NHSH) pour synthétiser les tétrazines aromatiques. Audebert *et al* ont démontré que le dichlorométhane (DCM) pouvait être utilisé comme réactif alternatif pour le sel de formamidine lors de la préparation de tétrazines asymétriques monosubstituées via des réactions de type Pinner médiées par le soufre (Schéma 16 d).[143] Audebert *et al* lors de cette synthèse ont détecté la formation de sulfure d'hydrogène gazeux ($H_2S_{(g)}$). Soloducho *et al* ont synthétisé avec le même protocole des tétrazines linéaires. Très récemment, les groupes de Calahorro *et al*, et par Mao *et al* ont utilisé la N-acétyl-L-cystéine pour obtenir des tétrazines asymétriques avec des rendements de l'ordre de 70%.[144] Le groupe de Mao *et al* en 2019 (Schéma 16 e) a élargi ce protocole à la préparation de toute une gamme de substrats permettant d'accéder facilement à un ensemble de tétrazine dissymétrique.[145] Ce groupe a démontré que l'utilisation d'un thiol favorisait la formation de tétrazines asymétriques à température ambiante à partir d'hydrate d'hydrazine et de nitriles portant des groupes fonctionnels réactifs. Ces conditions de réaction douces ont permis l'accès aux tétrazines à l'échelle du gramme. Il était déjà connu que le thiol attaque le nitrile très facilement en présence d'acide chlorhydrique (HCl) anhydre dans un solvant protique polaire (1,4-dioxane ou dichlorométhane ou THF ou éther diéthylique).[146] Mao *et al* ont ainsi obtenu de bons rendements entre 46 et 77% pour la formation des tétrazines dans des conditions plutôt douces (20 - 40 °C). Ces derniers résultats constituent une avancée notable comparativement aux conditions catalysées par des acides de Lewis développées en parallèle.

En effet, dans les mêmes années, Devaraj *et al* ont décrit la synthèse d'une série d'alkyltétrazines par catalyse avec le trifluorométhanesulfonate de zinc ($Zn(OTf)_2$) ou le trifluorométhanesulfonate de nickel ($Ni(OTf)_2$) agissant comme des acides de Lewis pour favoriser la réaction de l'hydrazine sur les nitriles (Schéma 16 c).[147] Cette approche est effectuée avec de bons rendements allant jusqu'à 95% pour les tétrazines disubstituées symétriques et allant jusqu'à 75% pour les tétrazines monosubstituées. De plus, des tétrazines asymétriques monosubstituées peuvent être synthétisées avec des rendements élevés via la condensation d'un sel de formamidine et de nitrile en présence de ces catalyseurs au nickel ou au zinc. Un mélange de catalyseur $Cu(NO_3)_2.3H_2O$ et de zinc a aussi été utilisé pour synthétiser le 3,6-diphényl-1,2,4,5-tétrazine avec un bon rendement de 85%.[148] Cependant, la catalyse aux sels de Ni ou de Zn est limitée par l'utilisation d'hydrazine anhydre réactive, dangereuse et pas toujours commercialement disponible dans certains pays. Par ailleurs, les réactions impliquant les acides de Lewis nécessitent des températures supérieures à 80 °C (contrairement aux catalyseurs organiques soufrés) qui peuvent dans certains cas conduire à la dégradation des tétrazines.

[143] Sołoducho, J.; Doskocz, J.; Cabaj, J.; Roszak, S. *Tetrahedron* **2003**, *59* (26), 4761–4766.
[144] Calahorro, A. J.; Peñas-Sanjuan, A.; Melguizo, M.; Fairen-Jimenez, D.; Zaragoza, G.; Fernández, B.; Salinas-Castillo, A.; Rodríguez-Diéguez, *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (2), 546–548.
[145] Mao, W.; Shi, W.; Li, J.; Su, D.; Wang, X.; Zhang, L.; Pan, L.; Wu, X.; Wu, H. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2019**, *58* (4), 1106–1109.
[146] Jaffee, E. G.; Lauber, M. A.; Running, W. E.; Reilly, J. P. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (21), 9355–9361.
[147] Yang, J.; Karver, M. R.; Li, W.; Sahu, S.; Devaraj, N. K. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2012**, *51* (21), 5222–5225.
[148] Lim, C. L.; Pyo, S. H.; Kim, T. Y. ; Yim, E. S.; Han, B. H. *Heterocycl. Compd.* **1995**, *26* (46), 374–377.

Quelles que soit le type de catalyse, toutes les réactions de Pinner présentées précédemment conduisent en premier lieu aux dihydrotétrazines. Dans la grande majorité des publications, les dihydrotétrazines sont oxydées ensuite par l'acide nitrite généré *in situ* dans une solution de nitrite de sodium et d'un large excès d'acide chlorhydrique (HCl) à 1 M jusqu'à pH 3. Auderbert *et al* ont remplacé HCl par l'acide acétique.[142] Feng *et al* ont montré qu'il était possible d'oxyder les dihydrotétrazines simplement avec l'oxygène de l'air.[149] Cependant cette oxydation peut prendre beaucoup de temps suivant la nature du substrat. Selvaraj *et al* ont ainsi employé un oxydant plus doux et néanmoins efficace le diacétate d'iodobenzène ($PhI(OAc)_2$ ou PIDA).[150]

M. Partenaires radiofluorés de la réaction IEDDA

Les deux partenaires, *trans*-cyclooctène (TCO) et tétrazine (Tz) ont été marqués au fluor-18 pour l'imagerie TEP. Les exemples concernant les dérivés TCO sont présentés dans le schéma 17.

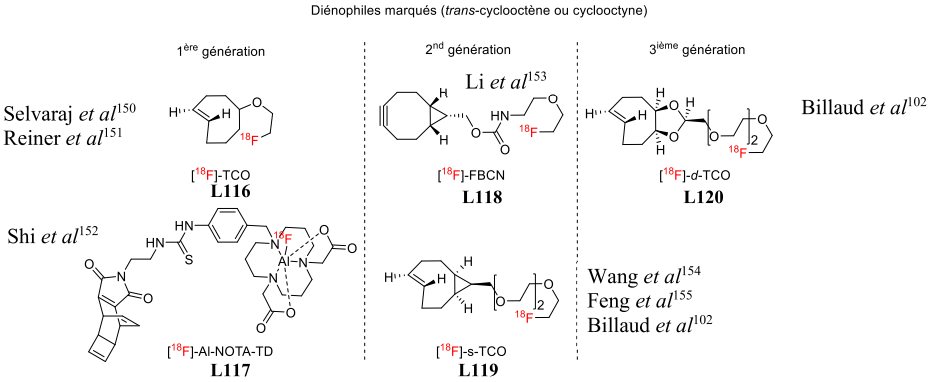


Schéma 17: Principaux diénophiles radiofluorés.[102,112,151,152,153,154,155]

Les tétrazines radiofluorées sont présentées dans le schéma 18. Etant donné les conditions de radiofluoration basiques, les stratégies de radiomarquage direct de tétrazines conduisent en général à de faibles rendements corrigés de la décroissance (RCY) en raison de leur instabilité. Ce problème a été initialement contourné en utilisant des stratégies indirectes de marquage avec des groupements prosthétiques. Certaines des tétrazines radiomarquées (par exemple [^{18}F]F-Tz **5**, **6** et **11**) ont donné des résultats encourageants *in vivo*. D'autres tétrazines (par exemple [^{18}F]F-Tz **1**, **2** et **4**) se sont révélées relativement lipophiles conduisant à une mauvaise solubilité physiologique et donc à leur agrégation et accumulation dans les tissus lipophiles et engendrant un bruit de fond.

[149] Fang, Z.; Hu, W.-L.; Liu, D.-Y.; Yu, C.-Y.; Hu, X.-G. *Green Chem.* **2017**, *19* (5), 1299–1302.
[150] Selvaraj, R.; Fox, J. M. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55* (34), 4795–4797.
[151] Reiner, T.; Zeglis, B. M. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **2014**, *57* (4), 285–290.
[152] Shi, X.; Gao, K.; Huang, H.; Gao, R. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29* (2), 250–254.
[153] Li, X.-G.; Roivainen, A.; Bergman, J.; Heinonen, A.; Bengel, F.; Thum, T.; Knuuti, J. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (48), 9821–9824.
[154] 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.
[155] Feng, H.; Zhang, H.; Wang, M.; Vannam, R.; Wang, H.; Yan, X.; Ouyang, W.; Jia, X.; Fox, J. M.; Li, Z. *Chemistry* **2020**, *26* (21), 4690–4694.

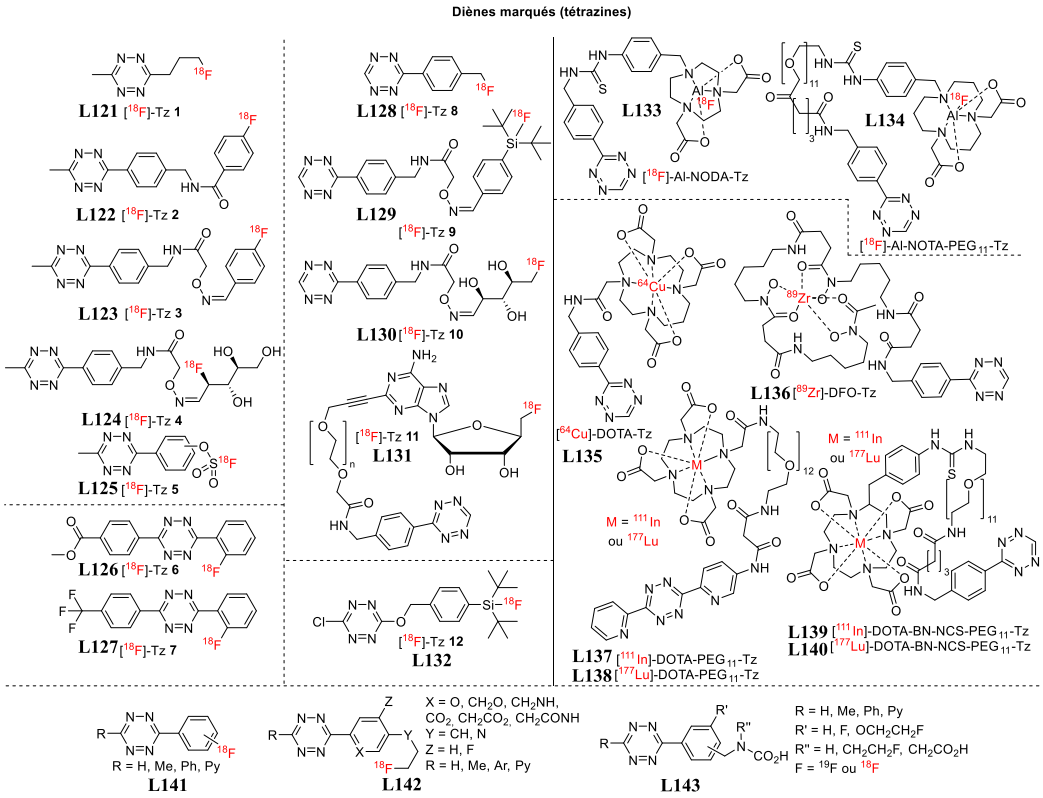


Schéma 18: Quelques exemples de tétrazines radiomarquées.[155,156,157,158,159,160,161,162]

N. Critères pour un réactif tétrazinique radioactif d'IEDDA

Dans presque toutes les études pré-ciblées basées sur l'IEDDA décrites, l'entité TCO est liée au vecteur et la tétrazine porte le radionucléide. Ce choix est dû à leur différence de stabilité *in vivo* : le TCO, plus stable que la Tz, est greffé sur l'anticorps qui « demeure » plus longtemps dans l'organisme que la Tz radiomarquée. Dans une stratégie de préciblage efficace, les tétrazines les plus réactives tout en étant stables *in vivo* sont à privilégier. Récemment, de nombreux travaux et revues se sont concentrés sur la caractérisation d'une structure tétrazinique optimale pour la réaction IEDDA *in vivo*.

Ces 20 dernières années de recherche sur les tétrazines ont conduit certains auteurs à compiler des guides de recommandations pour la réaction de pré-ciblage IEDDA, notamment pour la conception de la tétrazine radiomarquée. Les plus récents sont les revues de Stéen *et al*[135] en 2018 et de Qiu *et al*[134] de 2019. Les recommandations portent sur les critères de stabilité

[156] García-Vázquez, R.; Battisti, U. M.; Jørgensen, J. T.; Shalgunov, V.; Hvass, L.; Stares, D. L.; Petersen, I. N.; Crestey, F.; Löffler, A.; Svatunek, D.; Kristensen, J. L.; Mikula, H.; Kjaer, A.; Herth, M. M. *Chem. Sci.* **2021**, *12* (35), 11668–11675.
[157] García-Vázquez, R.; Jørgensen, J. T.; Bratteby, K. E.; Shalgunov, V.; Hvass, L.; Herth, M. M.; Kjær, A.; Battisti, U. M. *Pharmaceuticals* **2022**, *15* (2), 245–273.
[158] Hui Teh, J.; Braga, M.; Allott, L.; Barnes, C.; Hernández-Gil, J.; Tang, M.-X.; O. Aboagye, E.; J. Long, N. *Chem. Commun.* **2021**, *57* (88), 11677–11680.
[159] Otaru, S.; Imlimthan, S.; Sarparanta, M.; Helariutta, K.; Wähälä, K.; Airaksinen, A. J. *Molecules* **2020**, *25* (5), 1208–1226.
[160] Zhou, Z.; Meshaw, R.; Zalutsky, M. R.; Vaidyanathan, G. *J. Nucl. Med.* **2021**, *62* (11), 1624–1630.
[161] Zhou, Z.; Zalutsky, M. R.; Vaidyanathan, G. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28* (17), 115634–115644.
[162] Kjær, A.; Petersen, I. N.; Herth, M. M.; Kristensen, J. L. WO2020108720A1, **2020**.

et réactivité, cinétique de réaction rapide, spécificité élevée, hydrophilie et élimination, petite taille et faible poids moléculaire.

1. Stabilité/réactivité

Il existe une corrélation inverse entre la stabilité et la vitesse de réaction : une tétrazine plus stable réagit généralement moins rapidement qu'une tétrazine moins stable. Les positions 3 ou 6 du cycle tétrazine doivent comporter un hydrogène pour la meilleure cinétique, et un méthyle pour une meilleure stabilité. Une chaine alkyle, ou aromatique donnent généralement des tétrazines encore moins réactives. Les tétrazines les moins réactives restent les tétrazines symétriques. De plus, les groupements attracteurs ont tendances à augmenter la réactivité des tétrazines tandis que les groupements donneurs diminuent celle-ci, et la stabilisent. Pour les 6-aryl-1,2,4,5-tétrazines, la position para est moins importante que la position méta pour ces effets électroniques. La position ortho est principalement régie par des effets répulsifs de distorsion.[133,163] Les effets stériques sont plus négligeables que les effets répulsifs en ortho et électroniques. La majorité des structures tétraziniques rencontrées dans la littérature sont dissymétriques avec un hydrogène ou méthyle en position 3, et un cycle aromatique en position 6 généralement fonctionnalisé en position para. Plus récemment, la présence d'un groupe pyridine en position 3 et/ou 6 s'est révélée avantageuse. Malgré ce compromis entre stabilité et réactivité, Qiu *et al* concluent d'après l'étude de Zeglis *et al*[164,165] qu'il est peu probable que la décomposition des tétrazines compromette la réaction IEDDA *in vivo* à la vue de la cinétique entre la Tz et le TCO.[134,164,165] Il faut donc une tétrazine suffisamment stable avant injection, et relativement stable *in vivo*. Une stabilité comparable au temps nécessaire à son élimination semble être le meilleur compromis possible.

2. Hydrophilie et charge globale

La charge nette globale des tétrazines radiomarqués influence directement leurs voies de biodistribution et d'élimination.[134] En 2019, Meyer *et al* concluent que l'augmentation de la charge moléculaire globale du radiotraceur augmente l'hydrophilie et raccourcit la demi-vie plasmatique (PHL).[166] Cependant, les auteurs rappellent qu'une PHL devait être suffisamment longue (> 10 min) pour permettre une accumulation tumorale suffisante de la tétrazine marquée. L'introduction d'acides aminés dans la structure réduit les temps de circulation de la tétrazine marquée et influence l'élimination rénale ou hépatique. Les molécules chargées sont principalement éliminées par les reins, tandis que les composés sans charge nette globale s'absorbent dans le foie et les intestins. L'introduction de lysine dans la structure diminue considérablement la PHL en augmentant la captation par les reins. L'introduction de chaines PEG (polyéthylène glycol) ne fait qu'augmenter l'élimination globale sans influencer la PHL.

[163] Novianti, I.; Kowada, T.; Mizukami, S. *Org. Lett.* **2022**, *24* (17), 3223–3226.
[164] Zeglis, B. M.; Sevak, K. K.; Reiner, T.; Mohindra, P.; Carlin, S. D.; Zanzonico, P.; Weissleder, R.; Lewis, J. S. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54* (8), 1389–1396.
[165] Zeglis, B. M.; Brand, C.; Abdel-Atti, D.; Carnazza, K. E.; Cook, B. E.; Carlin, S.; Reiner, T.; Lewis, J. S. *Mol. Pharmaceutics* **2015**, *12* (10), 3575–3587.
[166] Meyer, J.-P.; Kozlowski, P.; Jackson, J.; Cunanan, K. M.; Adumeau, P.; Dilling, T. R.; Zeglis, B. M.; Lewis, J. S. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (19), 8201–8217.

En effet, les PEG influencent la pharmacocinétique, augmentent la clairance et réduisent l'absorption tissulaire non spécifique des tétrazines radiomarquées.[167,165] Des chaines alcanes comme espaceurs augment l'absorption non spécifique et diminue l'élimination globale.

L'introduction d'une charge positive dans une molécule radiomarquée peut augmenter la clairance par les reins et la rétention rénales en augmentant son hydrophilie,[168,169,170] alors que les tétrazines sans charge sont principalement excrétés via le foie et les intestins.[166] Qiu *et al* comparent directement des molécules marquées par des radiométaux différents et fonctionnalisés par des chélates différents en se basant uniquement sur les travaux de Meyer *et al*[134,166] L'élimination hépatique et intestinale a été observée avec la charge (-1) de [^{64}Cu]Cu-NOTA-Tz et [^{64}Cu]Cu-NOTA-PEG$_7$-Tz, ainsi qu'avec la charge (0) de Al[^{18}F]F-NODA-Tz et Al[^{18}F]F-NOTA-lysine-Tz. Tandis que l'élimination rénale a été observée pour la charge (+1) de [^{68}Ga]Ga-NODA-Tz, Al[^{18}F]F-NOTA-lysine$_2$-Tz, ainsi que la charge (+2) de [^{68}Ga]Ga-NODA-Tz, Al[^{18}F]F-NOTA-lysine$_2$-Tz et [^{64}Cu]Cu-SarAr-Tz.

Les chélateurs de radiométaux sont généralement hydrophiles (NOTA, DOTA, SARS, etc.). Par exemple, Nichols *et al*,[171] et Devaraj *et al*[172] ont synthétisé des polymères fonctionnalisés avec une tétrazine marquée respectivement au ^{68}Ga et au ^{18}F. Ces polymères ont été améliorés par l'introduction d'un squelette amino-dextrane hydrophile qui a montré des résultats très prometteurs. Ce paramètre sera plus amplement discuté à travers les tétrazines hydrophiles existante dans la littérature.

O. Tétrazines hydrophiles

Les tétrazines généralement rencontrées dans la littérature sont très lipophiles. Seules quelques tétrazines hydrophiles marquées aux fluor-18 ont été développées dans la littérature. Elles ont été publiées pour la plupart durant le projet de thèse, et ont conduit à une nette amélioration de l'imagerie TEP.

En 2015, Keinänen *et al* a émis l'hypothèse que la tétrazine fonctionnalisée par un [^{18}F]FDG serait plus soluble dans l'eau par rapport aux autres tétrazines radiomarquées de l'époque (Figure 8).[173] En raison des trois groupements hydroxyles apportés dans le fragment 5-fluoro-5-désoxyribose (FDG), une hydrophilie accrue a bien été observée. Son élimination se fait rapidement par voie urinaire majoritairement.

[167] García, M. F.; Gallazzi, F.; Junqueira, M. de S.; Fernández, M.; Camacho, X.; Mororó, J. da S.; Faria, D.; Carneiro, C. de G.; Couto, M.; Carrión, F.; Pritsch, O.; Chammas, R.; Quinn, T.; Cabral, P.; Cerecetto, H. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (29), 5275–5285.
[168] García Garayoa, E.; Schweinsberg, C.; Maes, V.; Brans, L.; Bläuenstein, P.; Tourwé, D. A.; Schibli, R.; Schubiger, P. A. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (12), 2409–2416.
[169] Tsiapa, I.; Loudos, G.; Varvarigou, A.; Fragogeorgi, E.; Psimadas, D.; Tsotakos, T.; Xanthopoulos, S.; Mihailidis, D.; Bouziotis, P.; Nikiforidis, G. C.; Kagadis, G. C. *Nucl. Med. Biol.* **2013**, *40* (2), 262–272.
[170] Antunes, P.; Ginj, M.; Walter, M. A.; Chen, J.; Reubi, J.-C.; Maecke, H. R. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18* (1), 84–92.
[171] Nichols, B.; Qin, Z.; Yang, J.; Vera, D. R.; Devaraj, N. K. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (40), 5215–5217.
[172] Devaraj, N. K.; Hilderbrand, S.; Upadhyay, R.; Mazitschek, R.; Weissleder, R. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2010**, *122* (16), 2931–2934.
[173] 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. A. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7* (1), 62–66.

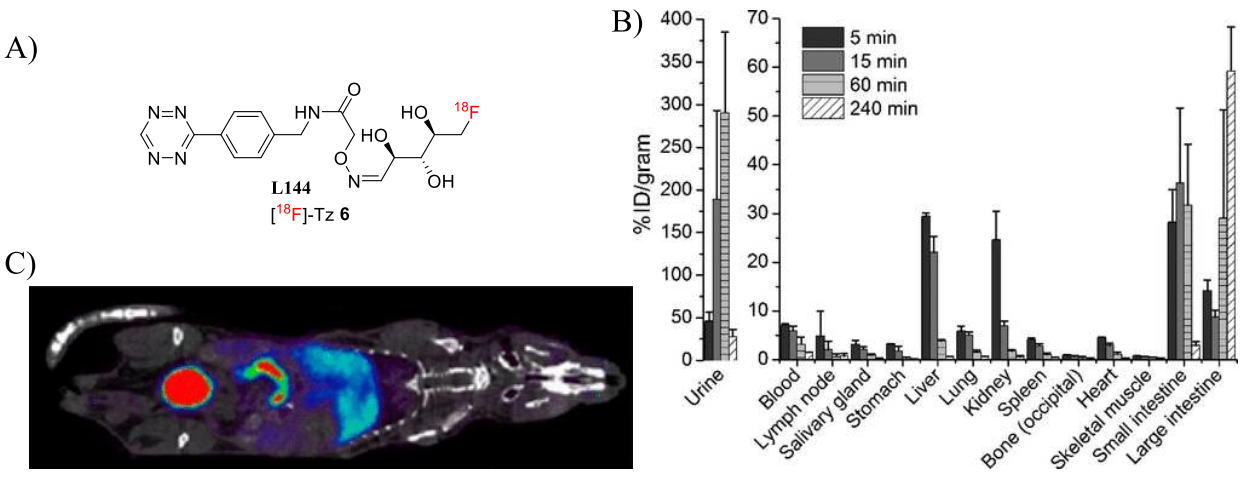


Figure 8 : Evaluation in vivo de tétrazine dérivés du [^{18}F]FDG de Keinänen et al (A) Structure, B) Biodistribution chez la souris et C) Imagerie TEP).[173]

Feng *et al* ont amélioré considérablement le signal tumeur-muscle et tumeur sur bruit de fond en remplaçant sur une tétrazine un groupement phényle par une chaine hydroxyéthyle (Figure 9). Cette tétrazine a été utilisé dans la synthèse d'un agent d'imagerie TEP ciblant le carcinome pulmonaire à petites cellules.[155]

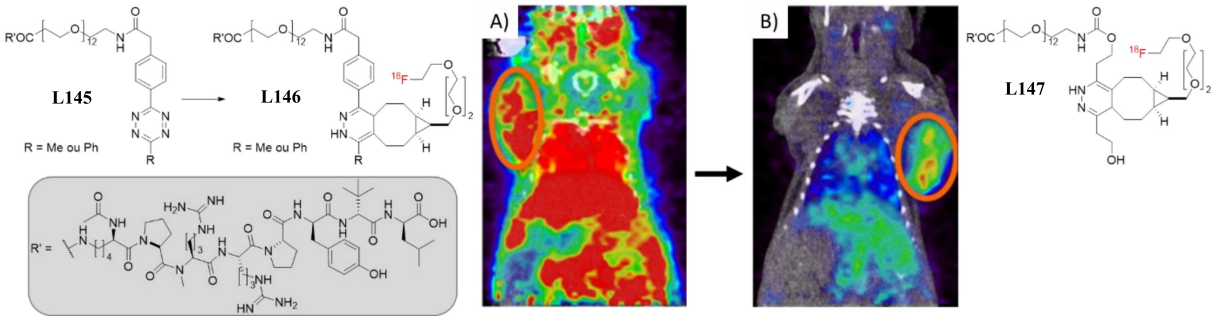


Figure 9: Gain de contracte en TEP d'un tétrazine aliphatique (B) comparativement à une tétrazine diphénylique (A).[155]

En 2021, Stéen *et al* déduisent qu'une lipophilie réduite et une réactivité élevée de l'IEDDA sont des paramètres clés pour des utilisations *in vivo* efficace des tétrazines. Pour cela, les auteurs utilisent deux axes d'étude (Tableau 4): soit en modifiant le substituant en position 6 sur le cycle tétrazinique (H, CH_3, (hétéro)aromatique) ou soit en ajoutant différents groupements plus ou moins lipophile via une CuAAC. Les auteurs observent une augmentation de la cinétique de réaction suivant l'ordre des groupements : Ar < CH_3 < Py < H. De plus, ces groupements ne sont pas corrélés à l'efficacité de la IEDDA. L'ajout des groupements ([^{18}F]F-CH_2CH_2, [^{18}F]F-PEG_3 et [^{18}F]F-sucre) n'a pas modifié la constante de vitesse k_2, mais l'efficacité de la IEDDA. Cette efficacité de la réaction est mesurée indirectement par la valeur d'activité résiduel d'une tétrazine de référence marquée à l'indium-111 après clairance. Pour cela, une première injection d'un anticorps CC49 fonctionnalisé par un TCO est injecté à des souris xénogreffées de cellule PC-3. Après 72 h, la tétrazine à tester est injectée. Après 1 h, la

tétrazine de référence marquée à l'indium-111 est injecté puis réagi avec les TCO restant. La tétrazine à tester si elle réagit bloque donc la position pour la tétrazine de référence radioactive. Le pourcentage de radioctivité mesuré dans la tumeur par rapport à la valeur injectée définit alors la valeur d'effet de bloquage. Une bonne réactivité Tz-TCO correspond donc pour la tétrazine testée à une faible radioactivité tumorale et un fort effet bloquant.

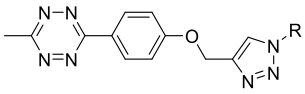
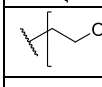
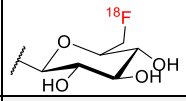
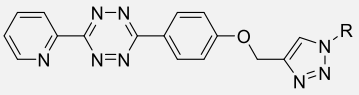
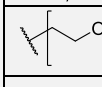
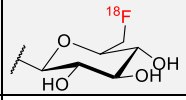
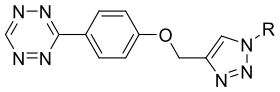
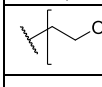
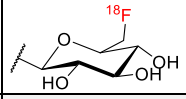
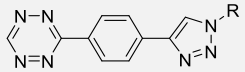
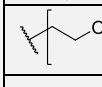
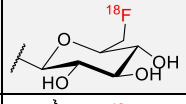
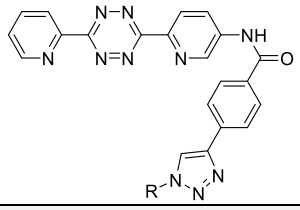
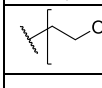
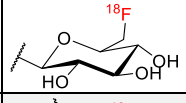
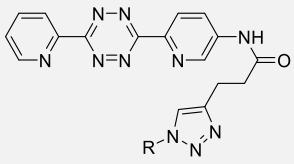
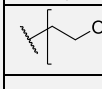
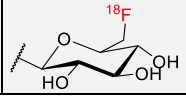
Entrée	Structure	Groupement R	Constante de vitesse k_2 ($M^{-1}.s^{-1}$)		clog $D_{7,4}$	%Effet bloquant
			1,4-dioxane, 25 °C	DPBS, 37 °C		
A			1,4	1 100	0,89	9
			1,4	1 100	0,54	1
			1,4	1 100	-0,93	13
B			13	-	1,89	0
			13	-	1,53	0
			13	-	0,06	24
C			72	39 000	0,29	9
			72	39 000	-0,06	4
			72	39 000	-1,53	80
D			200	60 000	0,65	0
			200	60 000	0,29	28
			200	60 000	-1,18	76
E			230	73 000	2,46	16
			230	73 000	2,10	30
			230	73 000	0,63	51
F			230	73 000	0,84	67
			230	73 000	0,48	72
			230	73 000	-0,99	99

Tableau 4 : Influence des groupements sur la cinétique et l'efficacité de l'IEDDA.[135]

Les auteurs expliquent que la faible lipophilie améliore la capacité de la tétrazine à se lier aux TCO dans le site tumoral. De plus, l'excrétion plus rapide des molécules radiomarquées est cruciale pour obtenir des ratios tumeur sur bruit de fond élevés. Cette élimination est également facilitée par la faible lipophilie. Les auteurs recommandent donc un cLog $D_{7,4}$ inférieurs à -3, une constante de vitesse de second ordre supérieure à 50 000 $M^{-1}.s^{-1}$, et une élimination urinaire très rapide pour une stratégie de pré-ciblage *in vivo* réussie.

Ces mêmes auteurs ont développé à partir de ces études trois nouvelles tétrazines rendue hydrophile par deux acides carboxyliques en α d'une amine tertiaire.[174]

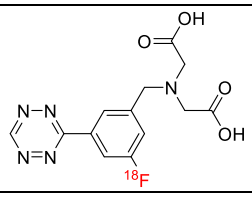
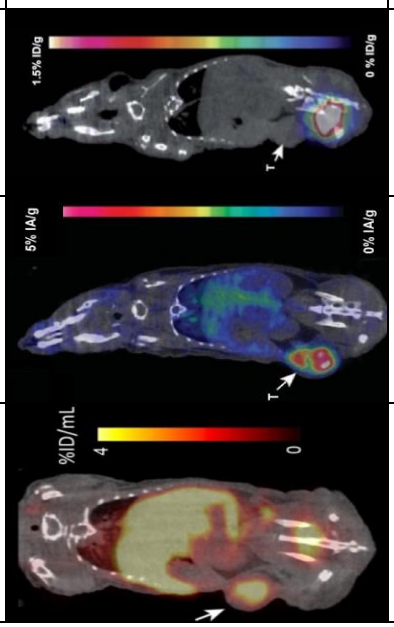
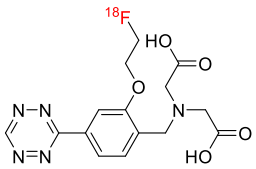
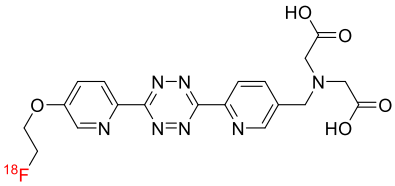
Entrée	Structure	cLog $D_{7,4}$	Effet bloquant (%)	Imagerie TEP	Réf.
1		-6,93	90 ± 5		156
2		-6,83	98 ± 0,3		174
3		-6,36	99 ± 0,7		157

Tableau 5 : Tétrazines hydrophiles développés par Mathias et coll pour le pré-ciblage avec blocage (souris xénogreffée d'une tumeur LS174T ciblé par un anticorps anti-TAG72-CC49-TCO et + [^{18}F]Tz à 1 h post-injection).

[174] Battisti, U. M.; Bratteby, K.; Jørgensen, J. T.; Hvass, L.; Shalgunov, V.; Mikula, H.; Kjær, A.; Herth, M. M. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (20), 15297–15312.

P. Présentation du projet et stratégie envisagée

Ces dernières années, deux axes ont été privilégiés pour améliorer l'imagerie TEP par préciblage utilisant les tétrazines : soit par une réduction de la taille de la structure tétrazinique en éliminant au maximum les groupements lipophiles comme les phényles,[155,175] soit par l'ajout de groupements de plus en plus hydrophiles tels que les alcools,[155,173] les PEG_n et les acides carboxyliques.[176] La synthèse de ces nouvelles tétrazines plus hydrophiles a permis d'améliorer les images TEP par rapport aux tétrazines classiquement décrites dans la littérature. Cette amélioration passe par un meilleur signal tumeur sur bruit de fond en raison d'une amélioration de la clairance. Le caractère hydrophile des tétrazines est donc déterminant pour des applications en pré-ciblage. L'hydrophilie conditionne en effet la solubilité dans l'eau, la biocompatibilité, la biodistribution, l'élimination et la clairance, et a été démontrée pour avoir un impact direct sur la cinétique de réaction IEDDA. Au début de ce projet, les tétrazines les plus hydrophiles décrites étaient caractérisées par des valeurs de LogP entre 2 et 0,3, et elles étaient caractérisées par la présence de chaines ou d'espaceurs PEG_n. Néanmoins, les résultats en pré-ciblage étaient mitigés en raison du mauvais contraste des images. Actuellement, les tétrazines les plus hydrophiles décrites sont caractérisées par des valeurs de LogP de l'ordre de -1,9. Le gain d'hydrophilie a amélioré considérablement la qualité des images, augmenté la pharmacocinétique, l'élimination et la clairance.

Dans ce contexte, l'objectif du travail a été de développer une tétrazine radiofluorée avec une valeur de LogP négative et de l'évaluer dans la réaction de IEDDA et en préciblage (Figure 10). Nous nous sommes tournés vers une structure tétrazinique porteuse d'une fonction sulfonate SO_3^- (groupe sulfo) connue pour son caractère ionique qui apporte des propriétés d'hydrophilie remarquables (Figure 10). La fonction sulfonate est par exemple présente dans de nombreux colorants et fluorophores organiques,[177,178,179,180,181,182] ainsi que dans les catalyseurs de nouvelles générations,[183] dont le cœur structurel organique aromatique est fortement lipophile. En outre, la sulfonatation de médicaments ou son utilisation comme contre–ion a déjà donné des résultats encourageants pour en améliorer leur propriété et leur efficacité.[184,185,186,187,188,189,190] Notre stratégie pour accéder aux sulfotétrazines radiofluorées

[175] Wu, M.; Wu, X.; Wang, Y.; Gu, L.; You, J.; Wu, H.; Feng, P. *ChemBioChem* **2018**, *19* (6), 530–534.
[176] Stéen, E. J. L.; Jørgensen, J. T.; Denk, C.; Battisti, U. M.; Nørregaard, K.; Edem, P. E.; Bratteby, K.; Shalgunov, V.; Wilkovitsch, M.; Svatunek, D.; Poulie, C. B. M.; Hvass, L.; Simón, M.; Wanek, T.; Rossin, R.; Robillard, M.; Kristensen, J. L.; Mikula, H.; Kjaer, A.; Herth, M. M. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2021**, *4* (2), 824–833.
[177] Desmettre, T.; Devoisselle, J. M.; Mordon, S. *Surv. Ophthalmol.* **2000**, *45* (1), 15–27.
[178] Woodroofe, C. C.; Lim, M. H.; Bu, W.; Lippard, S. J. *Tetrahedron* **2005**, *61* (12), 3097–3105.
[179] Hamann, F. M.; Brehm, R.; Pauli, J.; Grabolle, M.; Frank, W.; Kaiser, W. A.; Fischer, D.; Resch-Genger, U.; Hilger, I. *Mol. Imaging* **2011**, *10* (4), 258–269.
[180] Pauff, S. M.; Miller, S. C. *Org. Lett.* **2011**, *13* (23), 6196–6199.
[181] Pauff, S. M.; Miller, S. C. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (2), 711–716.
[182] Kim, J.; Kim, Y. *Analyst* **2014**, *139* (12), 2986–2989.
[183] Krommyda, K.; Panopoulou, C.; Moustani, C.; Anagnostopoulou, E.; Makripidi, K.; Papadogianakis, G. *Catal. Lett.* **2019**, *149* (5), 1250–1265.
[184] James, C.; Mant, T.; Rogers, H. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1987**, *23* (5), 561–568.
[185] Boven, E.; Westerman, M.; van Groeningen, C. J.; Verschraagen, M.; Ruijter, R.; Zegers, I.; van der Vijgh, W. J. F.; Giaccone, G. *Br. J. Cancer* **2005**, *92* (9), 1636–1643.
[186] Ogata, J.; Minami, K.; Horishita, T.; Shiraishi, M.; Okamoto, T.; Terada, T.; Sata, T. *Anesth. Analg.* **2005**, *101* (1), 290–293.
[187] Elder, D. P.; Delaney, E.; Teasdale, A.; Eyley, S.; Reif, V. D.; Jacq, K.; Facchine, K. L.; Oestrich, R. S.; Sandra, P.; David, F. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99* (7), 2948–2961.
[188] Masuda, N.; Negoro, S.; Hausheer, F.; Nakagawa, K.; Matsui, K.; Kudoh, S.; Takeda, K.; Yamamoto, N.; Yoshimura, N.; Ohashi, Y.; Fukuoka, M. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2011**, *67* (3), 533–542.
[189] Mao, S.; Taylor, S.; Chen, Q.; Zhang, M.; Hinek, A. *J. Cell. Mol. Med.* **2019**, *23* (7), 4592–4600.
[190] Bharate, S. S. *J. Drug. Deliv. Sci. Technol.* **2021**, *66* (1), 102913–102925.

était d'exploiter la réaction d'ouverture de sultones par l'anion [^{18}F]fluorure développée pour la première fois au laboratoire, et qui permet la formation de la liaison C-^{18}F tout en libérant simultanément le groupe sulfonate.[191] En parallèle, nous avons développé un partenaire TCO, à partir du peptide NeoBOMB1, dans le but d'investigations par pré-ciblage.

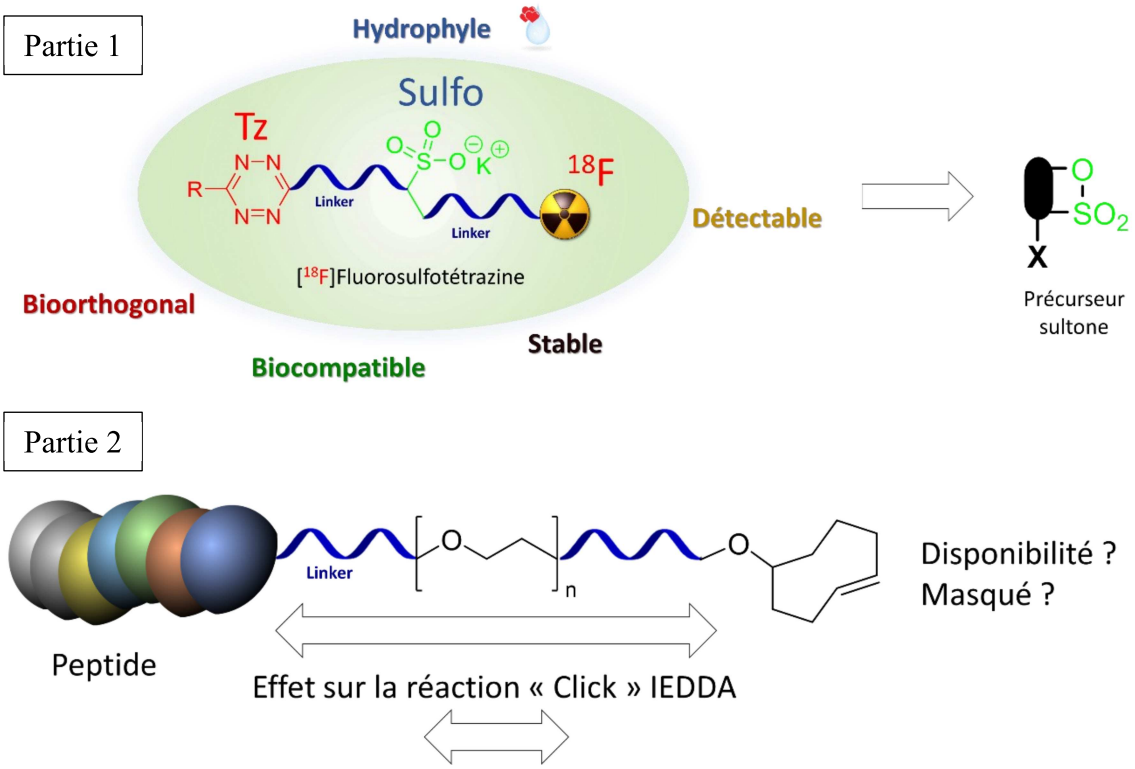


Figure 10: Objectifs et stratégie des travaux de thèse.

Q. Réaction d'ouverture du cycle sultone

Le terme « sultone » a été introduit pour la première fois par Erdmann en 1888 en contractant les termes soufre et lactone pour décrire la 1,8-naphthosultone (Schéma 19).[192] Ce terme désigne un ester sulfonique cyclique. Les cycles sultones décrits dans la littérature comportent 4 à 15 atomes (en incluant l'atome de soufre et un atome d'oxygène), et sont nommés avec plusieurs dénominations possibles suivant la nomenclature utilisée. Ainsi les cycles à 6 chainons sont appelés 1,4-butanesultone, butane-1,2-sultone, butane-δ-sultone ou encore 1,2-oxathiane-2,2-dioxide. L'atome de soufre a priorité sur l'atome d'oxygène, et la numérotation de l'enchainement carboné, qu'elle soit avec les chiffres arabes ou les lettres grecs, commence donc par le carbone en α du soufre (Schéma 19).

[191] Schmitt, S.; Bouteiller, C.; Barré, L.; Perrio, C. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (41), 11465–11467.
[192] Erdmann, H. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1888**, *247* (3), 306–366.

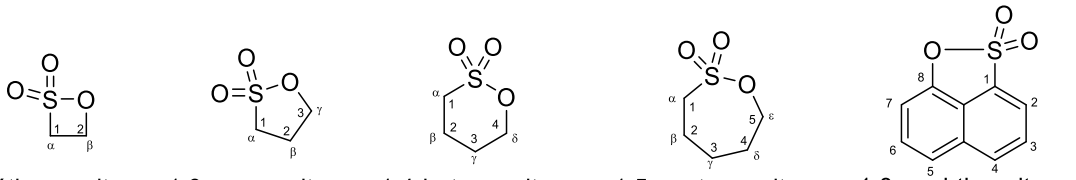
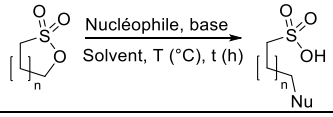
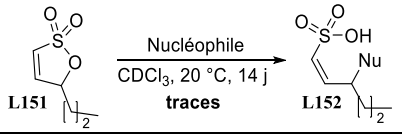
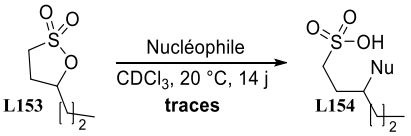
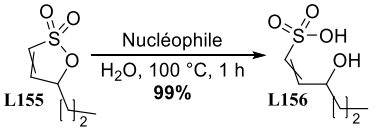
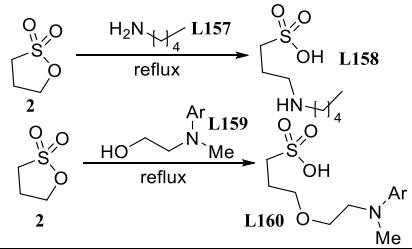
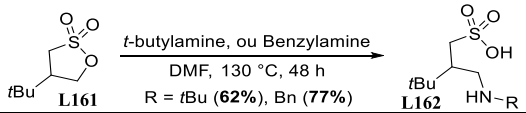
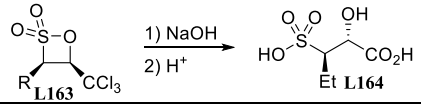


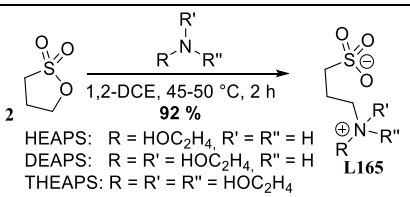
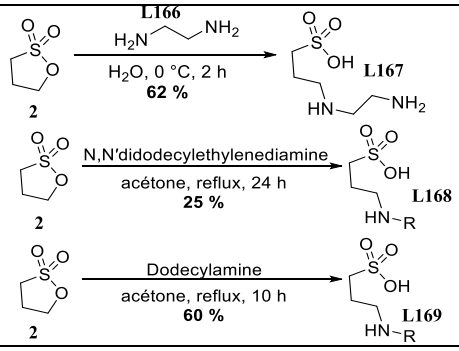
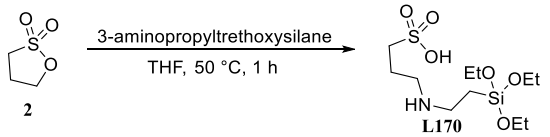
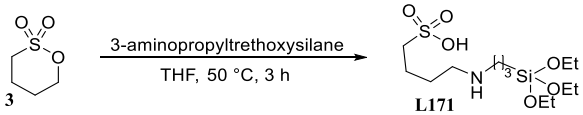
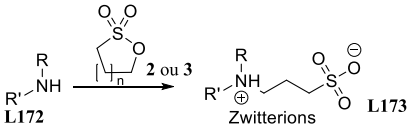
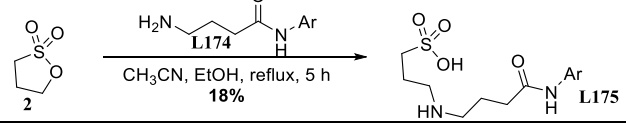
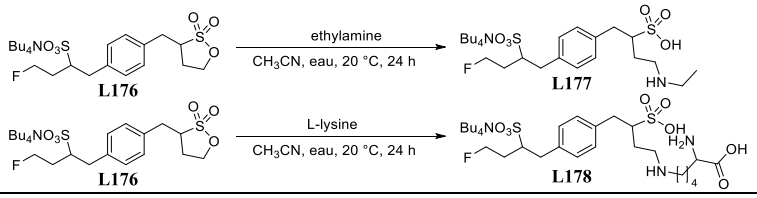
Schéma 19 : Quelques exemples des sultones les utilisés dans la littérature avec la nomenclature commerciale.

L'ouverture du cycle sultone par addition des nucléophiles est déjà bien connue et abondante dans la littérature. Nous ne répèterons que les publications les plus récentes entre 2001 et 2022. Cette littérature est résumée dans le tableau 6 et le tableau 7.

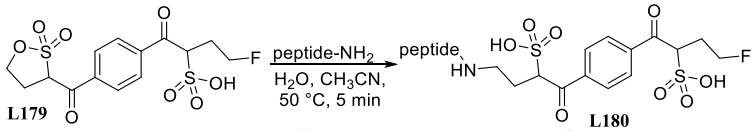
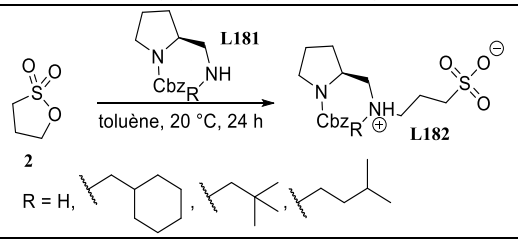
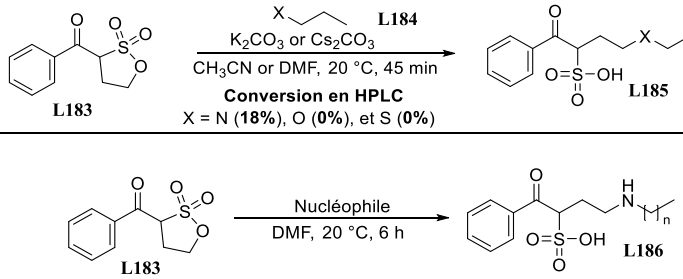
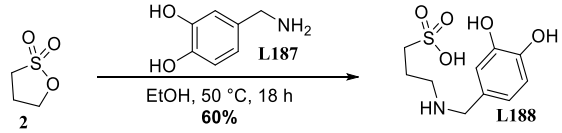
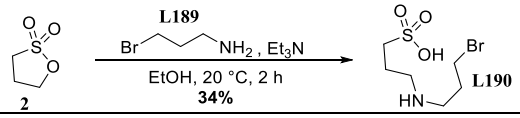
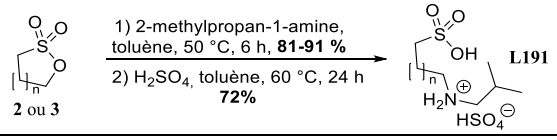


Entrée	Réactions	Références	Date
1		Meschkat *et al*[193]	**2001**
			
	 Nucléophiles = $BuNH_2$, Et_2NH, imidazole, *n*PrSNa, PhONa		
2		Wang *et al*[194,195]	**2007**
3		Bachand *et al*[196]	**2007**
4		Koch et Peters[197]	**2007**

[193] Meschkat, E.; Barratt, M. D.; Lepoittevin, J.-P. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14* (1), 110–117.
[194] Wang, H.; Lu, Z.; Lord, S. J.; Moerner, W. E.; Twieg, R. J. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (19), 3471–3474.
[195] Wang, Y.; Han, Y.; Huang, X.; Cao, M.; Wang, Y. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *319* (2), 534–541.
[196] Bachand, B.; Atfani, M.; Samim, B.; Lévesque, S.; Simard, D.; Kong, X. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (49), 8587–8589.
[197] Koch, F. M.; Peters, R. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2007**, *46* (15), 2685–2689.

5		Fang *et al*[198]	**2008**
6		Sakai *et al*[199,200]	**2009**
7		Tripathi et Shahi[201]	**2009**
8	(THF, 60 °C, 8 h)	Yang *et al*[202]	**2012**
9	(THF, 60 °C, 2 h, **92%**)	Ma *et al*[203]	**2014**
10		Chen *et al*[204]	**2012**
11	(THF, 50 °C, 1 h, puis 20 °C, 12 h)	Zhai *et al*[205]	**2020**
12	(toluène, reflux, 5 h)	Ng *et al*[206]	**2013**
13		Wang *et al*[207]	**2013**
14		Bouyssou *et al*[208]	**2009**
15		Schmitt *et al*[191]	**2011**
16		Bouteiller *et al*[209]	**2011**

[198] Fang, D.; Fei, Z.; Liu, Z. *Monatsh. Chem.* **2008**, *139* (7), 799–803.
[199] Sakai, K.; Wada, M.; Matsuda, W.; Tsuchiya, K.; Takamatsu, Y.; Tsubone, K.; Endo, T.; Torigoe, K.; Sakai, H.; Abe, M. *J. Oleo Sci.* **2009**, *58* (8), 403–413.
[200] Sakai, K.; Kaji, M.; Takamatsu, Y.; Tsuchiya, K.; Torigoe, K.; Tsubone, K.; Yoshimura, T.; Esumi, K.; Sakai, H.; Abe, M. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2009**, *333* (1–3), 26–31.
[201] Tripathi, B. P.; Shahi, V. K. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2009**, *1* (5), 1002–1012.
[202] Yang, M.; Xu, F.; Wang, C.; Liu, X.; Yan, P.; Li, P.; Welz-Biermann, U. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, *2012* (28), 4500–4506.
[203] Ma, W.; Wang, W.; Liang, Z.; Hu, S.; Shen, R.; Wu, C. *Kinet. Catal.* **2014**, *55* (5), 665–670.
[204] Chen, L.; Sun, L.; Zeng, R.; Xiao, S.; Chen, Y. *J. Power Sources* **2012**, *212* (1), 13–21.
[205] Zhai, W.; Wang, M.; Song, J.; Zhang, L.; Li, X.-M.; He, T. *Sep. Purif. Technol.* **2020**, *239* (1), 116589–116598.
[206] Ng, E.-P.; Mohd Subari, S. N.; Marie, O.; Mukti, R. R.; Juan, J.-C. *Appl. Catal. A: Gen.* **2013**, *450* (1), 34–41.
[207] Wang, C.; Liu, X.; Yang, M.; Ma, H.; Yan, P.; Slattery, J. M.; Gao, Y. A *RSC Adv.* **2013**, *3* (23), 8796–8805.
[208] Bouyssou, T.; Rudolf, K.; Hoenke, C.; Lustenberger, P.; Schnapp, A.; Konetzki, I. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (17), 5237–5240.
[209] Bouteiller, C. WO2011018467A1, February 17, **2011**.

	 Peptide = Boc-Lysine-H (**7%**), Boc-Arg-Gly-Asp-H (RGD, **1%**)	Priem *et al*[210]	**2012**
17		Qia *et al*[211]	**2011**
18		Priem *et al*[210]	**2012**
19	 (NH4OH (28%), EtOH, 50 °C, 18 h, **80%**) (NH4OH (28%), EtOH, 20 °C, 10 min, puis 65 °C, 18 h) (NH4OH (28%), EtOH, 50 °C, 72 h) (NH4OH (28%), EtOH, 50 °C, 72 h) (NH4OH (28%), EtOH, 65 °C, 72 h) (NH4OH (28%), EtOH, 65 °C, 72 h)	Wei *et al*[212] Chung et Huang[213] Huang *et al*[214] Mondini *et al*[215] Ruan *et al*[216] Han *et al*[217] Ding *et al*[218]	**2012** **2014** **2014** **2015** **2018** **2019** **2020**
20		MacNevin *et al*[219]	**2013**
21		Meng *et al*[220]	**2014**

[210] Priem, T.; Bouteiller, C.; Camporese, D.; Romieu, A.; Renard, P.-Y. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (5), 1068–1078.
[211] Qiao, Y.; Zhang, L.; Luo, S.; Cheng, J.-P. *Synlett* **2011**, *2011* (4), 495–498.
[212] Wei, H.; Insin, N.; Lee, J.; Han, H.-S.; Cordero, J. M.; Liu, W.; Bawendi, M. G. *Nano Lett.* **2012**, *12* (1), 22–25.
[213] Chung, Y.-C.; Huang, J.-Y. *Thin Solid Films* **2014**, *570* (1), 376–382.
[214] Huang, C.-J.; Wang, L.-C.; Shyue, J.-J.; Chang, Y.-C. *Langmuir* **2014**, *30* (42), 12638–12646.
[215] Mondini, S.; Leonzino, M.; Drago, C.; Ferretti, A. M.; Usseglio, S.; Maggioni, D.; Tornese, P.; Chini, B.; Ponti, A. *Langmuir* **2015**, *31* (26), 7381–7390.
[216] Ruan, H.; Zheng, Z.; Pan, J.; Gao, C.; Van der Bruggen, B.; Shen, J. *J. Membr. Sci.* **2018**, *550*, 427–435.
[217] Han, J.; Liang, G.; Xing, D. A *Chem. – Eur. J.* **2019**, *25* (35), 8353–8362.
[218] Ding, J.; Wu, H.; Wu, P. *J. Membr. Sci.* **2020**, *598* (1), 117658–117668.
[219] MacNevin, C. J.; Gremyachinskiy, D.; Hsu, C.-W.; Li, L.; Rougie, M.; Davis, T. T.; Hahn, K. M. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24* (2), 215–223.
[220] Meng, Y.; Liu, J.; Li, Z.; Wei, H. *J. Chem. Eng. Data* **2014**, *59* (7), 2186–2195.

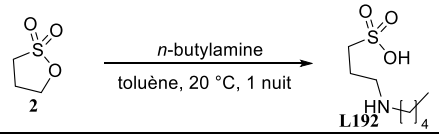
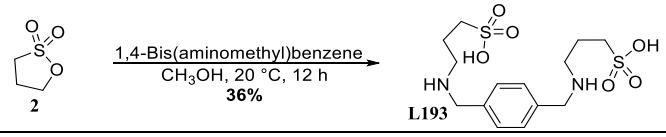
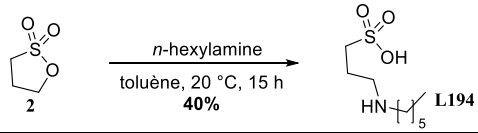
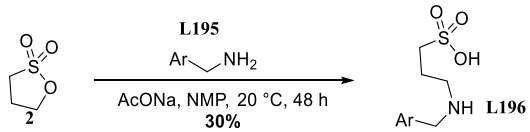
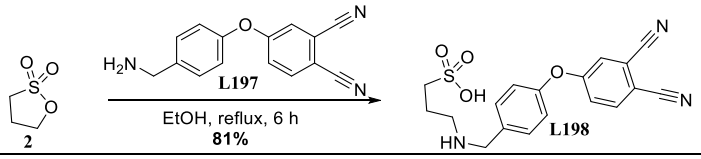
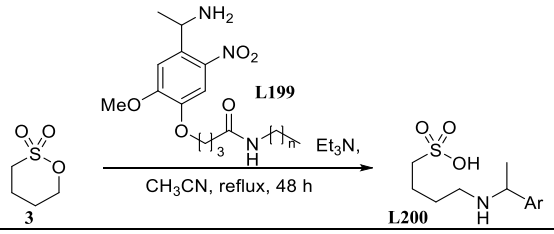
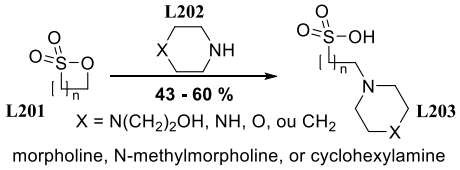
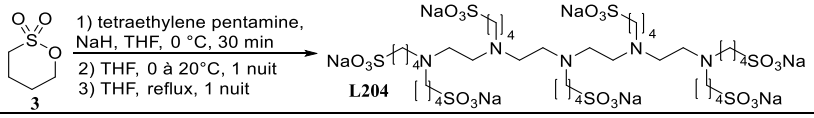
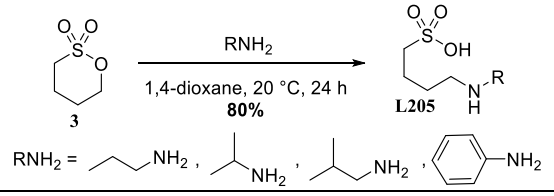
22		Yan *et al*[221]	**2015**
23		Yu *et al*[222]	**2015**
24		Fujisawa *et al*[223]	**2015**
25		MacNevin *et al*[224]	**2016**
26		Yuan *et al*[225]	**2016**
27		Hwang *et al*[226]	**2016**
28		Serlinger et Macartney[227]	**2017**
29		Zhou *et al*[228]	**2018**
30		Peng *et al*[229]	**2020**

Tableau 6 : Résumée de la littérature sous Scifinder[n] de l'ouverture des sultones par les amines et les alcools.

[221] Yan, P.; Xu, Z.; Zhang, C.; Liu, X.; Xu, W.; Zhang, Z. C. *Green Chem.* **2015**, *17* (11), 4913–4920.
[222] Yu, Y.; Li, J.; Zhang, M.; Cao, L.; Isaacs, L. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (18), 3762–3765.
[223] Fujisawa, K.; Humbert-Droz, M.; Letrun, R.; Vauthey, E.; Wesolowski, T. A.; Sakai, N.; Matile, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (34), 11047–11056.
[224] MacNevin, C. J.; Toutchkine, A.; Marston, D. J.; Hsu, C.-W.; Tsygankov, D.; Li, L.; Liu, B.; Qi, T.; Nguyen, D.-V.; Hahn, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (8), 2571–2575.
[225] Yuan, L.; Gui, L.; Wang, Y.; Zhang, Q.; Zhou, L.; Wei, S. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **2016**, *158* (1), 1–8.
[226] Hwang, L.; Guardado-Alvarez, T. M.; Ayaz-Gunner, S.; Ge, Y.; Jin, S. *Langmuir* **2016**, *32* (16), 3963–3969.
[227] Selinger, A. J.; Macartney, D. H. *RSC Adv.* **2017**, *7* (67), 42513–42518.
[228] Zhou, D.; Xiong, S.; Chen, L.; Cheng, X.; Xu, H.; Zhou, Y.; Liu, F.; Chen, Y. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (5), 563–566.
[229] Peng, Z.; Tang, L.; Yuan, Y.; Qu, J. *J. Coat. Technol. Res.* **2020**, *17* (2), 345–359.

Cette réaction a majoritairement été utilisée pour la synthèse de liquides ioniques à partir d'amines ou d'alcools. Elle est utilisée aussi dans la fonctionnalisation de films de silicate (tableau 6 entrée 7-12) pour la formation de nouveaux matériaux.

Erdmann en 1888 est l'un des premiers à avoir ouvert une sultone avec un nucléophile.[192] Cependant, il faut attendre les essaies de Meschkat *et al*,[193] Bachand *et al*,[196] Schmitt *et al*,[191] Priem *et al*[210] et Peng *et al*[229] (entrée 4, 15, 17 et 35) pour avoir un aperçu de la réactivité des sultones vis à vis de différentes amines. En résumé, les sultones s'hydrolysent très facilement en présence d'eau même à 0 °C. L'hydrolyse est quantitative en en chauffant à 100 °C. Les alcools et les thiols ouvrent difficilement les sultones à 20 °C, tandis-que les amines primaires et secondaires les ouvrent facilement. Les réactions sont réalisées dans des solvants anhydres (CH_3CN, DMF, toluène, THF, acétone, 1,4-dioxane et $CHCl_3$) à différentes températures 20, 50, 60, 80 et 130 °C. En général, à 20 ou 50 °C, l'ouverture des sultones donnent de bons rendements avec les amines. Les temps de réaction varient de 45 min à 72 h suivant l'amine utilisée, le plus souvent décrits entre 12 et 24 h. Certains auteurs ont introduit une base (K_2CO_3, Cs_2CO_3 ou NaH).

R. Réaction d'ouverture des sultones appliquée à la chimie et radiochimie du fluor

En 2011, le laboratoire a décrit pour la première fois l'ouverture des sultones par les ions fluorures et [^{18}F]fluorures (Schéma 20). Cette réaction permet la création d'une liaison C-$^{18/19}$F stable avec libération concomitante du groupe sulfonate. La littérature de cette fluoration par ouverture de sultone est résumée dans le tableau 7.

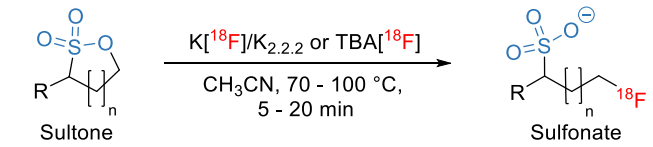
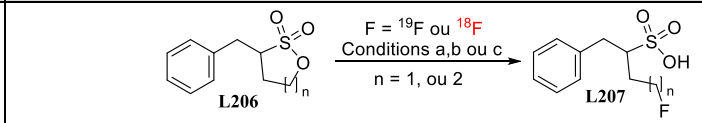
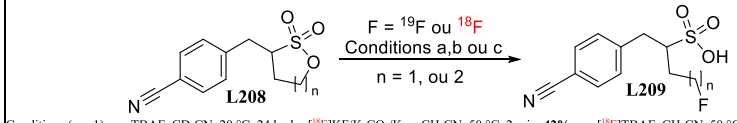
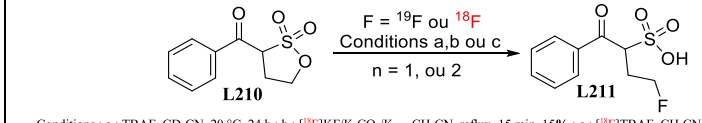
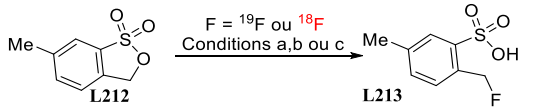
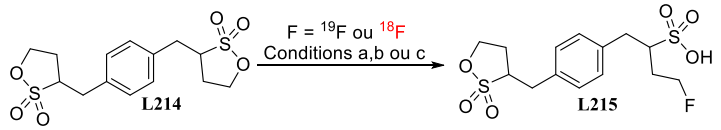
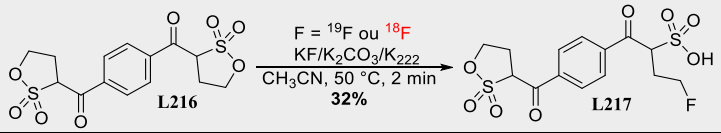
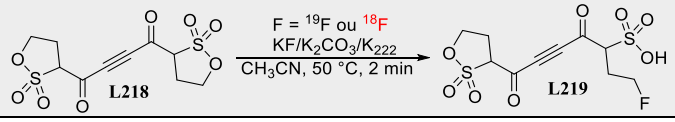
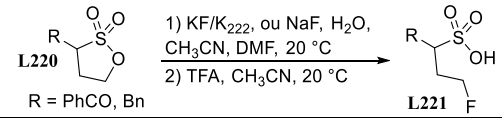
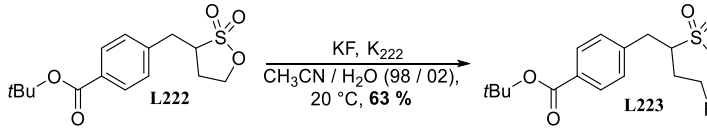
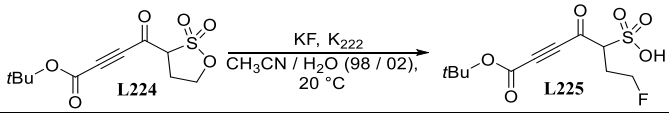
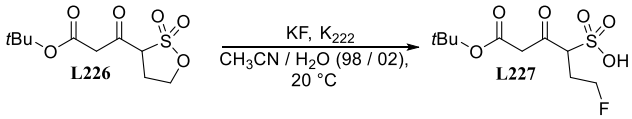
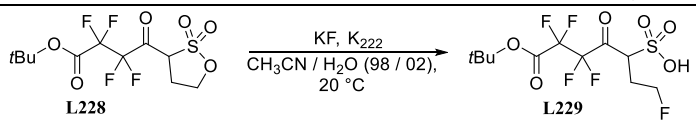
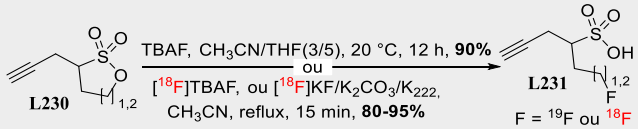


Schéma 20 : Réaction d'ouverture des sultones par addition nucléophile de fluorure [^{18}F]F$^-$ d'après Schmitt et al.[191]

Entrée	Réactions	Références	Date
1	 Conditions (n = 1) : a : TBAF, CD_3CN, 20 °C, 24 h ; b : [18F]KF/K_2CO_3/K_{222}, CH_3CN, 50 °C, 2 min, **80%** ; c : [18F]TBAF, CH_3CN, 50 °C, 2 min, **80%.** (n = 2) : a : TBAF, CD_3CN, 20 °C, 24 h ; b : [18F]KF/K_2CO_3/K_{222}, CH_3CN, reflux, 5 min, **65%** ; c : [18F]TBAF, CH_3CN, reflux, 5 min, **65%.**	Schmitt *et al*[191]	2011
2	 Conditions (n = 1) : a : TBAF, CD_3CN, 20 °C, 24 h ; b : [18F]KF/K_2CO_3/K_{222}, CH_3CN, 50 °C, 2 min, **42%** ; c : [18F]TBAF, CH_3CN, 50 °C, 2 min, **42%.** (n = 2) : a : TBAF, CD_3CN, 20 °C, 24 h ; b : [18F]KF/K_2CO_3/K_{222}, CH_3CN, reflux, 5 min, **60%** ; c : [18F]TBAF, CH_3CN, reflux, 5 min, **60%.**		
3	 Conditions : a : TBAF, CD_3CN, 20 °C, 24 h ; b : [18F]KF/K_2CO_3/K_{222}, CH_3CN, reflux, 15 min, 15% ; c : [18F]TBAF, CH_3CN, reflux, 15 min, **15%.**		
4	 Conditions : a : TBAF, CD_3CN, 20 °C, 24 h ; b : [18F]KF/K_2CO_3/K_{222}, CH_3CN, 20 °C, 5 min, **85%** ; c : [18F]TBAF, CH_3CN, 20 °C, 5 min, **85%**		
5	 Conditions : a : TBAF, CD_3CN, 20 °C, 24 h, **94%** ; b : [18F]KF/K_2CO_3/K_{222}, CH_3CN, 70 °C, 5 min, **67%** ; c : [18F]TBAF, CH_3CN, 70 °C, 5 min, **67%**		
6		Bouteiller *et al*[252]	2011
			
7		Priem *et al*[210,230]	2012
8	 Autres conditions for KF, Cs_2CO_3/K_{222} : CH_3CN/H_2O (**23-32%**), EtOH (**20%**), *t*BuOH (**86%**), Amylol (**70%**), *i*PrOH (**90%**)		
			
			
			
9		Lafargue *et al*[231,232]	2016

[230] Priem, T.; Bouteiller, C.; Camporese, D.; Brune, X.; Hardouin, J.; Romieu, A.; Renard, P.-Y. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *11* (3), 469–479.
[231] Lafargue, A.-E.; Perrio, C. FR3068695 A1, FR3068695B1, WO2019008119, August 16, 2019.
[232] Lafargue, A.-E. Thèse, Caen, **2016**.

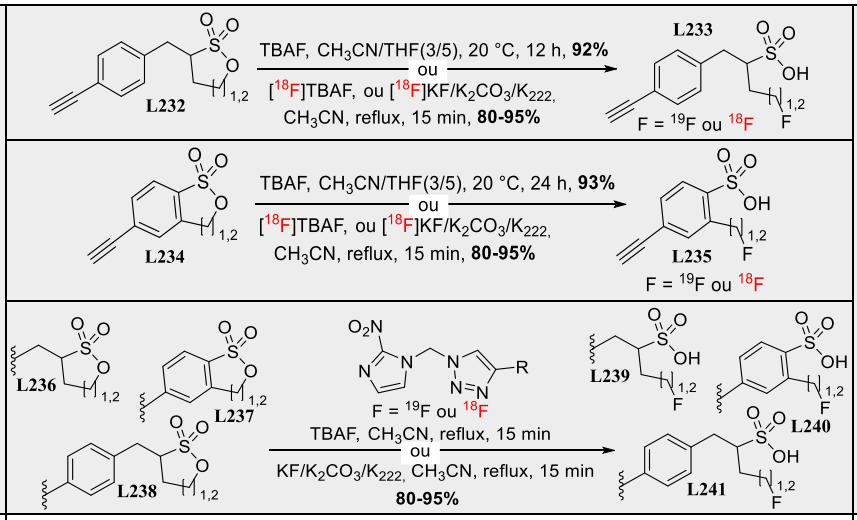
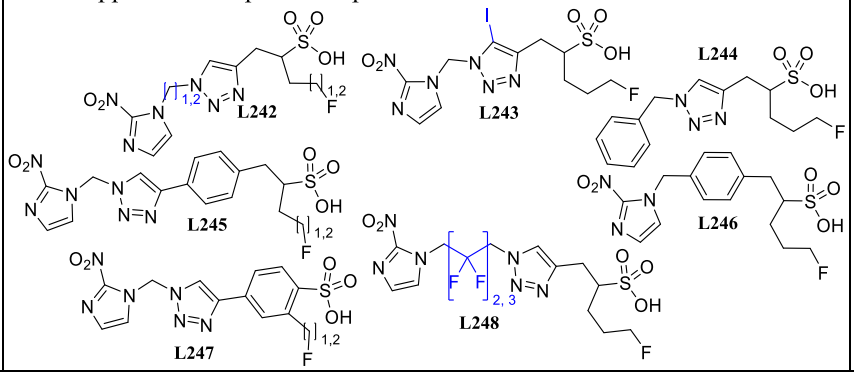
			
10	Application du protocole précédent aux dérivés de FLUSONIM : 	Maingueneau *et al*[233]	2019

Tableau 7 : Bibliographie de la fluoration des sultones par ouverture de cycle.

Cette réaction a été validée avec les benzylsultones (tableau 7 entrée 1). En fluoration non radioactive, la réaction est réalisée avec le fluorure de tétra-*n*-butylammonium (TBAF) dans l'acétonitrile (CH_3CN) et un co-solvant (THF ou DMF) à différentes température (20, 50, ou à reflux) pendant 2 min à 24 h. En radiochimie, elle est réalisée avec le mélange [^{18}F]KF/K_2CO_3/K_{222} dans l'acétonitrile (CH_3CN) et un co-solvant (THF ou DMF) à différentes température (20, 50 ou à reflux) pendant 2 min à 30 min. Les rendements radiochimiques sont très dépendants des sultones de départ.

Une extension de cette réaction a été développée à partir des bissultones pour des approches de bioconjugaison (tableau 7 entrée 5). Cette approche a été reprise par Priem *et al* pour le radiomarquage de peptides avec la bissultone. (tableau 7 entrée 6). Très récemment, cette méthodologie a été exploitée pour le développement du [^{18}F]FLUSONIM, un radiotraceur de structure nitro-imidazolique (tableau 7 entrée 9) pour l'imagerie TEP de l'hypoxie, qui s'est révélé être un radiotraceur de haute performance.

[233] Maingueneau, C. Thèse, Normandie Université, **2019**.

S. Organisation et plan des travaux

Notre stratégie a donc été de développer une sulfotétrazine radiofluorée à partir d'un précurseur sultone, de structure tétrazinique si possible, et d'exploiter la réaction d'ouverture avec le [^{18}F]flurorure pour l'introduction du radioisotope (Figure 10).

Le chapitre 2 décrit nos travaux de synthèse des précurseurs tétrazinesultones.

Le chapitre 3 décrit le développement, de la radiosynthèse à l'évaluation *in vivo*, d'une [^{18}F]fluorosulfotétrazine. Des analogues fluorescents et chélates sont également décrits.

Le chapitre 4 décrit les dérivés NeoBOMB1-PEG$_n$-TCO et leur évaluation dans la réaction IEDDA avec une tétrazine radiomarquée à l'In-111 et au Lu-177. Ce chapitre comprend en outre les travaux réalisés, les rappels bibliographiques concernant le NeoBOMB1 et l'objectif concernant l'étude de l'influence de la longueur de l'espaceur de type PEG$_n$ sur la réaction IEDDA.

Chapitre

II

Synthèse des tétrazinesultones

2 Synthèse des tétrazinesultones

La stratégie de synthèse des tétrazinesultones visée est basée sur le « couplage » entre les deux entités : les sultones et les tétrazines. Celles-ci devront être convenablement fonctionnalisées (Schéma 21). Nous nous sommes tout d'abord focalisés sur la synthèse de sultones fonctionnalisées. Nous avons conçu ensuite les tétrazines partenaires selon la nature de sultones obtenues.

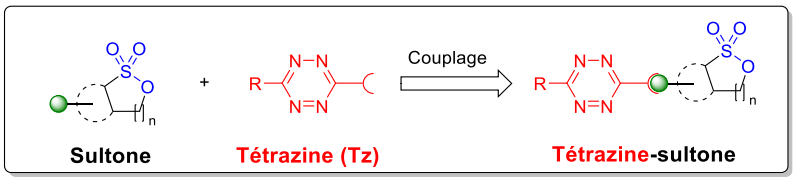


Schéma 21 : Stratégie générale de synthèse des tétrazine sultones.

Le chapitre débute ainsi par la préparation des sultones fonctionnalisées. Il présente ensuite les voies envisagées pour accéder aux tétrazinesultones avec la structure des tétrazines partenaires. Il se termine par les travaux de synthèse des tétrazinesultones.

A. Synthèse des sultones

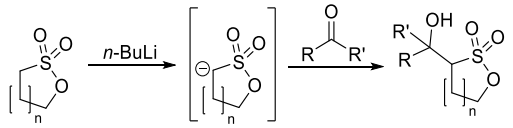
1. Rappel bibliographique

Les synthèses de sultones sont basées sur deux stratégies.[234,235,236,237,238,239,240] La première implique la construction du cycle sultone. Cette voie, qui ne sera pas détaillée dans ce manuscrit, met en jeu un panel de réactions comme la sulfonation d'oléfines, la réaction de Julia-Kociensky ou les cycloadditions intermoléculaires ou intramoléculaires (réactions entre un sulfonate et un carbanion (CSIC), réactions de Diels-Alder ou de métathèse à partir de sulfonates insaturés…).[196,241,242,243,244,245,246] Ces réactions ont permis la synthèse de sultones complexes mais elles nécessitent le plus souvent la préparation du ou des précurseur(s) par une synthèse multi-étapes limitant grandement le rendement global.

[234] Mustafa, A. *Elsevier*, **1961**, 183–198.
[235] Durst, T.; Tin, K.-C. *Can. J. Chem.* **1970**, *48* (5), 845–851.
[236] Mondal, S. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (10), 5339–5355.
[237] Pustenko, A.; Žalubovskis, R. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2017**, *53* (12), 1283–1285.
[238] Gaunersdorfer, C.; Waser, M. *Monatsh. Chem.* **2018**, *149* (4), 701–714.
[239] Azevedo, O. D. C. C.; Heron, B. M.; Zonidis, D. *Targets Heterocycl. Syst.* **2020**, *24* (1), 33–57.
[240] Xu, Y.; Zhang, Z.; Shi, J.; Liu, X.; Tang, W. *Arab. J. Chem.* **2021**, *14* (4), 103037–1030361.
[241] Plietker, B.; Seng, D.; Fröhlich, R.; Metz, P. *Tetrahedron* **2000**, *56* (6), 873–879.
[242] Boyer, J. L.; Gilot, B.; Canselier, J. P. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* **1984**, *20* (3), 259–271.
[243] Enders, D.; Wallert, S.; Runsink, J. *Synthesis* **2003**, *2003* (12), 1856–1868.
[244] Karsch, S.; Schwab, P.; Metz, P. *Synlett* **2002**, *2002* (12), 2019–2022.
[245] Majumdar, K. C.; Mondal, S.; Ghosh, D. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (33), 4781–4784.
[246] Wolckenhauer, S. A.; Devlin, A. S.; Du Bois, J. *Org. Lett.* **2007**, *9* (21), 4363–4366.

La seconde stratégie repose sur la fonctionnalisation en α de l'atome de soufre d'une sultone déjà formée. Cette approche exploite le caractère acide du proton en alpha du soufre pour l'introduction de divers électrophiles après déprotonation. Elle se décompose alors en trois phases : lithiation de la sultone de départ avec le *n*-butyllithium (*n*-BuLi), réaction avec l'électrophile puis hydrolyse (Tableau 8). À notre connaissance, elle a été exclusivement développée à partir de la propanesultone **2** et de la butanesultone **3** disponibles commercialement et elle reste peu utilisée. Elle a été décrite initialement par Durst *et al* (en 1969), puis par Smith *et al* (en 1981) avec comme électrophiles les dérivés carbonylés (acétone, benzophénone, benzaldéhyde),[247,248,249] ou halogénés (bromure de benzyle, iodure de méthyle, bromure d'allyle).[250,251] À part le méthyle, il n'y a aucune réaction décrite pour introduire une chaine alkyle. Chang *et al* l'a déclinée en 2015 avec le bromure de propargyle silylé. Notre groupe l'a reprise dans les années 2010 en utilisant des bromures de benzyle fonctionnalisés et le bromure de propargyle non protégé (Tableau 8A, entrées 7-10 ; et Tableau 8B, entrées 1 et 6-10). Enfin, nos travaux ont été poursuivis en 2011-2012 par le groupe de Renard avec l'utilisation de dérivés téréphtalates.[191,210,230,232,233,252,253] L'ensemble des résultats montrent que l'efficacité de la réaction dépend de la nature de l'électrophile et de la taille du cycle de la sultone de départ. Globalement, les rendements sont meilleurs à partir de la butanesultone **3** versus la propanesultone **2**, et avec les électrophiles carbonylés comparés aux halogénures.

[247] Smith, M. B.; Wolinsky, J., *J. Org. Chem.* **1981**, *46* (1), 101–106.
[248] Durst, T.; Manoir, J. du. *Can. J. Chem.* **1969**, *47* (7), 1230–1233.
[249] Faust, A.; Hermann, S.; Roth, J.; Schaefers, M.; Vogl, T. WO2016067238A1, **2016**.
[250] Margelefsky, E. L.; Zeidan, R. K.; Dufaud, V.; Davis, M. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (44), 13691–13697.
[251] Chang, C.-C.; Letteri, R.; Hayward, R. C.; Emrick, T. *Macromolecules* **2015**, *48* (21), 7843–7850.
[252] Bouteiller, C. WO2011018467A1, **2011**.
[253] Priem, T.; Bouteiller, C.; Camporese, D.; Romieu, A.; Renard, P.-Y. WO2014079979A1, **2014**.



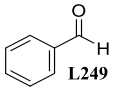
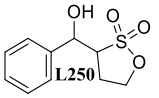
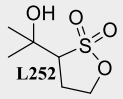
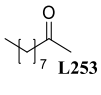
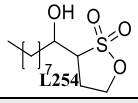
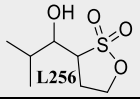
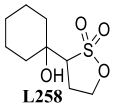
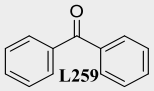
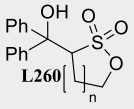
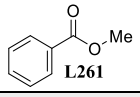
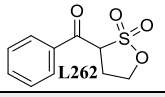
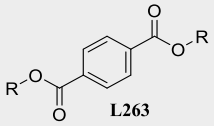
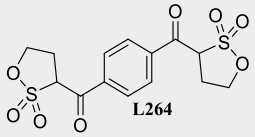
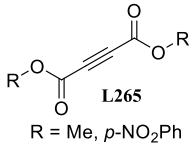
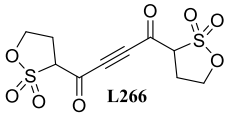
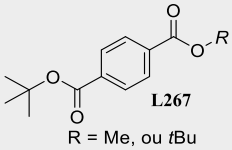
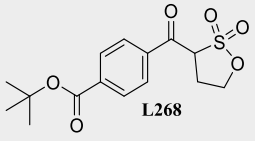
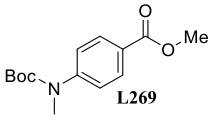
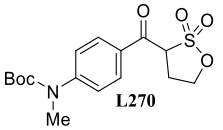
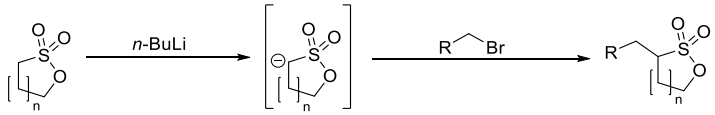
Entrée	Réactif	Produit	Rendement (%)	Référence	Date
1	 L249	 L250	88	Durst et Manoir[248]	1969
2	L251	 L252	61		
			50	Smith et Wolinsky[247]	1981
3	 L253	 L254	58		
4	L255	 L256	35		
5	L257	 L258	81	Durst et Manoir[248]	1969
			42	Smith et Wolinsky[247]	1981
6	 L259	 L260	65 (n = 1)	Durst et Manoir[248]	1969
			63 (n = 2)		
			49 (n = 1)	Smith et Wolinsky[247]	1981
7	 L261	 L262	30	Schmitt *et al*[191]	2011
			60	Priem *et al*[210]	2012
8	 L263 R = Me, *p*-NO_2Ph	 L264	40		
			40	Bouteiller *et al*[252,253]	2011
9	 L265 R = Me, *p*-NO_2Ph	 L266	40		
10	 L267 R = Me, ou *t*Bu	 L268	51	Priem *et al*[210,253]	2012
11	 L269	 L270	41	Faust *et al*[249]	2015

Tableau 8A : Sultones fonctionnalisées en α du soufre par des aldéhydes, cétones ou esters.



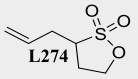
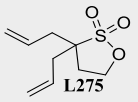
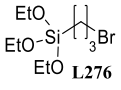
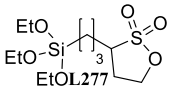
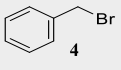
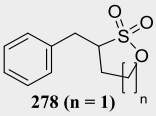
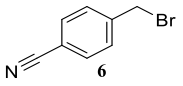
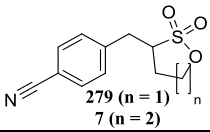
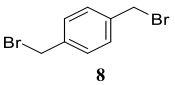
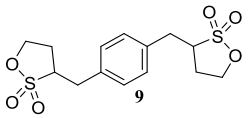
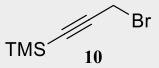
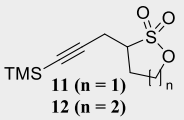
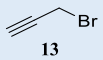
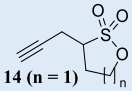
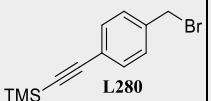
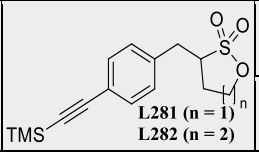
Entrée	Réactif	Produit	Rendement (%)	Référence	Date
1	CH_3I **L271**	**L272**	62	Durst et Manoir[248]	1969
			39	Smith et Wolinsky[247]	1981
2	**L273**	 **L274**	49	Chang *et al*[251]	2015
			47	Smith et Wolinsky[247]	1981
3		 **L275**	6		
4	 **L276**	 **EtOL277**	19	Margelefsky *et al*[250]	2007
5	 **4**	 **278 (n = 1)** **5 (n = 2)**	49 (n = 1)	Durst et Manoir[248]	1969
			60 (n = 1)	Smith et Wolinsky[247]	1981
			74 (n = 1)	Schmitt *et al*[191]	2011
			90 (n = 2)		
6	 **6**	 **279 (n = 1)** **7 (n = 2)**	63 (n = 1)	Schmitt *et al*[191]	2011
			57 (n = 2)		
7	 **8**	 **9**	34		
8	 **10**	 **11 (n = 1)** **12 (n = 2)**	39 (n = 1)	Chang *et al*[251]	2015
			34 (n = 1)	Lafargue *et al*[232]	2016
			32 (n = 2)		
9	 **13**	 **14 (n = 1)** **15 (n = 2)**	35 (n = 1)		
			40 (n = 2)		
10	 **L280**	 **L281 (n = 1)** **L282 (n = 2)**	80 (n = 1)		
			78 (n = 2)		

Tableau 8B : Sultones fonctionnalisées en α du soufre par des dérivés halogénés.

2. Fonctionnalisation des propane et butanesultones 2 et 3 : résultats

2.1. Avec des électrophiles carbonylés (aldéhydes et cétones)

Nous avons repris la réaction de fonctionnalisation de butanesultone **3** avec le formaldéhyde, l'acétone, le benzaldéhyde et l'acétophénone (Schéma 22). La lithiation a été réalisée avec le *n*-BuLi dans le tétrahydrofurane (THF) à -78 °C pendant 45 min, et la réaction avec l'électrophile à -67 °C pendant 5 h ou à -78 °C pendant 3 h. Les rendements en sultones correspondantes **16-18** ont été très satisfaisants (78-91%) sauf pour la sultone **19** obtenue avec le formaldéhyde (7%). Ce plus faible rendement peut être expliqué par l'hydratation du formaldéhyde le rendant moins réactif et conduisant à plus de sous-produit d'hydrolyse.

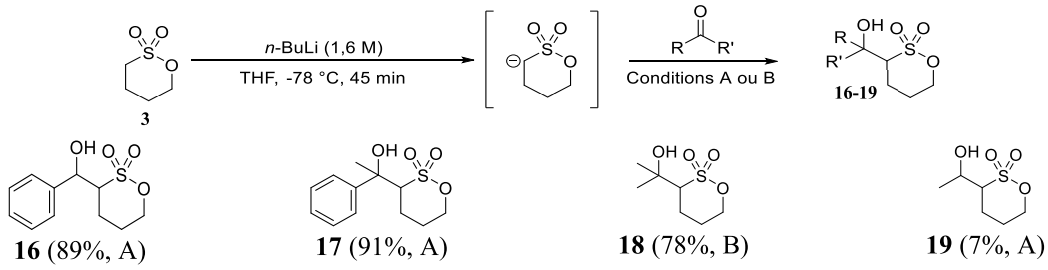


Schéma 22 : Fonctionnalisation de 1,4-butanesultone par des aldéhydes ou cétones (A : -67 °C, 5 h ; B : -78 °C, 3 h).

Compte-tenu de ces résultats, notre objectif était d'étendre cette réaction à des tétrazines portant une fonction aldéhyde ou cétone. Cependant, nous n'avons trouvé dans la littérature que 3 synthèses de tétrazines aldéhydiques (Schéma 23). Quinton *et al* a réalisé l'oxydation de la bistolyltétrazine **21** (issus de la réaction de Pinner du *p*-tolunitrile **20**) avec le CAN (nitrate de cérium et d'ammonium) à 80 °C dans un mélange d'acétonitrile (CH_3CN), de dichlorométhane (DCM) et d'eau (H_2O).[254] Cette réaction conduit au mélange des mono et bisaldéhydes **283** et **284** avec un rendement de 10% seulement. Le même groupe a obtenu la bisaldéhydetétrazine **284** par déprotection du précurseur bisacétal **286** en milieu acide avec un rendement faible de 18%. En 2017, Wieczorek *et al* décrit la synthèse des tétrazines aldéhydiques **288** par oxydation des tétrazines alcools **287** correspondantes avec le réactif de Dess-Martin (DMP) **289** dans le DCM pendant 1 à 2 h avec des très bons rendements compris entre 73 et 96%.[255] Cependant, ces composés restent difficiles à purifier en raison de leur instabilité, et la préparation des tétrazines alcools **287** précurseurs par la réaction de Pinner n'est pas efficace. Pour ces raisons, nous n'avons pas envisagé la synthèse de tétrazines aldéhydiques.

[254] Quinton, C. Thèse de doctorat, École normale supérieure de Cachan - ENS Cachan, **2013**, 131.
[255] Wieczorek, A.; Werther, P.; Euchner, J.; Wombacher, R. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (2), 1506–1510.

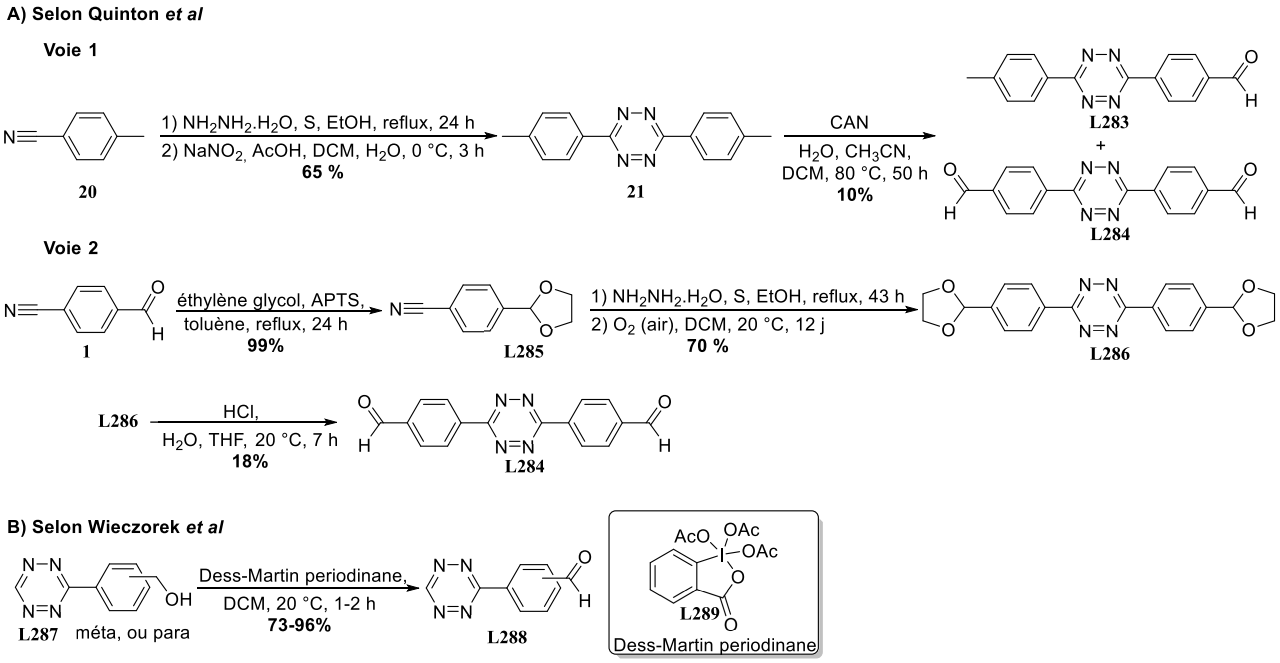


*Schéma 23 : Synthèse de tétrazines aldéhydiques **283** et **284** (A) selon Quinton et al[254] et **288** (B) selon Wieczorek et al.[255]*

2.2. Avec des électrophiles bromés

Nous nous sommes tournés vers l'alkylation de la propanesultone **2** et de la butanesultone **3** avec différents bromés comme nous l'avions déjà exploré au laboratoire précédemment. Nous avons tout d'abord reproduit les synthèses décrites des bissultones **9** et **22**, de la sultone benzylée **5** et des sultones propargyliques **11-15** (Schéma 24). Nous avons obtenu des rendements similaires ou satisfaisants par rapport à ceux obtenus précédemment au laboratoire. Nous constatons aussi que la fonctionnalisation de la butanesultone **3** est plus efficace que celle de la propanesultone **2**. Le rendement de 54% obtenu pour la benzylsultone **5** à partir du bromure de benzyle **4** nous a amenés à envisager pour la suite la même réaction avec un bromure de benzyle tétrazinique (cf. suite du projet).

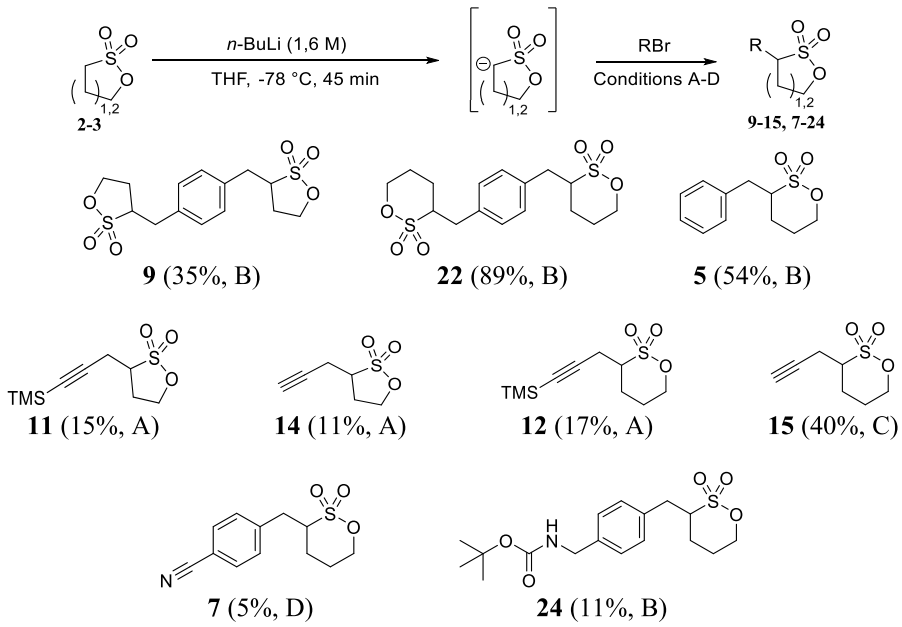


Schéma 24 : Fonctionnalisation de 1,4-butanesultone par des dérivés bromés (A : -78 °C, 3 h puis -60 °C, 1 h ; B : -78 °C, 5 h ; C : -78 °C, 30 min ; D : -78 °C, 3 h)

Nous avons aussi étendu cette réaction aux bromures de benzyle **6** et **23** portant une fonction nitrile ou amine protégée par un groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc) pour accéder aux butanesultones nitrile **7** et amine **24** (Schéma 24). Ces deux sultones représentaient en effet des réactifs valorisables pour la synthèse de tétrazinesultones (Schéma 25). Nous comptions engager la butanesultone nitrile **7** directement dans la réaction de Pinner avec l'acétonitrile pour obtenir directement la tétrazinesultone correspondante (stratégie 1) et l'aminosultone **24** déprotégée du groupement Boc dans un couplage peptidique avec une tétrazine portant une fonction carboxylique (stratégie 2). Cependant, les faibles rendements obtenus en sultones **7** et **24** (5 et 10%) ne nous ont pas conduits à poursuivre ces voies.

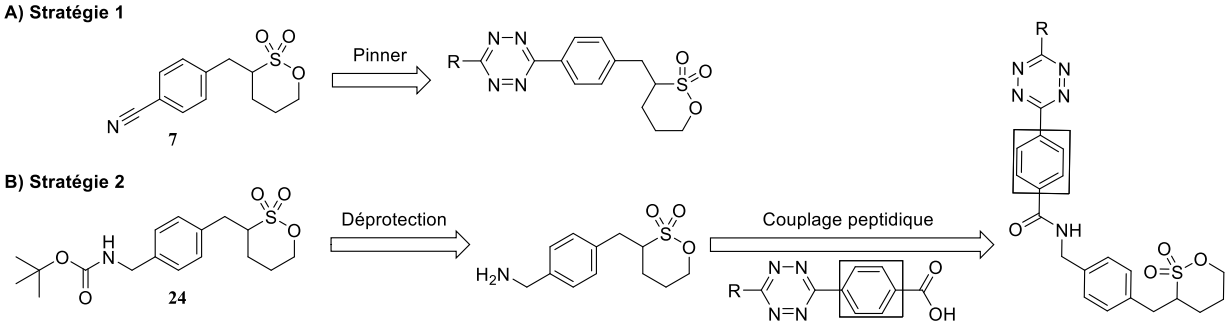


*Schéma 25 : Stratégies envisagées pour obtenir les tétrazinesultones à partir des sultones 7 et **24**.*

Notre intérêt s'est alors focalisé sur la butanesultone propargylique **15** obtenue avec un rendement de 40%, modeste mais acceptable. En effet, la fonction acétylénique permettait d'envisager des réactions de couplage de Sonogashira ou de CuAAC avec une tétrazine appropriée (cf. suite du projet). Nous avons donc cherché à optimiser sa préparation.

2.3. Essais d'optimisation de la sultone propargylique 15

La synthèse de la sultone propargylique **15** a été initialement réalisée avec un rendement de 40% après déprotonation de la butanesultone **3** avec le *n*-butyllithium (*n*-BuLi) dans le THF à -78 °C pendant 30 min puis réaction avec le bromure de propargyle **13** à – 78 °C pendant 30 min. Nous avons cherché à optimiser cette réaction. Les essais d'optimisation ont été réalisés en fixant le temps de 6 h pour l'étape d'alkylation (Schéma 26).

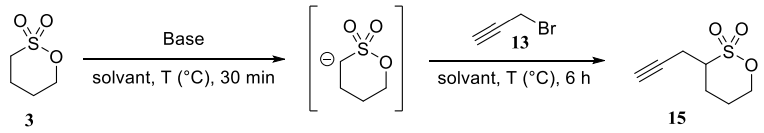


*Schéma 26 : Optimisation de la synthèse de la sultone **15**.*

a) Influence de la base

Nous avons d'abord changé le nombre d'équivalent de *n*-BuLi (1, 2 ou 5 équiv.) sans observé de changement sur le rendement en sultone **15** (40%). Nous avons remplacé le *n*-BuLi par le *tert*-butylate de potassium (*t*BuOK), le 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU), le bis(triméthylsilyl)amidure de lithium (LiHMDS), l'hydrure de sodium (NaH), le diisopropylamidure de lithium (LDA), le *sec*-butyllithium (*s*-BuLi) ou le *tert*-butyllithium (*t*-BuLi). La sultone **15** n'a été obtenue qu'avec l'emploi de *s*-BuLi et *t*-BuLi, sans augmentation du rendement par rapport à l'utilisation de *n*-BuLi. Seules les bases les plus fortes ($pK_b > 45$) peuvent déprotoner en α du soufre. Les autres bases ont conduit aux produits d'ouverture de la sultone. La sultone de départ **3** n'étant pas non plus récupérée en fin de réaction. En effet, l'ouverture du cycle par attaque nucléophile de la base est la réaction concurrente de la lithiation en α du soufre.

b) Influence du milieu réactionnel

La nature du solvant et celle du milieu réactionnel peuvent jouer un rôle important dans les réactions mettant en jeu un organolithien. En effet, les organolithiens s'organisent sous la forme de complexes ou d'agrégats dont le degré d'association varie en fonction de la polarité du milieu.[256,257] Ces différences impactent leur réactivité. Nous avons, dans la réaction avec le

[256] Williard, P. G.; Li, W.; Kagan, G.; Hopson, R. *Arkivoc* **2011**, *2011* (5), 180–187.
[257] Bulling, B. W. Dissertation, University of Pretoria, **2018**.

n-BuLi, remplacé le THF par le *n*-hexane, le toluène ou l'éther diéthylique (Et_2O). Les rendements ont chuté dans tous les cas (*n*-hexane : 10% ; toluène 11% ; Et_2O : 20% versus THF : 40%). L'ajout d'un additif tel que la tétraméthyléthylènediamine (TMEDA), la 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine (TMP) ou l'iodure de potassium (KI) a eu un effet néfaste et n'a jamais permis d'obtenir la sultone propargylique **15**.

c) Influence de la concentration

Nous avons fait varier les concentrations de butanesultone **3** de départ entre 0,05 et 3,26 M (Figure 11). Le rendement optimum de 40% environ a été trouvé pour des concentrations comprises entre 0,4 et 1,2 M. À 2,0 M, le rendement chute à 27%. Aux concentrations supérieures à 3 M, la sultone devient insoluble dans le THF.

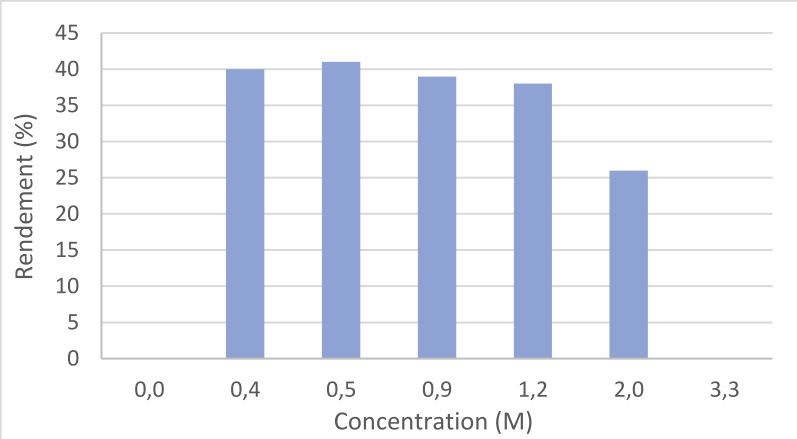


*Figure 11 : Influence de la concentration en sultone de départ **3** sur le rendement.*

d) Influence de la température

Nous avons réalisé la déprotonation à -78 °C et à - 30 °C pendant 30 min, et l'étape d'alkylation pendant 6 h à des températures fixes de - 78, -60, -40 ou -20 °C, ou allant de -78 à 18 °C sur 6 h (Tableau 9). Les meilleurs rendements (40%) ont été obtenus pour une température de -78 °C pour les deux étapes, déprotonation et alkylation (entrée 1). Ils chutent considérablement pour la déprotonation à -30 °C (entrée 2), et pour l'alkylation à -60, -40 et 20 °C (entrées 3-5). Une remontée de la température de -78 °C jusqu'à -10 °C pour l'étape d'alkylation n'a pas d'incidence significative sur le rendement (entrées 6-8). Les rendements sont sensiblement diminués pour une remontée à 0 °C (entrée 9) et deviennent nuls à 18 °C (entrée 10). Nous avons donc conservé -78 °C pour les deux étapes de la réaction.

Entrée	Température (°C)		Rendement (%)
	Lithiation	Alkylation	
1	-78	-78	40
2	-30	-30	4
3	-78	-60	12
4	-78	-40	1
5	-78	-20	0
6	-78	-78 à -60	12-38
7	-78	-78 à -40	38
8	-78	-78 à -10	38
9	-78	-78 à 0	26-33
10	-78	-78 à 18	0

*Tableau 9 : Influence de la température dans la synthèse de la sultone propargylique **15**.*

e) Influence du temps

L'influence du temps de réaction (10 min, 30 min, 1 h et 3 h) a tout d'abord été examinée pour l'étape de déprotonation (le temps d'alkylation étant maintenant à 6 h). Nous n'avons pas observé de réelle influence sur le rendement qui est resté compris entre 39 et 42%. Nous avons alors conservé le temps de 30 min. Ensuite nous avons fixé le temps d'alkylation à 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 5, 6, 8 et 24 h (Figure 12). Le rendement optimal (40%) a été obtenu pour des temps de 30 min à 5 h. Au-delà de 5 h, les rendements chutent progressivement jusqu'à 10% après 24 h (lithien peu stable).

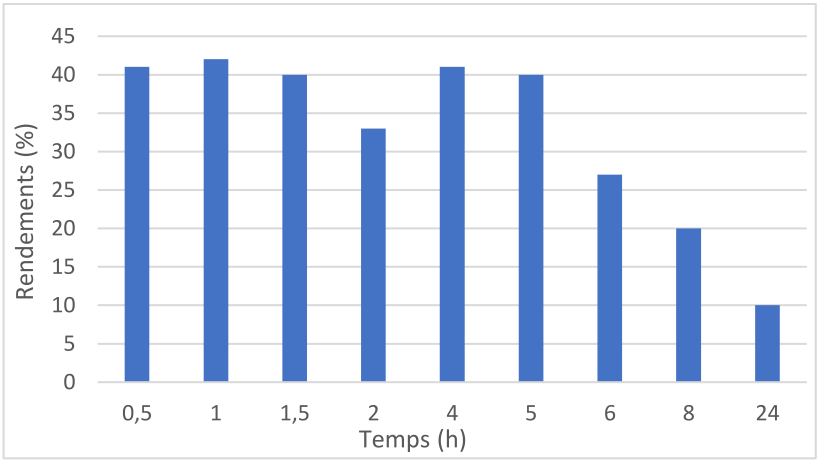


*Figure 12 : Influence du temps de l'étape d'alkylation lors de la synthèse de la sultone propargylique **15**.*

Nous avons également examiné l'influence de la vitesse d'ajout des réactifs. Nous avons utilisé un pousse-seringue automatique permettant d'avoir une très bonne reproductibilité dans l'addition du *n*-BuLi et du bromure de propargyle **13**. Les rendements sont restés égaux à 40-41%. Enfin, nous avons comparé les additions goutte-à-goutte, soit successivement soit simultanément, du *n*-BuLi et du bromure de propargyle **13**. Les rendements ont été de l'ordre

de 38-42% pour l'addition successive et légèrement supérieurs de 44-45% pour l'addition simultanée.

f) Pureté

En plus des optimisations de synthèse, nous avons été amenés à développer un protocole de purification de la sultone propargylique **15**. Une purification sur colonne de silice avec un mélange *n*-pentane/Et_2O est souvent insuffisante pour obtenir la sultone **15** avec une grande pureté qui se présente alors comme une poudre blanche jaunâtre. Nous l'avons obtenue sous forme d'une poudre blanche après sublimation et sous forme de cristaux incolores translucides après cristallisation par vapo-diffusion dans le mélange *n*-pentane/DCM (20/1). Ce gain de pureté a amené de meilleurs rendements en radiochimie.

g) Bilan

Les essais d'optimisation de la synthèse de la sultone **15** n'ont pas permis d'augmenter le rendement au-delà de 40-45%. Nous avons cependant considéré qu'il était acceptable pour envisager l'exploitation de la sultone **15** dans la suite de l'étude.

3. Conclusion

En accord avec les résultats déjà obtenus au laboratoire, nous avons constaté que la fonctionnalisation de la butanesultone **3** était plus efficace que celle de la propanesultone **2**. Nous avons synthétisé 8 butanesultonesultones fonctionnalisées **5**, **7**, **15**, **16**, **17**, **18**, **22** et **24** avec des rendements compris entre 5 et 91% (Schéma 27).

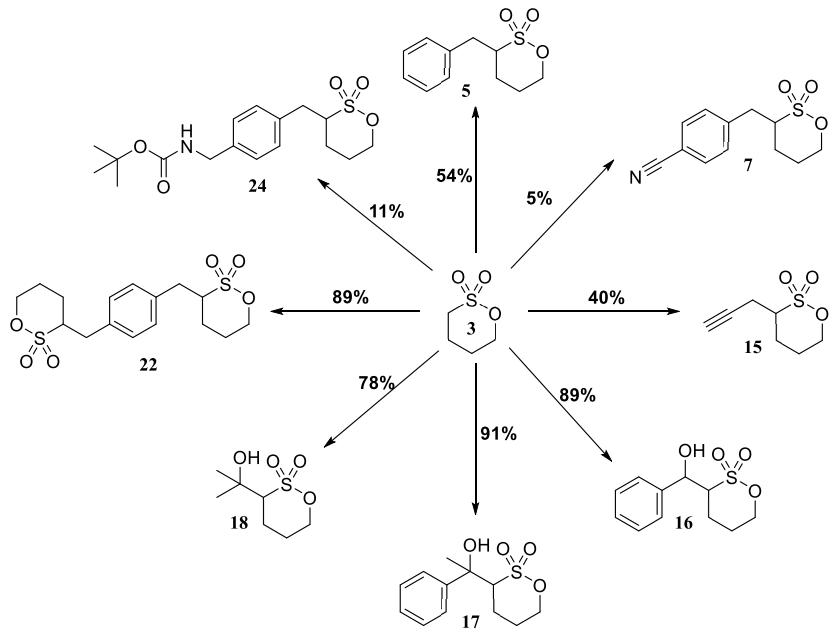


Schéma 27: Sultones retenues pour la suite du projet.

Sur la base des rendements et de la nature de la fonctionnalisation, nous n'avons sélectionné que la butanesultone propargylique **3** comme valorisable pour la synthèse d'une tétrazinesultone. Nous avons envisagé les deux stratégies de valorisation, par couplage de Sonogashira avec une tétrazine halogénée, et par CuAAC avec une azidotétrazine (Schéma 28). Nous avons également envisagé de fonctionnaliser la butanesultone commerciale **3** avec une tétrazine bromométhylée ou bromobenzylée selon la méthodologie validée avec l'exemple de la benzylsultone **5**.

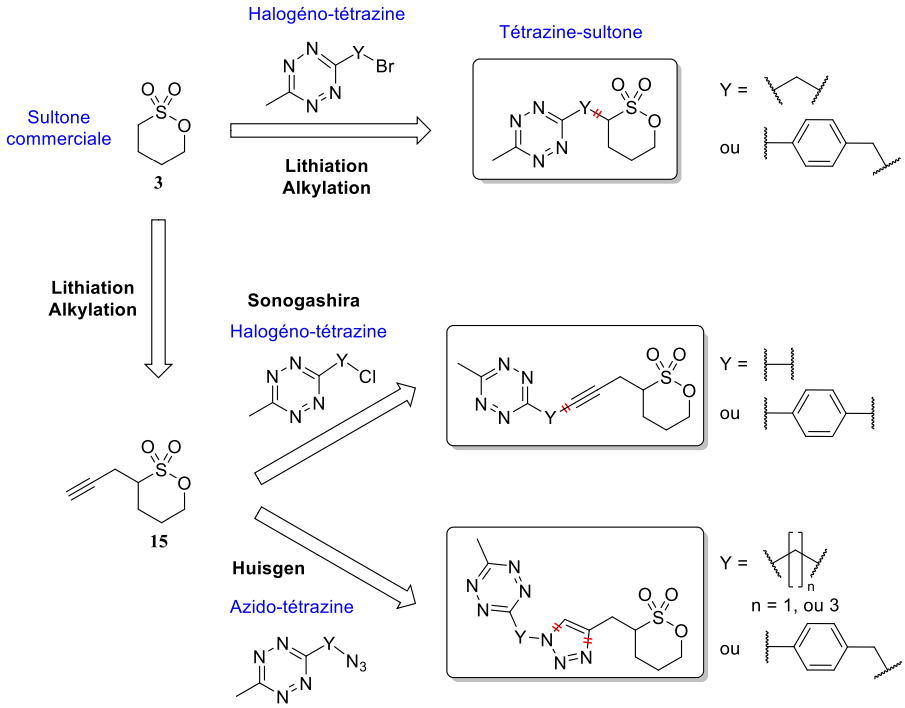


*Schéma 28 : Voies de synthèse envisagées des tétrazinesultones à partir de la butanesultone **3** commerciale et de de la butanesultone propargylique **15**.*

Pour les trois stratégies envisagées, nous nous sommes focalisés dans un premier temps sur les tétrazines portant un groupe méthyle reconnues comme étant relativement stables et faciles à manipuler. Une fois les synthèses mises au point, notre objectif était dans un second temps, d'accéder aux analogues hydrogénés ou pyridiniques établis comme plus réactifs dans les réactions de IEDDA (cf. chapitre 1, Réaction IEDDA, page 55).

B. Synthèse des tétrazinesultones

1. Fonctionnalisation de la butanesultone 3 commerciale avec les tétrazines halométhylées 25 et 27

Nous avons choisi les 2 tétrazines bromées **25** et **27** comme électrophiles dans la fonctionnalisation de la butanesultone **3** commerciale (Schéma 29). Les deux tétrazinesultones attendues sont les composés **26** et **28**.

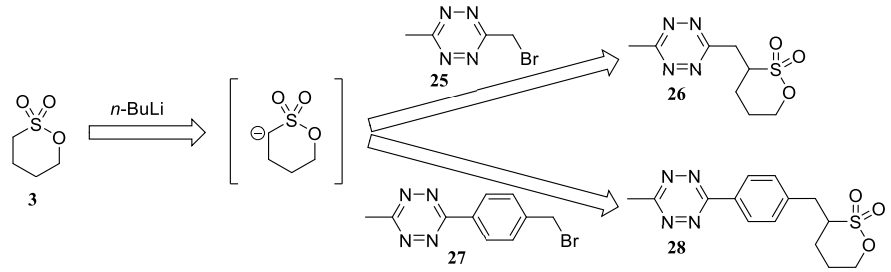


*Schéma 29 : Synthèses envisagées des tétrazinesultones **26** et **28** par fonctionnalisation de la butanesultone **3**.*

1.1. Synthèse de la 3-(bromométhyl)-6-méthyltétrazine 25

a) Littérature

En 2016, Wu et You décrivent pour la première fois la synthèse de la 3-(bromométhyl)-6-méthyltétrazine **25** (Schéma 30).[258] Cette synthèse est réalisée en 3 étapes :

- 1) réaction de Pinner entre la méthoxyacétonitrile **29**, l'acétonitrile (CH_3CN) et l'hydrazine (NH_2NH_2) anhydre en présence de trifluorométhanesulfonate de zinc ($Zn(OTf)_2$) dans le dioxane à 65 °C pendant 18 h suivie d'une oxydation par addition de nitrite de sodium ($NaNO_2$) et d'acide chlorhydrique (HCl) à un pH compris entre 2 et 3, qui conduit à la tétrazine **30** avec un rendement de 71%,

- 2) déprotection par le tribromure de bore (BBr_3) dans le DCM pendant 3 h pour former la 6-méthyltétrazineméthanol **31** avec un rendement de 87%,

- 3) bromation avec le *N*-bromosuccinimide (NBS) et la triphénylphosphine (PPh_3) dans le DCM pendant 2 h, réalisée avec un rendement de 83%.

La tétrazine bromée **25** est finalement obtenue avec un rendement global de 51%. En 2019, le groupe de Baalmann *et al* décrit la synthèse de la méthoxytétrazine **30** par réaction de Pinner légèrement modifiée.[259] L'oxydation est en effet réalisée avec le diacétate d'iodobenzène ($PhI(OAc)_2$ ou PIDA) et la méthoxytétrazine **30** est obtenue avec un rendement de seulement 20%.

[258] Wu, H.; You, J. CN106317112A, **2017**.
[259] Baalmann, M.; Ziegler, M. J.; Werther, P.; Wilhelm, J.; Wombacher, R. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30* (5), 1405–1414.

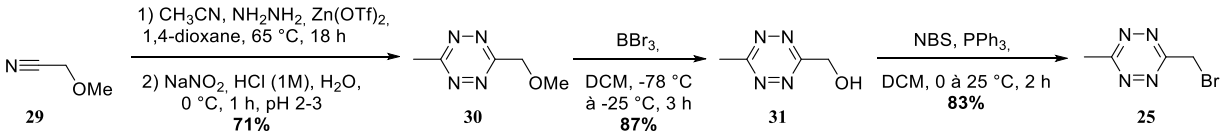


*Schéma 30 : Synthèse de la tétrazine bromée **25** par Wu et You.*[258]

b) Résultats

Nous avons tenté de reproduire la synthèse de la 3-(bromométhyl)-6-méthyltétrazine **25** selon Wu et You précédemment décrite mais sans succès (Schéma 31). En effet, nous avons détecté la formation majoritaire de la 3,6-diméthyltetrazine **32** symétrique en fin de réaction.

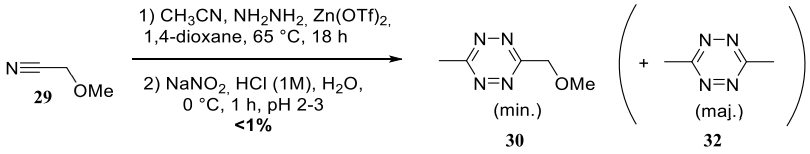


Schéma 31: Répétition du protocole de Wu et You.[258]

Nous avons alors choisi de réaliser la réaction de Pinner en suivant le protocole de Mao *et al* plus adapté à la synthèse de tétrazines dissymétriques (Schéma 32).[145] Ce protocole ne met pas en jeu le trifluorométhanesulfonate de zinc ($Zn(OTf)_2$) mais l'acide 3-mercaptopropionique ($HS(CH_2)_2CO_2H$). L'hydrazine (NH_2NH_2) anhydre est remplacée par l'hydrazine monohydratée et l'éthanol (EtOH) est ajouté comme co-catalyseur. Nous avons effectué la réaction à 40 °C pendant 24 h à pH 8-9. Lors de l'étape suivante d'oxydation, HCl est remplacé par l'acide formique (HCO_2H). La 3-(méthoxyméthyl)-6-méthyltétrazine **30** est isolé avec un rendement de seulement 2%. La tétrazine **30** est connue pour être très volatile à température ambiante. Ce faible rendement peut être expliqué par des pertes importantes dans les étapes de concentration et de séchage sous vide. Malgré ce résultat, nous avons poursuivi la synthèse et réalisé les deux étapes successivement de déméthylation avec le tribromure de bore et de bromation avec la *N*-bromosuccinimide (NBS) et la triphénylphosphine (PPh_3) comme décrit par Wu et You.[258] Nous avons récupéré la 3-(bromométhyl)-6-méthyltétrazine **25** avec un rendement de seulement 2%.

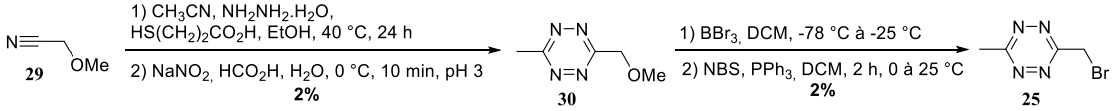


*Schéma 32 : Synthèse de la 3-(bromométhyl)-6-méthyltétrazine **25**.*

Nous avons alors envisagé une autre voie de synthèse impliquant seulement 2 étapes : la réaction de Pinner à partir d'acétonitrile pour obtenir la 3,6-diméthyltetrazine **32** symétrique et la monobromation de celle-ci (Schéma 33). La réaction de Pinner réalisée selon le protocole

de Mao *et al* a conduit à la 3,6-diméthyltetrazine **32** avec un excellent rendement de 98%. Cependant, tout comme les composés précédents, la tétrazine symétrique **32** est aussi très volatile à température ambiante ce qui limite son utilisation. Sa bromation a été effectuée avec la NBS et le peroxyde de benzoyle [$(PhCO_2)_2$ ou PBO] à 60-70 °C dans le chloroforme ou dichlorométhane à reflux pendant 21 h sans succès. En utilisant le tétrachlorométhane (CCl_4) comme solvant, le rendement a atteint seulement 17%.

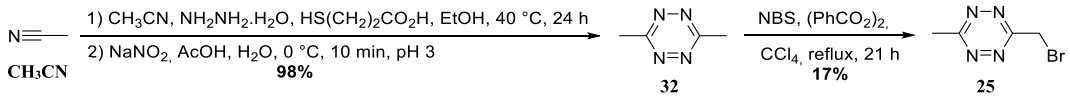


*Schéma 33 : Synthèse de la 3-(bromométhyl)-6-méthyltétrazine **25** par monobromation radicalaire de la diméthyltétrazine **32**.*

c) Conclusion

Quelle que soit la voie de synthèse utilisée, la 3-(bromométhyl)-6-méthyltétrazine **25** n'a pas été obtenue de façon efficace. Les difficultés rencontrées ont été la grande volatilité à température ambiante de cette tétrazine et des intermédiaires de synthèse. Les quantités obtenues en tétrazine **25** ont été suffisantes pour l'engager par la suite dans la réaction de fonctionnalisation de la butanesultone **3** (cf. 1.3p. 99).

1.2. Synthèse de la 3-(4-(bromométhyl)phényl)-6-méthyltétrazine 27

À notre connaissance, la tétrazine **27** n'est pas décrite dans la littérature. Comparée à la tétrazine **25**, elle présente plusieurs avantages :

1) de par sa masse molaire plus élevée, sa volatilité sera moindre,

2) le groupement phényl conjugué au cycle tétrazine permet de stabiliser fortement la tétrazine la rendant moins sensible aux nucléophiles.

La première synthèse, que nous avons envisagé, est la réaction de Pinner à partir du 4-(bromométhyl)benzonitrile **6** et de l'acétonitrile dans les conditions de Mao *et al*[145] avec l'hydrazine et l'acide mercaptopropionique dans l'éthanol, suivie de l'oxydation avec l'acide nitrique (HNO_2) (Schéma 34). Cependant, la 3-(4-(bromométhyl)phényl)-6-méthyltétrazine **27** n'a pas été observée en LC-MS dans le mélange réactionnel. On peut supposer plusieurs réactions concurrentes, notamment la substitution du brome par le thiol et l'hydrazine.

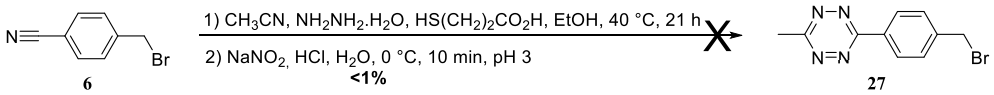


*Schéma 34 : Réaction de Pinner de la bromo-tétrazine **27** à partir du bromonitrile **6**.*

Nous nous sommes alors tournés vers une synthèse en deux étapes par formation puis bromation de la tétrazine intermédiaire **33** (Schéma 35).

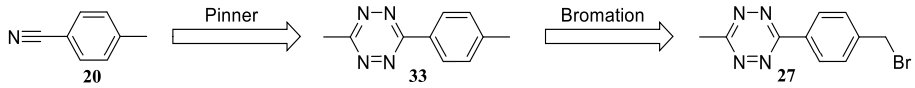


*Schéma 35 : Synthèse en deux étapes de la bromotétrazine **27**.*

La synthèse de la tétrazine **33** est décrite pour la première fois en 1975 par Lang *et al* (Schéma 36).[260] Elle débute par la conversion du *p*-tolunitrile **20** en 4-méthylbenzimidate d'éthyle **290** avec l'acide chlorhydrique dans l'éthanol. Le benzimidate **290** est ensuite mis à réagir avec l'acétamidine d'acétate **291** (obtenu par réaction de l'acétonitrile avec l'acide chlorhydrique et l'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) dans l'éthanol) et l'hydrazine hydratée à 20 °C pendant 3 h. L'oxydation par l'acide nitrique généré *in situ* à partir du nitrite de sodium et de l'acide acétique conduit à la tétrazine **33** avec un rendement global de 21%. Ce protocole a été repris en 2008 par Hu *et al* qui a obtenu un rendement global de 26% en effectuant la seconde étape à -10 °C (au lieu de 20 °C).[261]

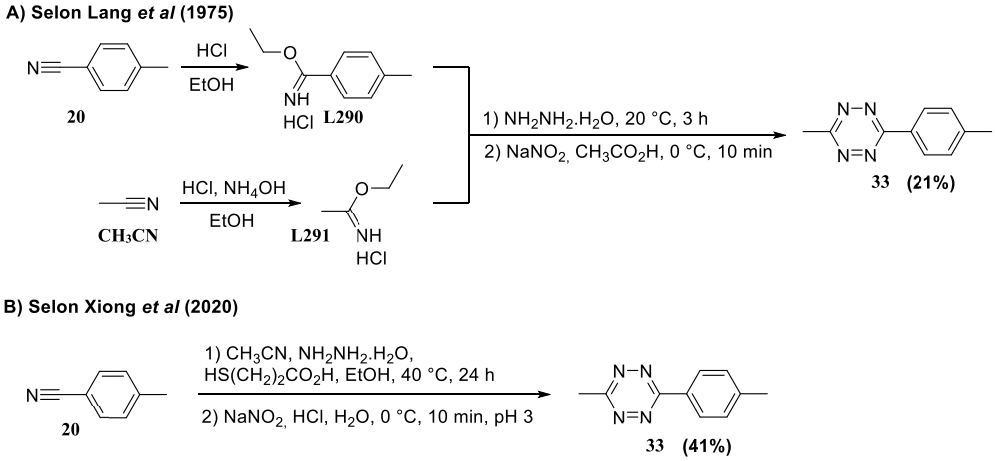


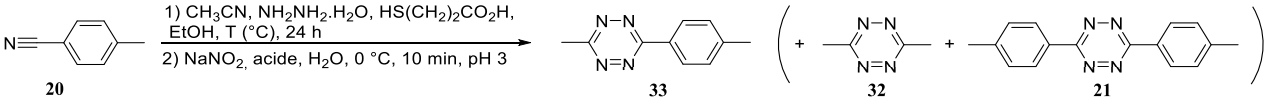
*Schéma 36 : Synthèse de la 3-méthyl-6-(p-tolyl)tétrazine **33** (A) selon Lang et al[260] et (B) selon Xiong et al.[262]*

En 2020, Xiong *et al* a repris le protocole de Mao *et al*[145] pour obtenir la tétrazine **33**. Le *p*-tolunitrile commercial **20** (1 equiv.) réagit à 20 °C pendant 18 h avec l'hydrazine

[260] Lang, J. S. A.; Cohen, E.; Sloboda, A. E. US3863010A, **1975**.
[261] Hu, W.-X.; Xu, F. Synthesis, *J. Heterocycl. Chem.* **2008**, *45* (6), 1745–1750.

monohydrate (16 equiv.) et l'acétonitrile (8 equiv.) en présence d'acide 3-mercaptopropionique (1 equiv.) et d'éthanol (3,5 equiv.). Ensuite, l'oxydation avec le nitrite de sodium et l'acide chlorhydrique à 0 °C à pH 3-4 conduit à la tétrazine **33** avec un rendement global de 41%.[262] La synthèse de la 3-méthyl-6-(*p*-tolyl)tétrazine **33** est toujours un enjeu important pour cette chimie avec, notamment, des brevets dont le plus récent date de mars 2022 en utilisant le $Zn(OTf)_2$ comme catalyseur et en oxydant par l'eau de Javel (NaClO).[263]

Avant que la synthèse de Xiong soit publiée, nous avions entrepris aussi d'utiliser le protocole de Mao *et al* pour obtenir la tétrazine **33**. Sans le savoir, nous avons utilisé exactement les mêmes conditions (quantités de réactifs, température, temps) mais nous n'avons obtenu qu'un rendement de 4% en tétrazine **33** (Tableau 10, entrée 1). Nous avons récupéré de façon prédominante les 3,6-diméthyltétrazine **32** et 3,6-di-*p*-tolyltétrazine **21**.



Entrée	CH_3CN (equiv.)	EtOH (equiv.)	Atm	T (°C)	$NaNO_2$ (equiv.)	Acide	Tz 33 (%)
1	8	3,5	Air	20	15	HCl (1M)	4
2	8	10	Air	40	15	HCl (1M)	49
3	6	2	N_2	40	5	HCO_2H (7M)	99

*Tableau 10 : Synthèse de la 3-méthyl-6-(p-tolyl)tétrazine **33**.*

Nous avons procédé à l'optimisation du protocole pour diminuer la formation des tétrazines symétriques **21** et **32**. Les quantités de chacun des réactifs ainsi que la température ont été modifiées. Les paramètres trouvés les plus importants ont été la quantité d'acétonitrile (6 equiv plutôt que 8) et d'éthanol (2 equiv plutôt que 3,5), la température (40 °C plutôt que 20) et la nature de l'acide (HCO_2H plutôt que HCl) dans l'étape d'oxydation. Dans ces nouvelles conditions, la 3-méthyl-6-(*p*-tolyl)tétrazine **33** a été obtenue avec un rendement brut (après traitement et extraction) de 99% (Tableau 10, entrée 3) et avec une pureté suffisamment élevée qui permet de s'affranchir d'une purification sur gel de silice. La tétrazine **33** a pu être sublimée et/ou recristallisée avec des bons rendements de 76%. Il est à noter que les spectres de RMN ^1H sont quasiment identiques avant et après sublimation ou recristallisation.

Nous avons ensuite engagé la tétrazine **33** dans la bromation radicalaire avec le *N*-bromosuccinimide et le peroxyde de benzoyle à reflux dans CCl_4 pendant 21 h (Schéma 37). La conversion est quantitative mais la réaction conduit à un mélange des 3 tétrazines bromées **27**, **34** et **35** très difficiles à séparer sur colonne. La tétrazine désirée **27** est le produit majoritaire avec un rendement estimé de 54%. La tétrazine dibromée **34** est présente de façon importante

[262] Xiong, H.; Gu, Y.; Zhang, S.; Lu, F.; Ji, Q.; Liu, L.; Ma, P.; Yang, G.; Hou, W.; Xu, H. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (34), 4692–4695.
[263] Liu, Z.; Tang, H.; Hu, Q.; Chen, W.; Zheng, C. CN114213351A, **2022**.

avec un rendement estimé de 43%. La tétrazine régioisomère **35** est, elle, à l'état de traces (8%). Ce résultat montre une régiosélectivité de la bromation. Cependant, nous n'avons pas pu optimiser la formation de la tétrazine **27** en utilisant comme initiateur radicalaire l' azobisisobutyronitrile (AIBN), en changeant la source de brome (Br_2 ou HBr), en remplaçant le tétrachlorométhane par le chloroforme, le dichlorométhane, l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle, l'acétonitrile ou l'acide acétique, ni en modifiant la température à 60, 70 ou à reflux.

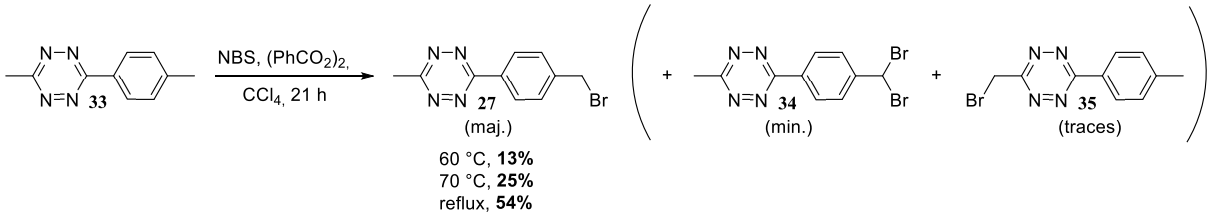


*Schéma 37 : Bromation radicalaire de la 3-méthyl-6-(p-tolyl)tétrazine **33**.*

Par analogie avec la bromation, nous avons tenté l'iodation de la 3-méthyl-6-(*p*-tolyl)tétrazine **33**. Nous nous sommes inspirés de deux protocoles d'iodation du toluène. L'un a été développé par Barluenga *et al* avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le diode (I_2), d'anhydride acétique (Ac_2O) et d'azoture de sodium (NaN_3) dans l'eau à 40 °C pendant 13 h.[264] L'autre a été développé par Ling *et al* avec l'hydroperoxyde de *tert*-butyle (TBHP), l'iodure de cuivre (CuI) et l'acide benzoïque ($PhCO_2H$) dans le *tert*-butanol à 80 °C pendant 5 h.[265] Dans tous les cas, la iodation de la tétrazine **33** n'a pas été un succès (<2%) (résultats non présentés).

1.3. Fonctionnalisation de la butanesultone 3 avec les bromotétrazines

Les deux tétrazines bromées **25** et **27** obtenues ont été utilisées dans la fonctionnalisation de la butanesultone **3**. La réaction commence par la déprotection de la butanesultone **3** en présence de *n*-butyllithium (*n*-BuLi) dans le tétrahydrofurane (THF) à -78 °C pendant 25 min (Schéma 38). Ensuite, les tétrazines **25** ou **27** sont ajoutées goutte-à-goutte dans le THF à -78 °C et le mélange est laissé sous agitation à -78 °C pendant 5 h. Les spectres de RMN ^1H montrent majoritairement la butanesultone **3** départ inchangée. Cependant, l'analyse LC-MS a bien mis en évidence les tétrazinesultones **26** et **28** (Figure 13). Des essais d'optimisation ont été réalisés pour la synthèse de la tétrazinesultone **28** en changeant la température de l'étape d'alkylation à -72, -60 et -40 °C ainsi qu'avec un gradient de température de -78 à -2 °C. Le gradient de température s'est avéré être les meilleures conditions et a permis d'isoler la tétrazinesultone **28** avec un rendement de 10% seulement. Nous n'avons pas poursuivi.

[264] Barluenga, J.; Campos-Gómez, E.; Rodríguez, D.; González-Bobes, F.; González, J. M. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2005**, *117* (36), 6001–6004.
[265] Ling, X.-G.; Xiong, Y.; Zhang, S.-T.; Huang, R.-F.; Zhang, X.-H. *Chin. Chem. Lett.* **2013**, *24* (1), 45–48.

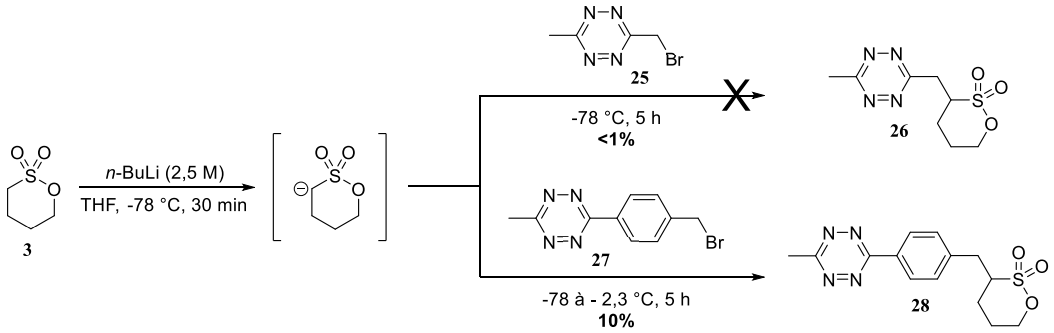


*Schéma 38 : Fonctionalisation de la butanesultone **3** par les bromotétrazines **25** et **27**.*

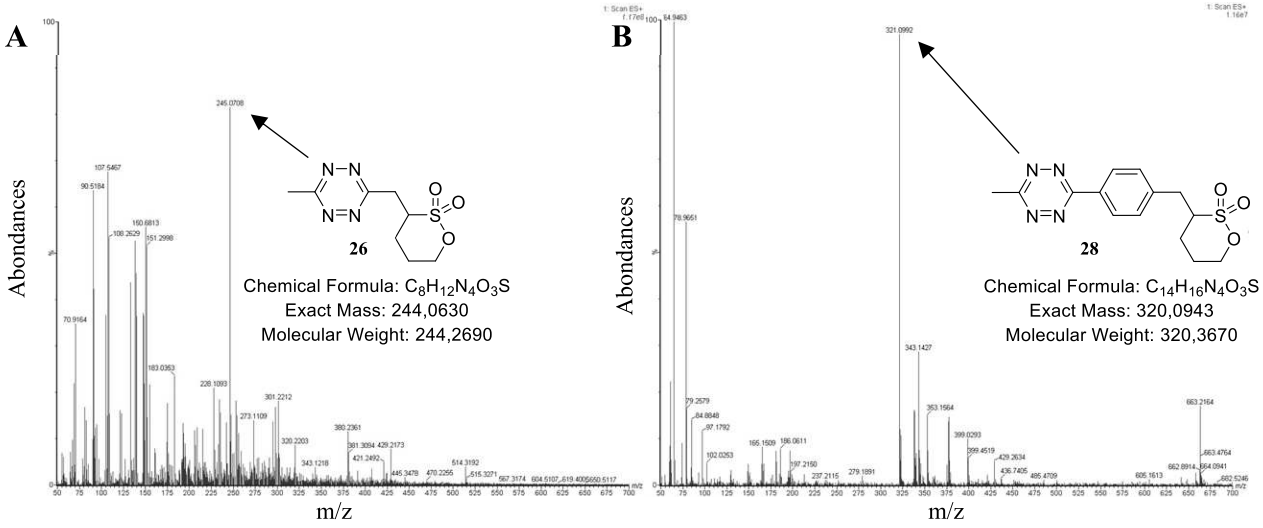


*Figure 13: Spectre de masse ESI$^+$ de la LC-MS des tétrazinesultones **26** (A) et **28** (B).*

1.4. Conclusion

La fonctionnalisation directe de la butanesultone **3** avec les tétrazines bromées **25** et **27** issues de la bromation des tétrazines **32** et **33** a conduit aux deux nouvelles tétrazinesultones **26** et **28** à l'état de traces seulement (Schéma 39). Nous n'avons pas poursuivi cette voie.

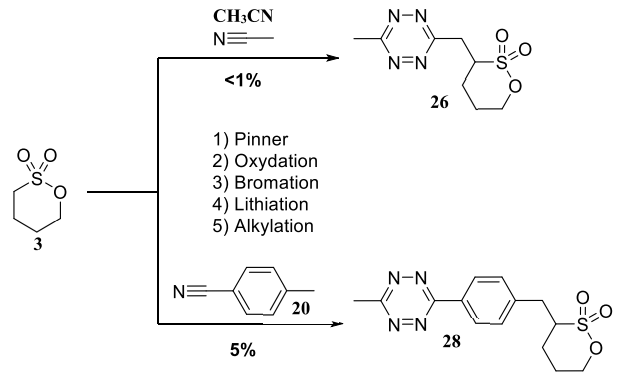


*Schéma 39 : Tétrazinesultones obtenues par alkylation de la butanesultone **3** commerciale.*

2. Couplage de Sonogashira entre la sultone propargylique 15 et une halogénotétrazine

2.1. Littérature

Le couplage de Sonogashira est utilisé pour former une liaison entre un carbone hybridé *sp²* des dérivés halogénés ou triflates hétéroaryles, vinyles ou alcényles et un carbone hybridé *sp* d'un alcyne terminal.[266] Les conditions de réaction standard impliquent généralement un catalyseur à base de palladium (0), d'un co-catalyseur à base de cuivre (I) et d'une quantité stœchiométrique de base dans un solvant organique (Schéma 40).

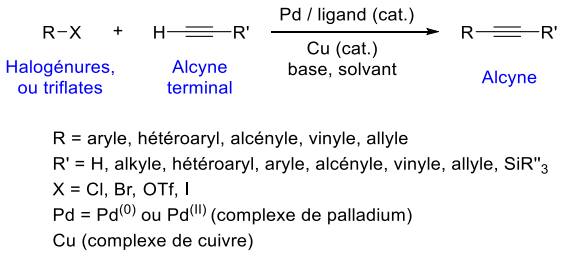


Schéma 40 : Couplage de Sonogashira.

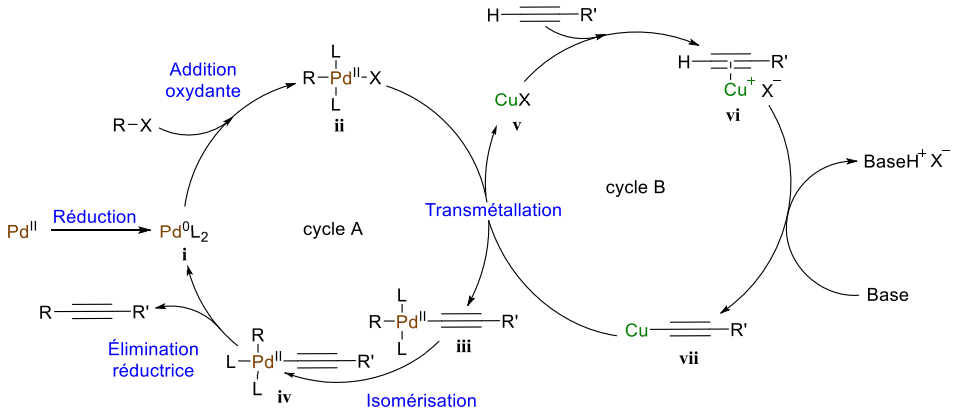


Schéma 41 : Mécanisme générale communément admis pour la réaction de Sonogashira catalysé au Pd et au Cu.

Le mécanisme n'est pas totalement élucidé car il est difficile d'isoler des intermédiaires de réaction pour pouvoir les caractériser.[267] Cependant, celui proposé dès 1975 est toujours considéré comme pertinent aujourd'hui et a été décrit plus récemment plus précisément (Schéma 41).[268,269] Le mécanisme communément admis présente deux cycles catalytiques qui évoluent en synergie. Le cycle au palladium (Schéma 41, cycle A) implique quatre étapes

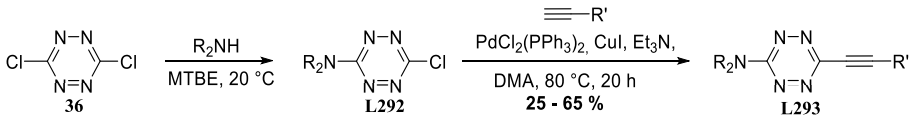
[266] Chinchilla, R.; Nájera, C. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (3), 874–922.
[267] Casado, A. L.; Espinet, P. *Organometallics* **1998**, *17* (5), 954–959.
[268] Amatore, C.; Bensalem, S.; Ghalem, S.; Jutand, A.; Medjour, Y. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *2004* (2), 366–371.
[269] Jutand, A.; Négri, S.; Principaud, A. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, *2005* (4), 631–635.

principales : l'addition oxydante, la transmétallation, l'isomérisation *trans-cis* et l'élimination réductrice. L'espèce active **i** dans le mécanisme du cycle A est le palladium au degré d'oxydation (0). Ce Pd^0 peut être introduit directement, soit par $Pd(PPh_3)_4$) ou Pd_2dba_3, soit être formé *in situ* par réduction du palladium au degré d'oxydation (II) sous la forme de $Pd(OAc)_2$ ou $PdCl_2(PPh_3)_2$. La réduction est réalisée grâce à l'ajout d'un hydrure, d'une phosphine ou bien par une quantité catalytique d'organométallique. Une fois l'espèce catalytique **i** $[Pd(0)L_2]$ formée, l'addition oxydante de l'halogénure organique (R-X), c'est à dire l'insertion du Pd(0) dans une liaison C-X, forme le complexe intermédiaire **ii** $[Pd(II)RL_2X]$. Ce complexe **ii** est ensuite transformé en $[Pd(II)RL_2$ (C≡CR')] **iii** via une transmétallation qui correspond à un échange de ligand entre le Pd et le Cu à partir de l'acétylure de cuivre **vii**. Cette étape de transmétallation est l'étape limitante.[270] Une isomérisation trans/cis de **iii** conduit à la formation de l'isomère cis $[Pd(II)RL_2(C{\equiv}CR')]$ **iv**. Cet isomère **iv** permet par élimination réductrice de libérer l'alcyne final, et de régénérer l'espèce catalytique **i**. Quant au cycle du cuivre (cycle B), il est beaucoup moins connu. On suppose que le sel de cuivre CuX **v** se complexe avec la triple liaison de l'alcyne pour former un complexe de cuivre π-alcyne **vi**. Cette complexation rend le proton terminal plus acide permettant de le déprotoner avec une base tel que la triéthylamine (Et_3N) ou la pipéridine. Normalement, ces bases ne peuvent pas déprotoner directement les alcynes terminaux. D'autres mécanismes proposent un changement de ligand X par L ou la base, avant ou après cette étape de déprotection (appelé respectivement mécanisme cationique, anionique ou ionique).[271,272,273,274] Cette base conduit à la formation de l'acétylure de cuivre **vii**. D'autres mécanismes ont été proposés suivant les conditions (sans co-catalyseur ou sans base). Quant aux ligands associés, ils sont utilisés pour former des complexes de Pd(0) plus réactifs. Ils peuvent être classés en fonction de leurs effets stériques (angle de Tolman), électronique ou par leurs hydrophilies.[275,276,277,278] Parmi les différents types de ligands existants, les dérivés de phosphines mono ou bidentés restent les plus utilisés (PPh_3, $AsPh_3$, dppe, dppp, dppb ou dppf). Le plus souvent, les quantités de palladium (0,1-5 moles%) sont plutôt importantes, et nécessitent de grandes quantités de sel de cuivre (I) (0,2-10 moles%).

En 2003, Novák et Kotschy ont impliqué les 6-chlorotétrazines **292** (obtenue par réaction de la 3,6-dichlorotétrazine **36** avec une amine) dans un couplage de Sonogashira avec différents alcynes (Schéma 42).[279] Le couplage a été réalisée dans divers solvants polaires (DCM, THF, 1,4-dioxane, DMF, DMA) à reflux ou à 80 °C pendant 20 h en présence de dichlorure de bis(triphénylphosphine)palladium(II) ($PdCl_2(PPh_3)_2$), de divers ligands (dppe, dppp ou dppf), d'iodure de cuivre et triéthylamine. Les meilleurs rendements en tétrazines

[270] He, C.; Ke, J.; Xu, H.; Lei, A. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2013**, *125* (5), 1567–1570.
[271] Joussot, J. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, **2015**.
[272] Sikk, L.; Tammiku-Taul, J.; Burk, P. *Organometallics* **2011**, *30* (21), 5656–5664.
[273] García-Melchor, M.; Pacheco, M. C.; Nájera, C.; Lledós, A.; Ujaque, G. *ACS Catal.* **2012**, *2* (1), 135–144.
[274] Wang, X.; Song, Y.; Qu, J.; Luo, Y. *Organometallics* **2017**, *36* (5), 1042–1048.
[275] Casalnuovo, A. L.; Calabrese, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (11), 4324–4330.
[276] Bergbreiter, D. E.; Liu, Y.-S. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (45), 7843–7846.
[277] Dibowski, H.; Schmidtchen, F. P. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (7), 525–528.
[278] Bong, D. T.; Ghadiri, M. R. *Org. Lett.* **2001**, *3* (16), 2509–2511.
[279] Novák, Z.; Kotschy, A. *Org. Lett.* **2003**, *5* (19), 3495–3497.

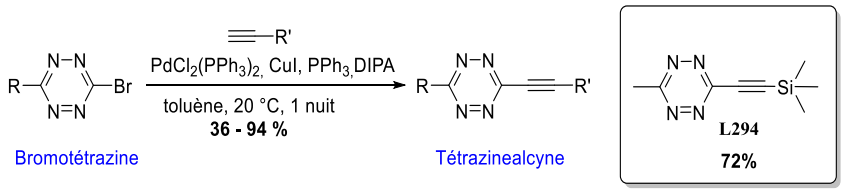
résultantes **293** (25-65% selon la nature du groupe amino et de l'alcyne de départ) ont été obtenus pour les réactions dans le diméthylacétamide (DMA) en présence de $PdCl_2(PPh_3)_2$ et de CuI. Dans ces mêmes conditions, les coulages à partir de la 3,6-dichlorotétrazine **36** ont conduit qu'à des produits de dégradations.



R_2N = morpholinyl, pyrrolidinyl, diéthylamino ; R' = alkyl

Schéma 42 : Couplage de Sonogashira de 3-amino-6-chlorotétrazines par Novák et Kotschy.[279]

Fitton et Rick en 1971 classent la réactivité des halogénoaryles dans les couplages au palladium dans l'ordre ArI > ArBr > ArCl > ArF.[280] En 2020, Ros *et al* a montré dans des réactions de couplage croisées que les tétrazines bromées sont plus réactives que leurs analogues chlorés.[281] Ce groupe a alors exploité les tétrazines bromées dans le couplage de Sonogashira pour accéder à un large éventail de tétrazines dans des conditions douces (Schéma 43). Les couplages ont été réalisés en présence de palladium ($Pd(OAc)_2$, $Pd(PPh_3)_4$ ou $PdCl_2(PPh_3)_2$), d'iodure de cuivre (CuI), de triphénylphosphine (PPh_3) et de diisopropylamine (DIPA) dans un solvant aprotique peu polaire (dichlorométhane, toluène ou tétrahydrofurane) avec des rendements faibles à modérés. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le $PdCl_2(PPh_3)_2$ dans le toluène, avec pour exemple un rendement de 72% en 3-méthyl-6-triméthylsilyléthynyltétrazine **294** (Schéma 43).



R = CH_3, $Si(CH_3)_3$, $(CH_2)_7CH_3$, $C(CH_3)_3$, Ph, Tol, Cl-Ph, CH_3OPh, $BocNHCH_2$, $(CH_2OCH_3)_2C(CH_3)_3$, $THF\text{-}OCH_2$ ou cyclopropane.

Schéma 43 : Couplage de Sonogashira par Ros et al de tétrazines bromées.[281]

En 2014, Wieczorek *et al* décrit le couplage de Sonogashira entre la iodophényltétrazine **37** et le TMS-acétylène **295** en présence de $PdCl_2(PPh_3)_2$, CuI, Et_3N dans le DMF avec un rendement de 74% en tétrazine **296** (Schéma 44, A).[282] En 2016, Wang *et al* utilise la tétrazine iodée **37** pour la synthèse de la tétrazine **298** (Schéma 44, B).[283] Le couplage de Sonogashira est réalisé avec le 1,4-dibromo-2-éthynylbenzène **297** en présence de

[280] Fitton, P.; Rick, E. A. *J. Organomet. Chem.* **1971**, *28* (2), 287–291.
[281] Ros, E.; Prades, A.; Forson, D.; Smyth, J.; Verdaguer, X.; Pouplana, L. R. de; Riera, A. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (75), 11086–11089.
[282] Wieczorek, A.; Buckup, T.; Wombacher, R. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (24), 4177–4185.
[283] Wang, J.; Li, S.; Chen, H.; Hu, R.; Li, M.; Lv, F.; Liu, L.; Ma, Y.; Wang, S. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (73), 11004–11007.

tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0) ($Pd(PPh_3)_4$), d'iodure de cuivre (CuI) et de triéthylamine (Et_3N) dans le DMF à 60 °C pendant 2 h avec un rendement de 73%.

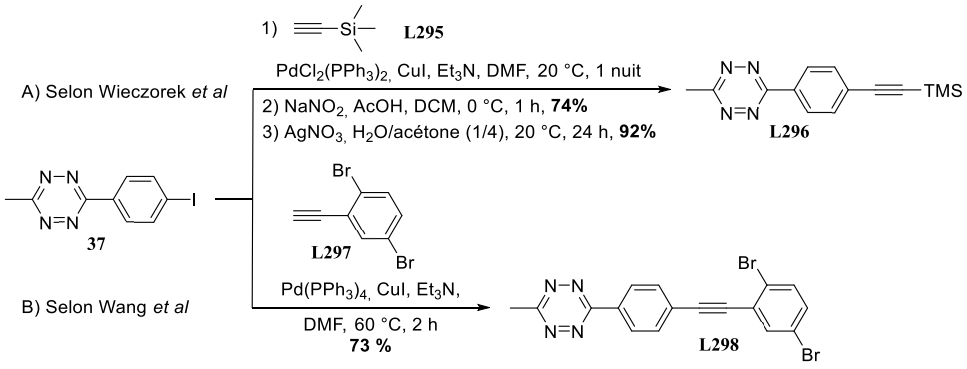


*Schéma 44 : Couplage de Sonogashira à partir de la iodophényltétrazine **37** selon (A) Wieczorek et al[282] et (B) Wang et al.[283]*

2.2. Stratégie

Basée sur cette littérature, notre stratégie a été de développer de nouvelles tétrazinesultones à partir de la sultone propargylique **15** par couplage de Sonogashira avec la 3,6-dichlorotétrazine **36** disponible commercialement (stratégie 1) ou les halogénophényltétrazines **38**, **39** et **37** (stratégie 2) issues de la réaction de Pinner (Schéma 45).

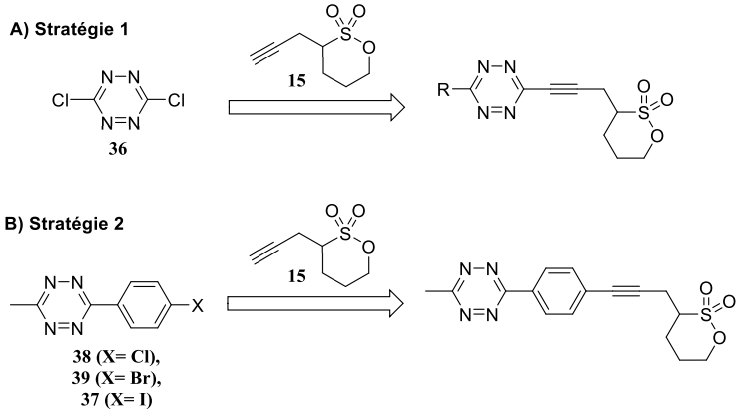
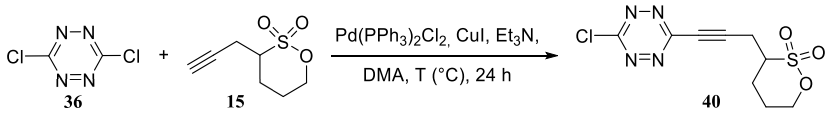


Schéma 45 : Tétrazinesultones envisagées par couplage de Sonogashira.

2.3. Résultats

2.3.1. À partir de la dichlorotétrazine 36

Nous nous sommes basés sur les conditions décrites par Novák et Kotschy[279] pour le coulage entre la 3,6-dichlorotétrazine **36** et la sultone propargylique **15**. Nous avons utilisé $PdCl_2(PPh_3)_2$ (0,16 equiv.), CuI (0,2 equiv.), Et_3N (6 equiv.) dans le DMA (Tableau 11). La tétrazinesultone **40** a été obtenue à 80 °C avec un rendement de 3% en utilisant 2 équivalents de sultone **15** (entrée 1), et de 10% avec 6 équivalents (entrée 2). Une diminution de la température à 40 puis 20 °C a permis d'augmenter les rendements à 20 et 27% (entrées 3-4).



36 15 40

Entrée	Sultone 15 (equiv.)	T (°C)	Rendement (%)
1	2	80	3
2	6	80	10
3	6	40	20
4	6	20	27

*Tableau 11 : Synthèse de la tétrazinesultone **40**.*

Le site chloré de la tétrazine **40** étant susceptible de réagir avec un nucléophile, nous avons cherché à le substituer.[284,285,286,287,288,289,290,291] La première approche a été de réaliser un second couplage de Sonogashira avec la sultone propargylique **15** dans les mêmes conditions que précédemment (Schéma 46). La tétrazine bissultone **41** a été détectée par LC-MS et sa formation évaluée à 5% (Figure 14, B). Le substrat de départ **40** reste majoritaire dans cette analyse (Figure 14, A). Nous avons également tenté de convertir la tétrazine sultone **40** en la méthoxytétrazinesultone **42** dans le méthanol (CH_3OH) en présence d'une base (DIPEA ou s-collidine) dans le DCM à 0 °C (Schéma 46). Aucun des essais n'a été fructueux même si la méthoxytétrazinesultone **42** a pu être détectée par LC-MS (Figure 14, E) en mélange avec les substrats de départ, la tétrazine **40** (Figure 14, D) et la sultone **15** (Figure 14, E).

[284] Novak, Z.; Bostai, B.; Csekei, M. *Heterocycles* **2003**, *60* (12), 2653–2668.
[285] Audebert, P.; Miomandre, F.; Clavier, G.; Vernières, M.-C.; Badré, S.; Méallet-Renault, R. *Chem. - Eur. J.* **2005**, *11* (19), 5667–5673.
[286] Schembri, L. S.; Stoddart, L. A.; Briddon, S. J.; Kellam, B.; Canals, M.; Graham, B.; Scammells, P. J. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (24), 9754–9767.
[287] Wu, D.; O'Shea, D. F. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (78), 10804–10807.
[288] Yang, G.; Zhao, Z.; Wang, S.; Hu, R.; Li, S. CN107286186A, **2017** ; Zhao, Z.; Cao, L.; Zhang, T.; Hu, R.; Wang, S.; Li, S.; Li, Y.; Yang, G. *ChemistrySelect* **2016**, *1* (11), 2581–2585.
[289] Ledovskaya, M. S.; Polynski, M. V.; Ananikov, V. P. *Chem. Asian J.* **2021**, *16* (16), 2286–2297.
[290] Fan, X.; Ge, Y.; Lin, F.; Yang, Y.; Zhang, G.; Ngai, W. S. C.; Lin, Z.; Zheng, S.; Wang, J.; Zhao, J.; Li, J.; Chen, P. R. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2016**, *55* (45), 14046–14050.
[291] Gong, Y.-H.; Audebert, P.; Clavier, G.; Miomandre, F.; Tang, J.; Badré, S.; Méallet-Renault, R.; Naidus, E. *New J. Chem.* **2008**, *32* (7), 1235–1242.

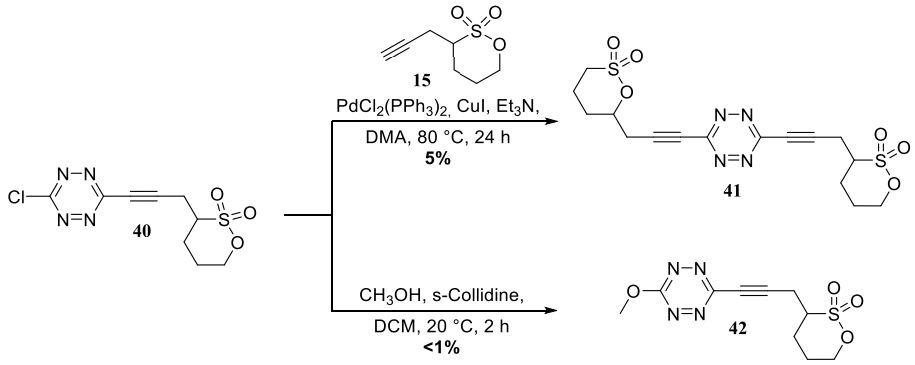


*Schéma 46 : Synthèse des tétrazinebissultone **41** et tétrazinesultone **42**.*

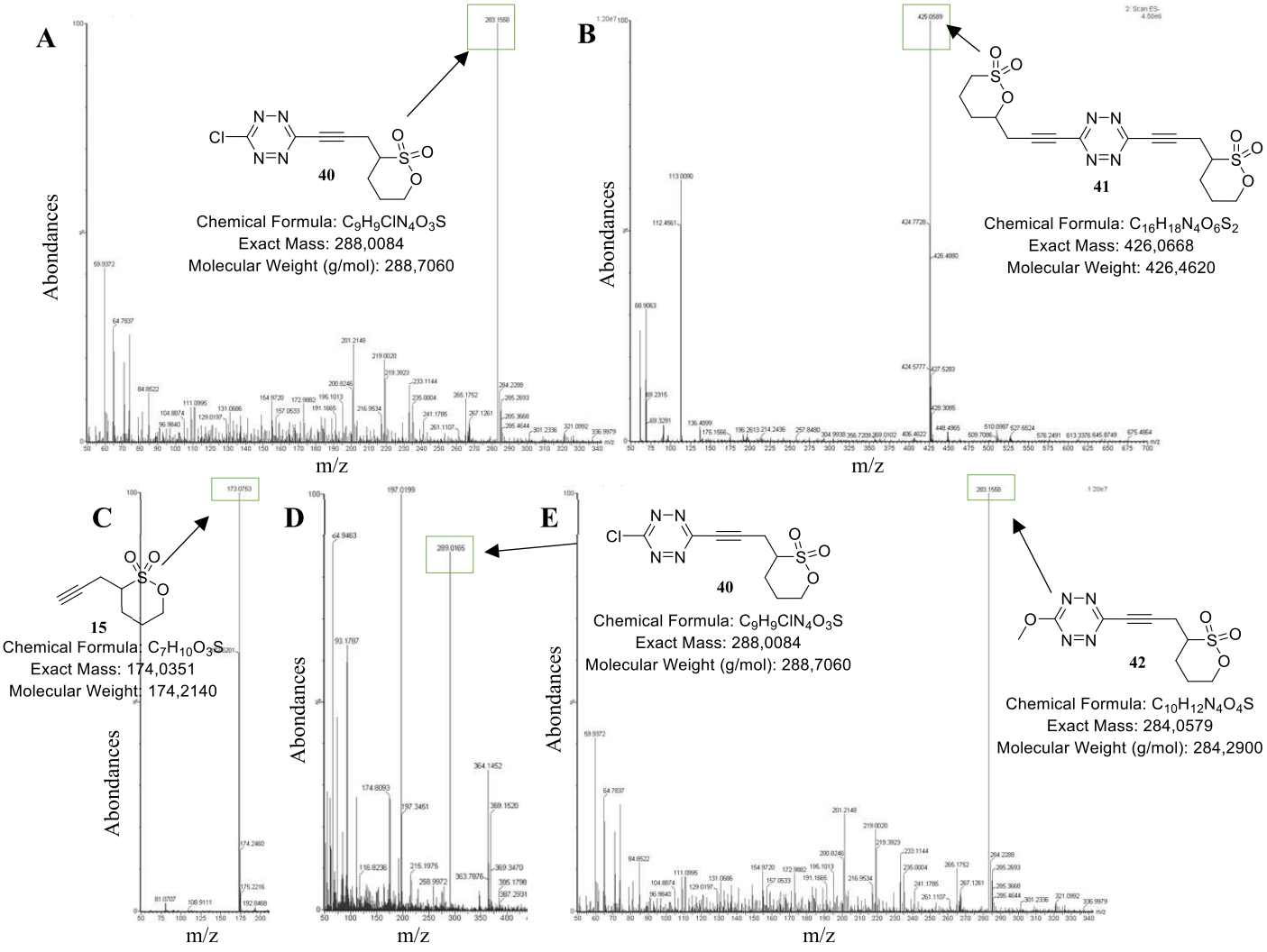


*Figure 14: Spectre de masse ESI$^+$ de la LC-MS de la synthèse à partir de la sultone **40** (A) de la tétrazine bissultone **41** (B), et de la synthèse à partir de la sultone **15** (C) ou de la sultone **40** (D), de la tétrazine sultone **42** (E).*

Nous avons alors envisagé d'inverser l'ordre des réactions, et de substituer en premier un atome de chlore par le groupe méthoxy, puis de réaliser à partir de la méthoxytétrazine chlorée intermédiaire **43** le couplage de Sonogashira avec la sultone propargylique **15** (Schéma 47). La première étape est une substitution nucléophile aromatique connue pour être réaliser à température élevée et avec de bons nucléophiles (inverse de la série alcane). Les alcools ne sont pas connus pour être de bons nucléophiles pour la SN_{Ar}. Cependant, la 3,6-dichlorotétrazine **36** étant très réactive et donc peu stable en présence de nucléophile, sa littérature recommande de réaliser les réactions à basse température.

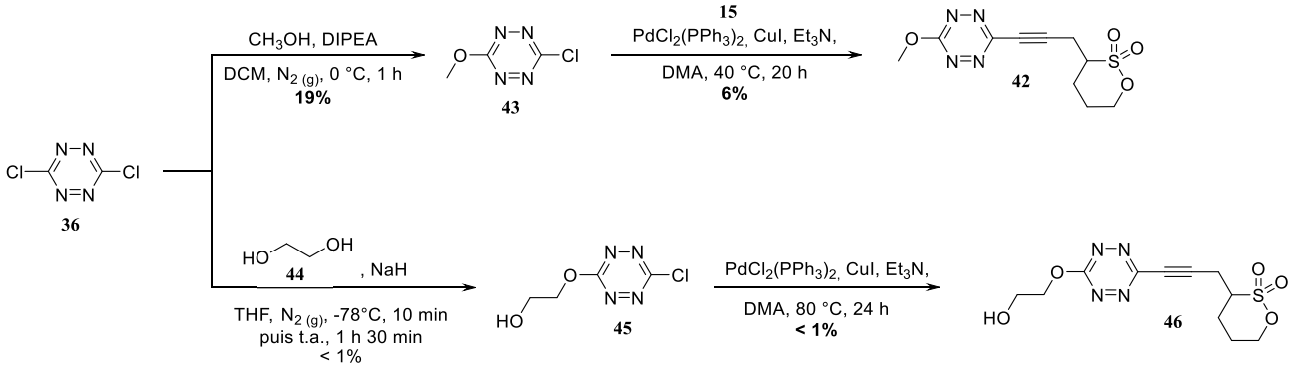


*Schéma 47 : Synthèse des tétrazinesultones **42** et **46**.*

La première étape est adaptée de la synthèse décrite par Wu *et al*[287] et est réalisée dans le méthanol en présence de DIPEA à 0 °C pendant 1 h. La tétrazine **43** est obtenue avec un rendement de 19% seulement. Malgré plusieurs essais d'optimisation, nous n'avons pas pu augmenter ce rendement et nous avons observé la formation concurrentielle de la diméthoxytétrazine **47** à hauteur de 15-20% (Schéma 48). La similitude structurale entre les deux tétrazines **43** et **47** a rendu difficile l'identification du sous-produit **47** par RMN ^{1}H et ^{13}C. Pour confirmer la formation concurrentielle de la tétrazine **47**, nous avons réalisé la *O*-méthylation de la tétrazine **43** (isolée après purification) dans les mêmes conditions que celle pour la tétrazine **36**. La tétrazine **47** a été récupérée avec un rendement de seulement 14%.

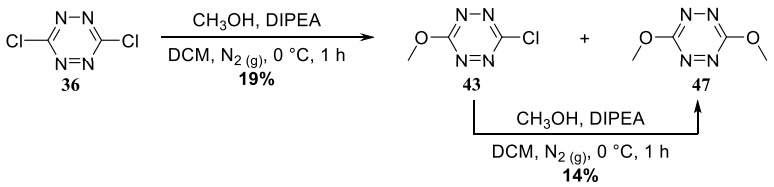


*Schéma 48 : O-Méthylation de la 3,6-dichlorotétrazine **36** et formation du sous-produit **47**.*

Ensuite, le couplage de tétrazine **43** avec la sultone propargylique **15** dans le diméthylacétamide (DMA) à 80 °C pendant 24 h en présence de dichlorure de bis(triphénylphosphine)palladium(II) ($PdCl_2(PPh_3)_2$), de co-catalyseur d'iodure de cuivre (CuI)

et de triéthylamine (Et_3N) a permis d'accéder à la tétrazine sultone **42** avec un rendement de 6% (Schéma 47).

En parallèle, nous avons réalisé la même séquence avec l'éthylène glycol **44** à la place du méthanol dans le but d'introduire un espaceur pouvant être éventuellement impliqué en bioconjugaison (Schéma 47). L'éthylène glycol **44** déprotoné par l'hydrure de sodium (NaH) à -78 °C pendant 10 min est additionné à la 3,6-dichlorotétrazine **36** pour former la tétrazinealcool **45**. La réaction se fait à 23 °C pendant 1 h 30 pour limiter les sous-produits. Après retour à température ambiante puis hydrolyse, la formation de la tétrazine **46** souhaitée a été détectée en LC-MS mais les spectres de RMN ^1H du produit brut ont montré des mélanges de produits non identifiés (probablement des produits de double *O*-méthylation intra- ou intermoléculaires). Le couplage de Sonogashira a été tout de même réalisé en présence de $PdCl_2(PPh_3)_2$, de CuI et de Et_3N. Les analyses LC-MS et HRMS ont mis en évidence la présence de la tétrazinesultone **46** mais cette dernière n'a pu être isolée (Figure 15).

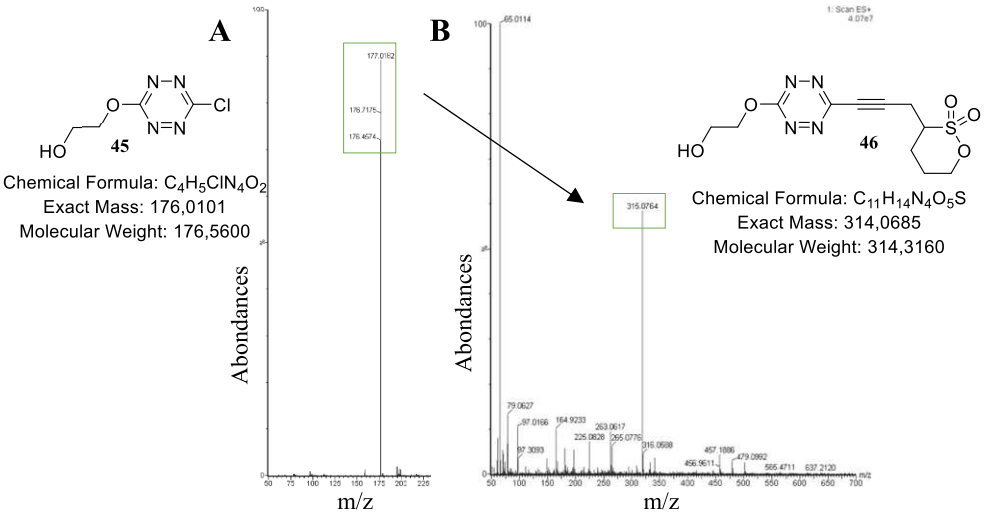


*Figure 15 : Spectre de masse ESI⁺ de la LC-MS de la synthèse de la tétrazine sultone **46** (B) à partir de la tétrazine **45** (A).*

Bien que les résultats soient décevants, ces travaux ont montré la faisabilité du couplage de Sonogashira entre une tétrazine chlorée et la sultone propargylique **15**. Nous avons poursuivi nos travaux avec les halogénophényltétrazines.

2.3.2. À partir des halogénophényltétrazines fonctionnalisées 37-39

a) Synthèse des précurseurs 37-39

1) Littérature

Les 3-halogénophényltétrazines (chlorée, bromée et iodée) **38**, **39** et **37** sont connues dans la littérature. La synthèse de la tétrazine chlorée **38** a été décrite 3 fois à notre connaissance

suivant deux protocoles différents. Le premier protocole (Schéma 49, A) est proposé pour la première fois en 1975 par Lang *et al*.[292,293] Il repose sur la réaction de Pinner entre le 4-chlorobenzonitrile **48**, l'hydrazine anhydre et l'acétonitrile à 20 °C pendant 2 à 3 h. Cette réaction est suivie d'une oxydation par l'acide nitrique généré *in situ* par le mélange de nitrite de sodium et d'acide acétique. Ces deux étapes conduisent à la formation de tétrazine **38** avec un rendement de 32%. Hu *et al*, en 2008 reproduit cette synthèse avec le même rendement de 32% (Schéma 49, A).[261]

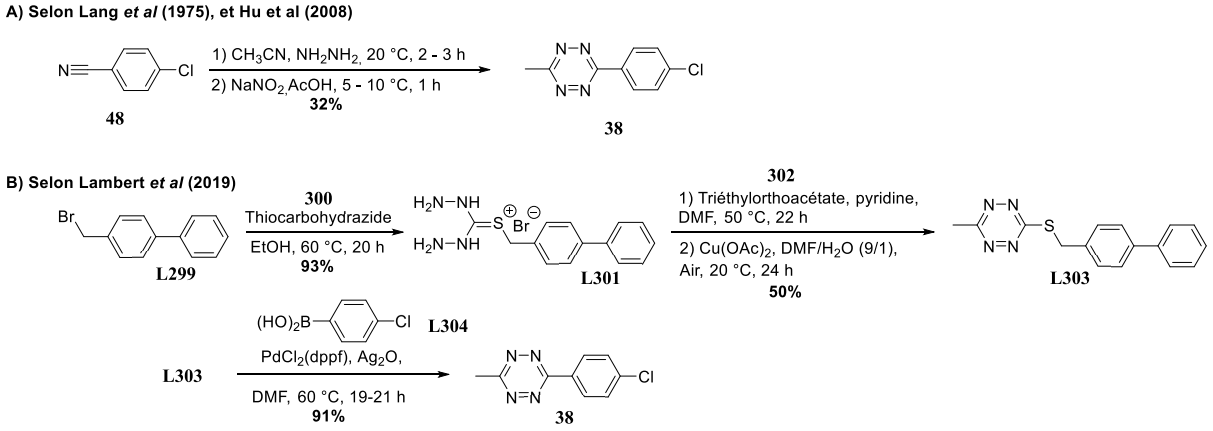


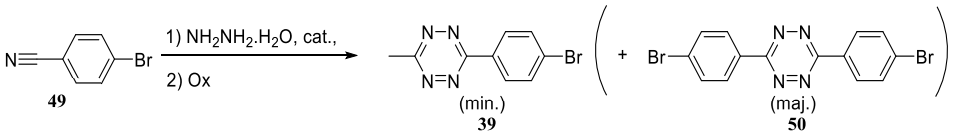
*Schéma 49 : Synthèse de la 3-(4-chlorophényl)-6-méthyltétrazine **38** selon Lang et al,[292] et selon Lambert et al.[294]*

En 2019, Lambert *et al* décrit une nouvelle approche par couplage de Liebeskind-Srogl (Schéma 49, B).[294] La première étape est la réaction entre le 4-(bromométhyl)-1,1'-biphényle **299** et le thiocarbohydrazide **300** pour former le bromure de thiocarbohydrazide **301** avec un rendement de 93%. Cet intermédiaire réagit avec la pyridine puis le triéthylorthoacétate **302** dans le DMF pour former un intermédiaire 1,4-dihydrotétrazine. Cet intermédiaire est réoxydée à l'air en présence d'acétate de cuivre pendant au moins 24 h. La 3-(([1,1'-biphényl]-4-ylméthyl)thio)-6-méthyltétrazine **303** est obtenue avec un rendement global sur ces deux étapes de 50%. Cette tétrazine réagit avec l'acide (4-chlorophényl)boronique **304** pour former la tétrazine **38** avec un rendement de 91%. Cette dernière étape repose sur le couplage de Liebeskind Srogl qui est catalysé par le [1,1′-bis(diphénylphosphino)ferrocène]dichloropalladium(II) ($Pd(dppf)Cl_2$) et l'oxyde d'argent(I) (Ag_2O). Ce couplage de Liebeskind Srogl reste analogue au couplage de Suzuki avec les halogénés. Globalement, la tétrazine **38** est obtenue à partir des réactifs commerciaux après 4 étapes avec un rendement de 41% et 87 h de synthèse.

La synthèse de la tétrazine **39** bromée a été décrite 8 fois à notre connaissance dans la littérature suivant 4 protocoles différents (Tableau 12). Le premier protocole est celui de Lang

[292] Lang Jr., S. A.; Johnson, B. D.; Cohen, E. *J. Heterocycl. Chem.* **1975**, *12* (6), 1143–1153.
[293] Lang, S. A.; Johnson, B. D.; Cohen, E.; Sloboda, A. E.; Greenblatt, E. *J. Med. Chem.* **1976**, *19* (12), 1404–1409.
[294] Lambert, W. D.; Fang, Y.; Mahapatra, S.; Huang, Z.; am Ende, C. W.; Fox, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (43), 17068–17074.

et al en 1975 par la réaction de Pinner entre le 4-bromobenzonitrile **49**, l'hydrazine anhydre et l'acétonitrile à 20 °C pendant 2 à 3 h. Cette réaction est suivie d'une oxydation par l'acide nitrique généré *in situ* par le mélange de nitrite de sodium et d'acide acétique pendant 1 h avec un rendement de 32% (entrée 1). Ce protocole est repris par Suh *et al* en 2015 qui décrit un rendement de 16% seulement (entrée 2). En 2016, Knorr *et al* ajoute du soufre pour catalyser la réaction et obtient un rendement de 8% (entrée 3). Qu *et al* décrit la même réaction à 90 °C avec 16% de rendement (entrée 4). Ces auteurs constatent la formation de la 3,6-bis(4-bromophényl)tétrazine 50 comme sous-produit fréquent dans cette synthèse, pouvant expliquer les rendements faibles. Ensuite, Kozma *et al* introduit le trifluorométhanesulfonate de zinc ($Zn(OTf)_2$), et une oxydation au nitrite de *tert*-butyle ; le rendement est alors de 32% (entrée 5). Enfin, en 2019, Mao *et al*[145] introduit le nouveau protocole basé sur la catalyse de l'acide 3-mercaptopropionique ($HS(CH_2)_2CO_2H$) dans l'éthanol (EtOH). La tétrazine **39** est alors obtenue avec un rendement de 49% (entrée 6). En 2020, Xiong *et al* répète ce protocole pour l'obtenir avec le même rendement (entrée 7). Puis en 2021, Graziotto *et al* réalise le protocole à 40 °C et obtient 65% de rendement (entrée 8).



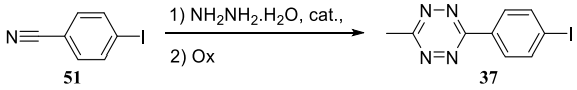
49 **39** **50**

Entrée	Réactif	Catalyseur	Température (°C)	Temps (h)	Oxydation	Rendement (%)	Référence	Date
1	Hydrochlorure d'acétamidine	-	20	2-3	$NaNO_2$ AcOH (1h)	32	Lang *et al*[292]	1975
2	Hydrochlorure d'acétamidine	-	20	18	Air	16	Suh *et al*[295]	2015
3	Hydrochlorure d'acétamidine	Soufre	20	18	Gaz nitreux (NOx)	8	Knorr *et al*[296]	2016
4	Acétonitrile	$Zn(OTf)_2$	70	12	Nitrite de *tert*-butyle (1h30)	32	Kozma *et al*[297]	2017
5	Acétonitrile	Soufre	90 (microonde)	1	$NaNO_2$ AcOH (1h)	16	Qu *et al*[298]	2019
6	Acétonitrile	$HS(CH_2)_2CO_2H$	20	18	$NaNO_2$ HCl (1M)	49	Mao *et al*[145]	2019
7	Acétonitrile	$HS(CH_2)_2CO_2H$	20	20	$NaNO_2$ HCl (1M)	48	Xiong *et al*[262]	2020
8	Acétonitrile	$HS(CH_2)_2CO_2H$	40	20	$NaNO_2$ HCl (1M)	65	Graziotto *et al*[299]	2021

*Tableau 12 : Synthèse de la 3-(4-bromophényl)-6-méthyltétrazine **39** dans la littérature.*

[295] Suh, S.-E.; Barros, S. A.; Chenoweth, D. M. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (9), 5128–5132.
[296] Knorr, G.; Kozma, E.; Herner, A.; Lemke, E. A.; Kele, P. *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22* (26), 8972–8979.
[297] Kozma, E.; Girona, G. E.; Paci, G.; Lemke, E. A.; Kele, P. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (50), 6696–6699.
[298] Qu, Y.; Pander, P.; Bucinskas, A.; Vasylieva, M.; Tian, Y.; Miomandre, F.; Dias, F. B.; Clavier, G.; Data, P.; Audebert, P. *Chem. - Eur. J.* **2019**, *25* (10), 2457–2462.
[299] Graziotto, M. E.; Adair, L. D.; Kaur, A.; Vérité, P.; Ball, S. R.; Sunde, M.; Jacquemin, D.; New, E. J. *RSC Chem. Biol.* **2021**, *2* (5), 1491–1498.

La synthèse de la tétrazine **37** iodée a été décrite 7 fois à notre connaissance dans littérature suivant 4 protocoles différents. Le premier protocole (Tableau 13, entrée 1) est proposé par Lang *et al*.[260]



51 **37**

Entrée	Réactif	Catalyseur	Température (°C)	Temps (h)	Oxydation	Rendement (%)	Référence	Date
1	Hydrochlorure d'acétamidine	-	20	2-3	$NaNO_2$ AcOH (1h)	11	Lang *et al*[260]	1975
2	Acétonitrile	$Ni(OTf)_2$	60	24	$NaNO_2$ HCl (1M)	40	Yang *et al*[300]	2012
							Devaraj *et al*[301]	2013
3	Acétonitrile	$Ni(OTf)_2$	60	24	$NaNO_2$ HCl (1N) (25 °C, 20 min)	18	Navarro *et al*[302]	2019
4	Acétonitrile	$Ni(OTf)_2$	60	24	$NaNO_2$ HCl (1M)	20	Karaki *et al*[303]	2021
5	Acétonitrile	$Zn(OTf)_2$	60	24	$NaNO_2$ HCl (1M)	39	Kjaer *et al*[162]	2020 2021
6	Acétonitrile	$Zn(OTf)_2$	60	24	$NaNO_2$ AcOH (0 °C, 20 min)	39	García-Vázquez *et al*[156]	2021
							Battisti *et al*[304]	
7	Acétonitrile	$HS(CH_2)_2CO_2H$	20	18	$NaNO_2$ HCl (1M)	8	Xiong *et al*[262]	2020

*Tableau 13 : Synthèse de la 3-(4-iodophényl)-6-méthyltétrazine **37** dans la littérature.*

Lang *et al* synthétise la tétrazine **37** suivant la réaction de Pinner entre le 4-iodobenzonitrile **51**, l'hydrazine anhydre et de l'acétonitrile à 20 °C pendant 2 à 3 h avec un rendement de 11% (Tableau 13, entrée 1).[260] En 2012, Devaraj *et al* utilise du trifluorométhanesulfonate de nickel ($Ni(OTf)_2$) pour l'obtenir avec un rendement de 40% (entrée 2).[301] En 2019, Navarro *et al* reproduit ce protocole avec un rendement de 18% (entrée 3).[302] De même, en 2021, Karaki *et al* le reproduisent aussi avec un rendement de 20% (entrée 4).[303] Ce protocole a aussi été réalisé avec du trifluorométhanesulfonate de zinc ($Zn(OTf)_2$) par Kjaer *et al* en 2021 pour obtenir la tétrazine **37** avec un rendement de 39% (entrée 5).[162] Ensuite, García-Vázquez *et al* ont reproduit ce protocole alternatif avec un rendement de 39% (entrée 6).[156,304] Enfin, l'acide 3-mercaptopropionique ($HS(CH_2)_2CO_2H$) dilué dans l'éthanol (EtOH) a été utilisé par Xiong *et al* en 2020 pour l'obtenir avec un rendement de 8% (entrée 7).[262]

[300] Yang, J.; Karver, M. R.; Li, W.; Sahu, S.; Devaraj, N. K. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2012**, *51* (21), 5222–5225.
[301] Devaraj, N. K.; Yang, J.; Seckute, J. WO2013152359A1, **2013**.
[302] Navarro, L.; Berdal, M.; Chérel, M.; Pecorari, F.; Gestin, J.-F.; Guérard, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27* (1), 167–174.
[303] Karaki, F.; Kiguchi, T.; Itoh, K.; Sato, N.; Konishi, K.; Fujii, H. *Tetrahedron* **2021**, *97* (1), 132411–132421.
[304] Battisti, U. M.; Herth, M. M.; Kjær, A.; Garcia, R. WO2021228992A1, **2021**.

2) Résultats

Nous avons généralisé le protocole de de Mao *et al* à la synthèse des 3 tétrazines (chlorée, bromée et iodée) **38**, **39** et **37** consistant en la réaction des halogénobenzonitrile **48**, **49** et **51** avec l'hydrazine hydratée ($NH_2NH_2.H_2O$), l'acétonitrile (CH_3CN) et l'acide 3-mercaptopropionique ($HS(CH_2)_2CO_2H$) dans l'éthanol à 40 °C pendant 19 h puis en l'oxydation par l'acide nitrique issus du mélange de nitrite de sodium et d'acide chlorhydrique (Schéma 50). Les tétrazines **38**, **39** et **37** sont obtenues après traitement et extraction (sans purification sur gel de silice) quasiment pures, avec des rendements respectifs de 75, 99 et 93%, au moins doubles de ceux décrits auparavant pour la même pureté chimique de 99%.

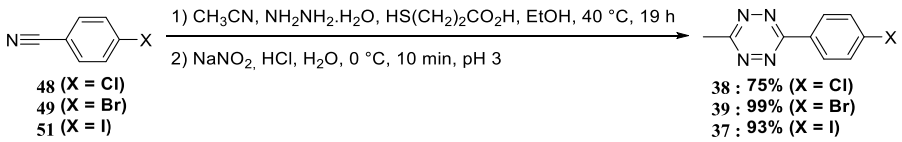


*Schéma 50 : Synthèse des 3-(4-halogénophényl)-6-méthyltétrazines **38**, **39** et **37**.*

b) Couplages de Sonogashira des tétrazines 37, 38 et 39 avec la sultone propargylique 15

Nous avons étudié le couplage de Sonogashira entre les tétrazines halogénées **38**, **39** ou **37** et la sultone propargylique **15** en présence de $PdCl_2(PPh_3)_2$ (selon Novák et Kotschy)[279, 281] ou $Pd(PPh_3)_4$ (selon Wang *et al*),[283] d'iodure de cuivre (CuI) et de base (triéthylamine, s-collidine, DIPEA) dans un solvant (diméthylacétamide, acétonitrile, 1,4-dioxane, le *N,N*-diméthylformamide, toluène) à 20, 40, 60, 80 °C ou à reflux pendant 2 à 24 h (Schéma 51). Toutes les réactions à partir des tétrazines chlorée **38** et bromée **39** ont été totalement vaines. La tétrazinesultone **52** n'a pu être isolée qu'à partir de la tétrazine iodée **37** dans la réaction utilisant $Pd(PPh_3)_4$, CuI, Et_3N en solution dans l'acétonitrile à 80 °C pendant 24 h. Le rendement n'est que de 9%.

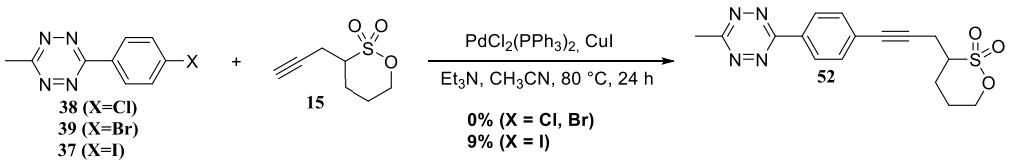


*Schéma 51 : Synthèse de la tétrazinesultone **52**.*

2.3.3. Conclusion

En conclusion, le couplage de Sonogashira a permis d'obtenir cinq nouvelles tétrazinesultones **40**, **41**, **42**, **46** et **52** (Schéma 52). Les rendements compris entre 1 et 27% sont cependant très faibles. Le couplage de Sonogashira de tétrazines reste une réaction difficile. Au vu de ces faibles rendements, cette stratégie a été abandonnée aussi.

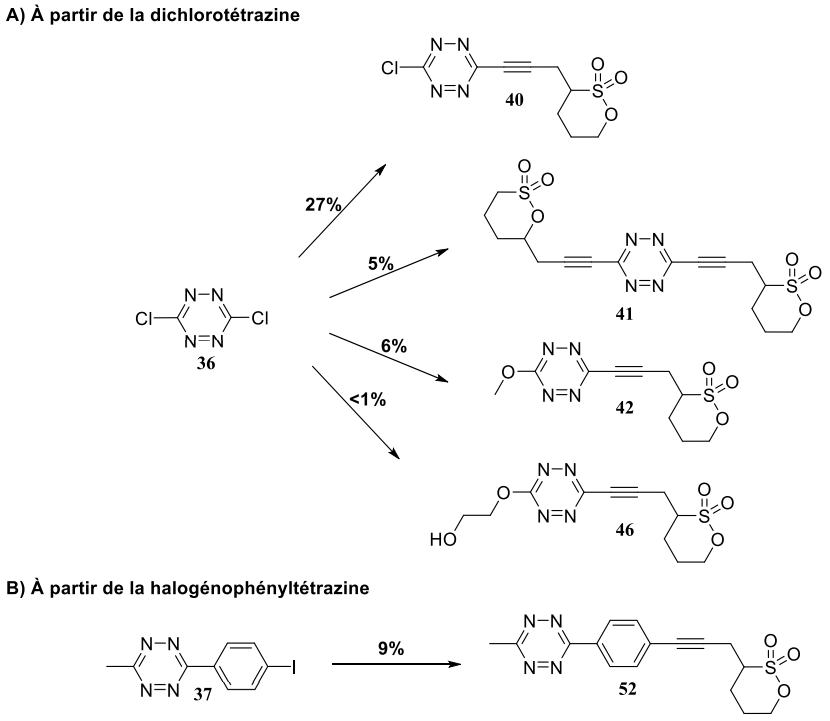


*Schéma 52 : Tétrazinesultones obtenue par couplage de Sonogashira à partir de la dichlorotétrazine **36** et de la 4-iodophényltétrazine **37**.*

3. Réaction CuAAC entre la sultone propargylique 15 et une azidotétrazine

L'approche par CuAAC entre la sultone propargylique **15** et une azidotétrazine est rappelée dans le Schéma 53.

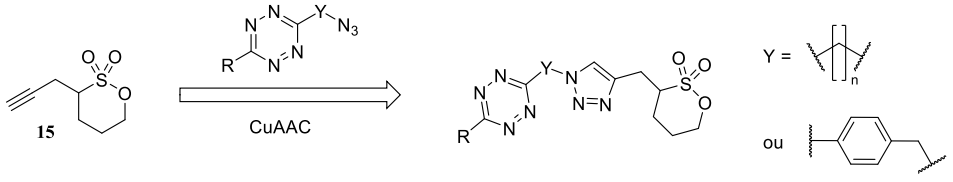


Schéma 53 : Stratégie de synthèse de tétrazinesultones par CuAAC.

Ce chapitre débutera par un rappel sur les réactions de CuAAC impliquant uniquement des azidotétrazines (et non pas des tétrazines acétyléniques), puis sur les azidotétrazine décrites

dans la littérature. Nous décrirons ensuite nos travaux de synthèse des azidotétrazines et de réactions de CuAAC.

3.1. Littérature

La réaction de Huisgen est une cycloaddition 1,3-dipolaire de type [3+2] entre un azoture et un alcyne pour former des 1,2,3-triazoles.[305,306,307,308] Elle a été développée pour la première fois en 1893 par Michael *et al* à partir de l'azidobenzène **305** et de l'ester acétylènedicarboxylate **306** de diéthyle pour former le 1,2,3-triazole **307** (Schéma 54, A).[309] Il faudra attendre 1963 pour l'utilisation du premier alcyne terminal dissymétrique par Huisgen *et al* dans sa version thermique (Schéma 54, B).[310] Cependant, cette réaction est limitée par les conditions drastiques (haute température, longs temps de réactions) incompatibles avec de nombreux substrats (azotures peu stables thermiquement),[311] ainsi que la formation de mélanges de régioisomères de 1,2,3-triazoles 1,4-disubstitués et 1,5-disubstitués dans le cas d'alcynes dissymétriques (Schéma 54, B).[306]

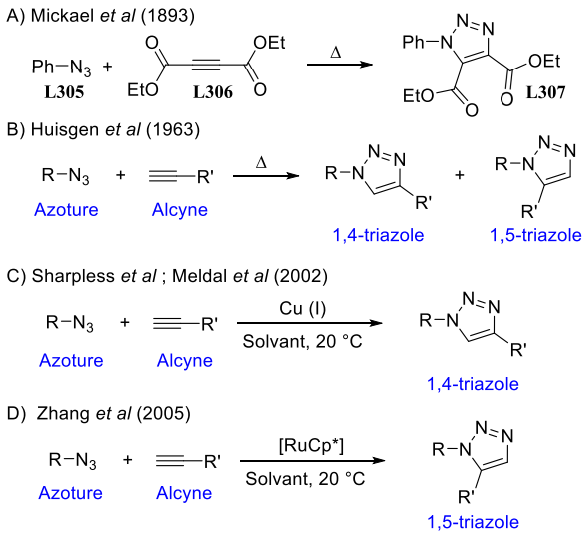


Schéma 54 : Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre un azoture et un alcyne.

En 2002, les groupes de Sharpless *et al*,[312] et de Meldal *et al*[313] améliorent indépendamment l'un de l'autre la réaction en ajoutant du cuivre (I). L'ajout du cuivre (I) en quantité catalytique a permis de rendre la réaction régiosélective formant exclusivement des triazoles l,4-disubstitués (Schéma 54, B).[314] Ce catalyseur accroit d'un facteur 10^7 la cinétique

[305] Gothelf, K. V.; Jørgensen, K. A. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (2), 863–910.
[306] Padwa, A. *Wiley-Intersci. Publ. (N.Y.)*, **1984**, *1* (13), 817–818.
[307] W. Roush, *ed. D. P. Curran, JAI Press*, London, **1990**, *2* (1), 91–146.
[308] Padwa, A.; Fleming, I. M.; Trost B. *Comp. Org. Synth.*, **1991**, *4* (1), 1069-1071.
[309] Michael, A. *J. Prakt. Chem.* **1893**, *48* (1), 94–95.
[310] Huisgen, R. *Angew. Chem. - Int. Ed. Eng.* **1963**, *2* (10), 565–598.
[311] Huisgen, R. *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61* (4), 613–628.
[312] Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2002**, *114* (14), 2708–2711.
[313] Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057–3064.
[314] Wu, P.; Fokin, V. V. *Aldrichimica Acta* **2007**, *40* (1), 7–17. ;Wu, P.; Fokin, V. V. *Chem. Inform.* **2007**, *38* (36), 7–17.

de cette réaction à température ambiante,[315] et permet d'élargir la tolérance de cette réaction à différents substrats et conditions réactionnelles, notamment aqueuses.[312,313] En effet, la réaction n'est pas affectée par les propriétés stériques et électroniques des groupements fonctionnels (tels que les esters, les acides, les alcènes, les alcools ou les amines) présents sur les substrats azido (qui peuvent être primaires, secondaires, tertiaires ou aromatiques) et alcynes (terminaux ou non).[315,316,317] De même, la réaction peut fonctionner avec une grande variété de sels de cuivre et de solvants (organiques ou en mélange aqueux). Dans toutes ces conditions, les rendements restent quasi quantitatifs. La cycloaddition de Huisgen cupro-catalysée, répondant au concept de la chimie « click », est désormais connue sous le nom de « Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition » (CuAAC).

En 2005, Sharpless *et al* a publié une proposition du mécanisme réactionnel de la réaction de CuAAC (Schéma 55, à gauche).[318]

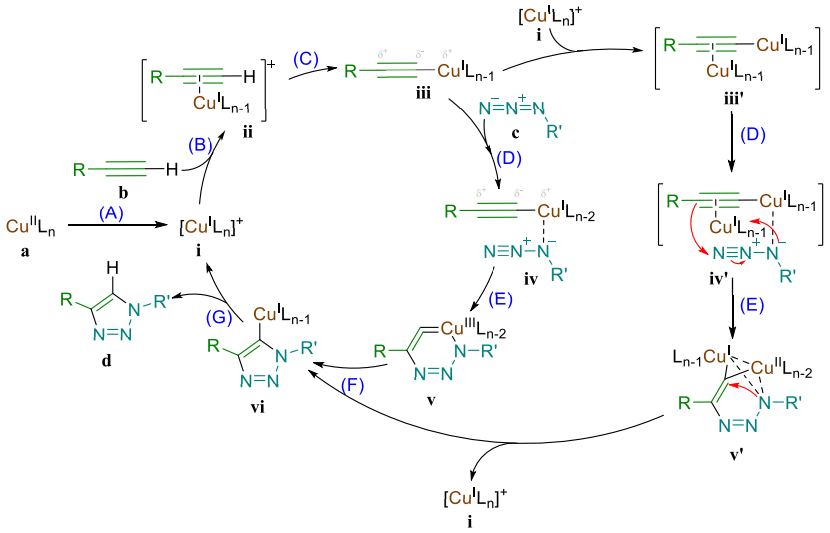


Schéma 55 : Mécanisme de la CuAAC couramment admis proposé par Sharpless et al (à gauche),[312] et Fokin et al (à droite).[330]

Le mécanisme de la CuAAC commence par la préparation de l'espèce catalytique active **i** (étape A). L'espèce catalytique active est un sel de cuivre(I) introduit directement (CuI,[319] CuBr, $[Cu(CH_3CN)_4]PF_6$,[312] $[CuP(OEt)_3]I$,[320] $[Cu(PPh_3)_3]Br$,[321,322,322] $[CuC_6H_6]OTf$,[323] $[Cu(CH_3CN)_4]OTf$) ou généré *in situ* par réduction d'un sel de cuivre (II) ($Cu(OAc)_2$, $CuSO_4.H_2O$, $Cu(OTf)_2$) par un agent réducteur en large excès comme l'ascorbate de sodium.[324]

[315] Chassaing, S.; Kumarraja, M.; Sani Souna Sido, A.; Pale, P.; Sommer, J. *Org. Lett.* **2007**, *9* (5), 883–886.
[316] Pachón, L. D.; van Maarseveen, J. H.; Rothenberg, G. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347* (6), 811–815.
[317] Kamijo, S.; Jin, T.; Huo, Z.; Yamamoto, Y. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (7), 2386–2393.
[318] 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.
[319] Wu, Y.-M.; Deng, J.; Fang, X.; Chen, Q.-Y. *J. Fluorine Chem.* **2004**, *125* (10), 1415–1423.
[320] Pérez-Balderas, F.; Ortega-Muñoz, M.; Morales-Sanfrutos, J.; Hernández-Mateo, F.; Calvo-Flores, F. G.; Calvo-Asín, J. A.; Isac-García, J.; Santoyo-González, F. *Org. Lett.* **2003**, *5* (11), 1951–1954.
[321] Malkoch, M.; Schleicher, K.; Drockenmuller, E.; Hawker, C. J.; Russell, T. P.; Wu, P.; Fokin, V. V. *Macromolecules* **2005**, *38* (9), 3663–3678.
[322] Wu, P.; Feldman, A. K.; Nugent, A. K.; Hawker, C. J.; Scheel, A.; Voit, B.; Pyun, J.; Fréchet, J. M. J.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2004**, *116* (30), 4018–4022.
[323] Gujadhur, R.; Venkataraman, D.; Kintigh, J. T. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (29), 4791–4793.
[324] Straub, F. B. *Chem. Commun.* **2007**, *0* (37), 3868–3870.

Une alternative, à la réduction et à la médiamutation, est l'ajout de copeaux ou de fils de cuivre (0) qui peuvent suffire à obtenir du cuivre (I).[325] De manière plus minoritaire, l'oxydation de cuivre métallique (0) sous forme de poudre,[326] de copeaux (facile à purifier),[324] ou de nanoparticules (très cher) de cuivre en large excès.[316,327] Une liste plus exhaustive peut être retrouvée dans la revue de Meldal *et al*.[328] Dans tous les cas, les ligands autour de l'atome de cuivre doivent être labiles pour permettre la coordination de l'alcyne, puis de l'azide. L'espèce catalytique active Cu^{I} (**i**) coordinne l'alcyne (pK_A = 25) pour former un complexe-π de cuivre (**ii**) (étape B) qui diminue le pK_A de l'hydrogène terminal de l'alcyne d'environ dix unités (soit pK_A = 15). Ce complexe **ii** permettrait une déprotonation par une base faible du milieu, telle qu'une molécule d'eau. La formation de l'acétylènure de cuivre (**iii**) par insertion dans la liaison C-H (étape C), et déprotonation de l'hydrogène terminale de l'alcyne est l'étape limitante de ce mécanisme. L'insertion de cuivre lors de l'étape C polarise la triple liaison de l'alcyne (représenté par les charges partielles δ^+ et δ^- dans l'intermédiaire (**iii**) du Schéma 55). Le postulat d'une cycloaddition directe entre cet intermédiaire (**iii**) et un dérivé azoture n'est pas probable en raison d'une barrière d'énergie potentielle élevée (99 kJ/mol). Une coordination de l'azoture sur le cuivre de l'acétylènure de cuivre (**iii**) pour former le complexe (**iv**) (étape D) est nécessaire pour abaisser cette barrière d'énergie. Cette coordination se fait par le doublet non liant de l'azote chargé partiellement négativement (le plus riche électroniquement), c'est-à-dire l'azote en α du carbone. La polarisation de la triple liaison de l'alcyne va orienter la coordination de l'azoture (étape D) pour former le complexe (**iv**) ce qui déterminera la régiosélectivité de la réaction (formation de 1,4-triazole uniquement). Le complexe (**iv**) va alors se réorganiser pour former le métallohétérocycle à 6 atomes du complexe **v** (étape E). Ce complexe **v** possède un atome de cuivre de degré d'oxydation (III). Cette cyclisation nécessiterait une énergie potentielle de 78 kJ/mol, ce qui est plus faible que la barrière énergétique de la réaction non catalysée (109 kJ/mol), et augmente donc la cinétique de la réaction. Un réarrangement 1,2 (étape F) transforme le complexe non aromatique cyclique (**v**) (à 6 atomes) en un complexe aromatique cyclique (**vi**) (à 5 atomes). Le complexe (**vi**) a été isolé par le groupe de Straub *et al*,[324] ainsi que par le groupe de Nolte *et al*.[329] Ce complexe (**vi**) est protoné (étape G), régénérant le complexe de cuivre (I), et libérant l'hétérocycle formé. En 2013, Fokin *et al* montrent que le mécanisme réactionnel (Schéma 55, à droite) passe par des espèces dinucléaires de cuivre (**iii'**, **iv'** et **v'**).[330] Ces intermédiaires clés ont été isolés par Bertrand *et al* seulement deux ans plus tard, et confirment le mécanisme de Fokin *et al*.[331]

L'étape limitante de formation de l'acétylènure de cuivre (**iii** ou **iii'**) (étape C) est facilité pour les sels de cuivre (I) par l'ajout d'un excès de base (tels que la Et_3N, la DIPEA, la pyridine ou la 2,6-lutidine) en milieu organique (tels que DMSO, DMF, THF, toluène, dioxane, acétone,

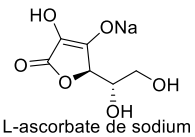
[325] Appukkuttan, P.; Dehaen, W.; Fokin, V. V.; Van der Eycken, E. *Org. Lett.* **2004**, *6* (23), 4223–4225.
[326] Lewis, W. G.; Magallon, F. G.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (30), 9152–9153.
[327] Orgueira, H. A.; Fokas, D.; Isome, Y.; Chan, P. C.-M.; Baldino, C. M. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (16), 2911–2914.
[328] Meldal, M.; Tornøe, C. W. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (8), 2952–3015.
[329] Nolte, C.; Mayer, P.; Straub, B. F. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2007**, *46* (12), 2101–2103.
[330] Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. *Science* **2013**, *340* (6131), 457–460.
[331] Jin, L.; Tolentino, D. R.; Melaimi, M.; Bertrand, G. *Sci. adv.* **2015**, *1* (5), e1500304–e1500309.

chloroforme ou CH_3CN). Cet ajout de base limite aussi la formation de sous-produits, et l'oxydation de l'espèce catalytique active Cu^I.[332] Tandis que pour les sels de cuivre (II), la formation de l'acétylènure de cuivre (**iii** ou **iii'**) est facilité après la réduction en Cu^I en milieu aqueux avec un co-solvant organique (le plus couramment dans le *t*BuOH/H_2O), mais un ajout de base n'est pas nécessaire pour eux.[333,334,326] La réaction CuAAC peut même fonctionner quand une ou plusieurs réactifs ou produits sont insolubles dans l'eau.

Le développement de la réaction CuAAC se poursuit encore aujourd'hui étendre la réaction à de nouveaux catalyseurs basés sur d'autres métaux (palladium, rhodium, ruthénium) et ligands.[335,336,337,338,339,340,341,342] La réaction CuAAC a été également décrite avec la synthèse one-pot des azotures à partir de dérivés halogénés,[343] et sous activation micro-onde.[320] La réaction est aussi développée pour des applications biologiques en absence de cuivre, car le cuivre est cytotoxique.[344] En effet, les cellules tolèrent difficilement des concentrations de sels de cuivre(I) supérieures à 100 µM. Pour s'affranchir du cuivre, des alcynes plus réactives sont utilisés tels que les cyclooctynes (SPAAC).[345,346] D'autres études portent sur son industrialisation fixant le substrat (alcyne ou azoture) ou le catalyseur sur un support solide (résine polymérique ou zéolite[315]),[347,348,349] suivi par des lavages, et un traitement pour récupérer le produit final.

3.1.1. CuAAC avec une azidotétrazine

Les cycloadditions 1,3-dipolaire entre une azidotétrazine et un alcyne que nous avons trouvé dans la littérature sont rappelées dans le Tableau 14 et correspondent à 5 publications dont un brevet. Il est à noter qu'au début de la thèse, aucune publication n'était encore parue (excepté le brevet).



L-ascorbate de sodium (Asc. Na.)

La réaction CuAAC est réalisée en présence de cuivre de degré d'oxydation 2 ($Cu(OAc)_2$ ou $CuSO_4$). Ce cuivre est réduit par l'ascorbate de sodium (Na Asc) sous gaz inerte (argon ou azote) dans l'eau à 20 °C pendant 1 à 30 min. Dès lors que le catalyseur Cu(I) est prêt (caractérisé par une couleur jaune), l'alcyne et l'azidotétrazine sont ajoutés dans un solvant polaire ou mélange de solvant comportant de

[332] Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. *Eur. J. Org. Chem. 2006*, **2006** (1), 51–68.
[333] Helms, B.; Mynar, J. L.; Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15020–15021.
[334] Lee, J. W.; Kim, J. H.; Kim, B.-K.; Shin, W. S.; Jin, S.-H. *Tetrahedron* **2006**, *62* (5), 894–900.
[335] Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (46), 15998–15999.
[336] Rodionov, V. O.; Presolski, S. I.; Díaz Díaz, D.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (42), 12705–12712.
[337] Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Org. Lett.* **2004**, *6* (17), 2853–2855.
[338] Meng, J.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (27), 4543–4546.
[339] Golas, P. L.; Tsarevsky, N. V.; Sumerlin, B. S.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **2006**, *39* (19), 6451–6457.
[340] Uttamapinant, C.; Tangpeerachaikul, A.; Grecian, S.; Clarke, S.; Singh, U.; Slade, P.; Gee, K. R.; Ting, A. Y. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2012**, *51* (24), 5852–5856.
[341] Bevilacqua, V.; King, M.; Chaumontet, M.; Nothisen, M.; Gabillet, S.; Buisson, D.; Puente, C.; Wagner, A.; Taran, F. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2014**, *126* (23), 5982–5986.
[342] Su, Y.; Li, L.; Wang, H.; Wang, X.; Zhang, Z. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (10), 2185–2188.
[343] Feldman, A. K.; Colasson, B.; Fokin, V. V. *Org. Lett.* **2004**, *6* (22), 3897–3899.
[344] Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2009**, *48* (38), 6974–6998.
[345] 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. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (43), 16793–16797.
[346] C. Jewett, J.; R. Bertozzi, C. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1272–1279.
[347] Molteni, G.; Del Buttero, P. *Tetrahedron* **2005**, *61* (21), 4983–4987.
[348] Girard, C.; Önen, E.; Aufort, M.; Beauvière, S.; Samson, E.; Herscovici, J. *Org. Lett.* **2006**, *8* (8), 1689–1692.
[349] Jlalia, I.; Beauvineau, C.; Beauvière, S.; Önen, E.; Aufort, M.; Beauvineau, A.; Khaba, E.; Herscovici, J.; Meganem, F.; Girard, C. *Molecules* **2010**, *15* (5), 3087–3120.

l'eau ou un tampon. Les réactions sont réalisées à différentes températures (0, 20, 30, 90, 120 °C ou à reflux) pendant 5 à 48 h. Les rendements sont moyens à très bons (de 26 à 95%).

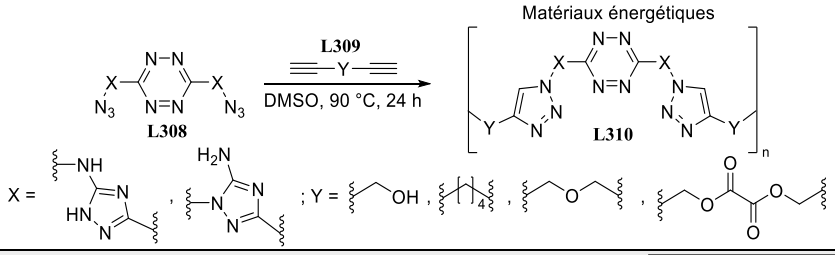
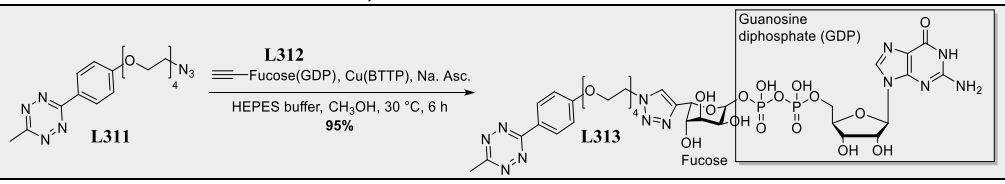
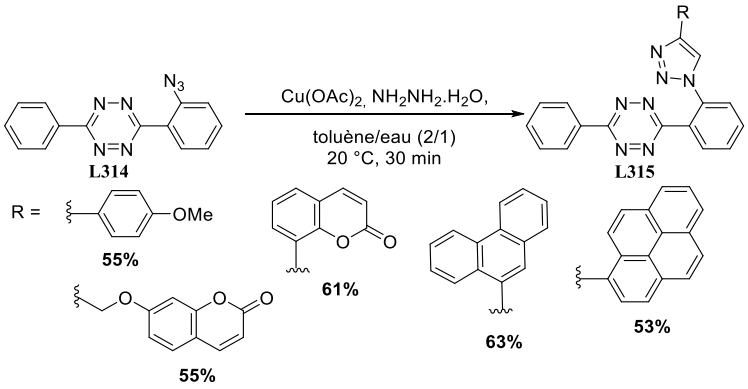
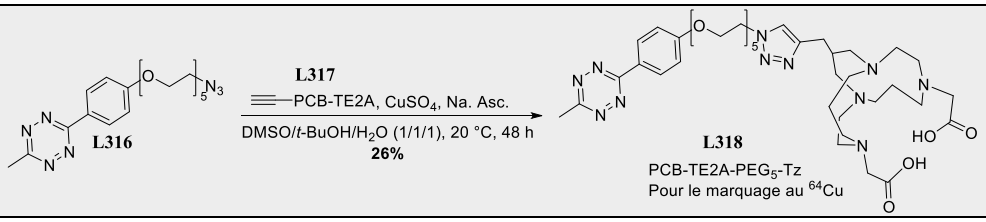
Entrée	Réaction	Référence	Date
1		Gozin *et al*[353]	2016
2		Li *et al*[361]	2018
3		Mboyi *et al*[368]	2020
4		Yoo *et al*[360] Lee *et al*[362]	2020 2021

Tableau 14 : CuAAC à partir des tétrazines dans la littérature.

Très souvent, un ligand est ajouté dans les réactions de cycloaddition tel que le tétraméthyléthylènediamine (TMEDA), le tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl]amine (TBTA), l'acide 3-(4-((bis((1-(*tert*-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl)amino)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propane-1-sulfonique (BTTP) ou le disulfonate de bathophénanthroline disodique (BPDS). Le ligand BTTP est la nouvelle génération de ligand hydrosoluble pour CuAAC qui remplace les ligands de l'ancienne génération du TMEDA, du TBTA ou du (THPTA) (Figure 16).[350]

[350] Li, L.; Zhang, Z. *Molecules* **2016**, *21* (10), 1393–1415.

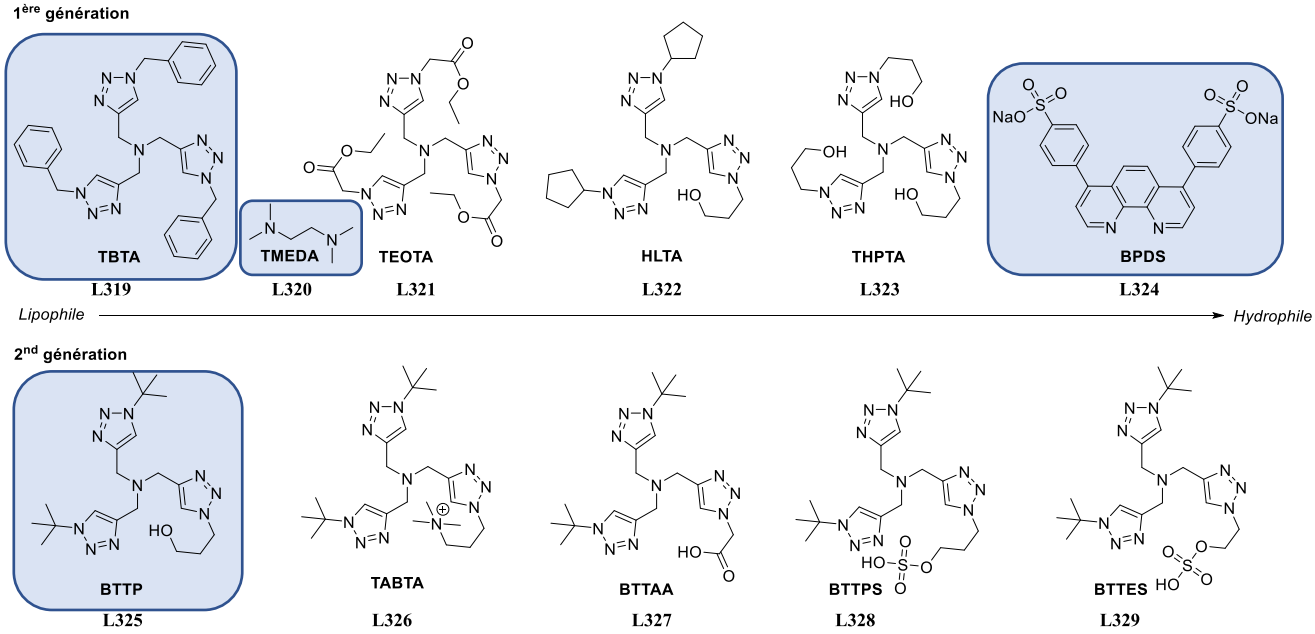
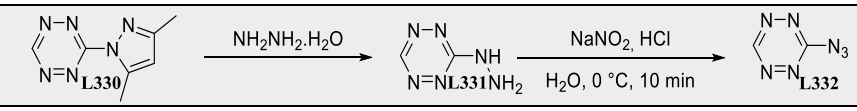
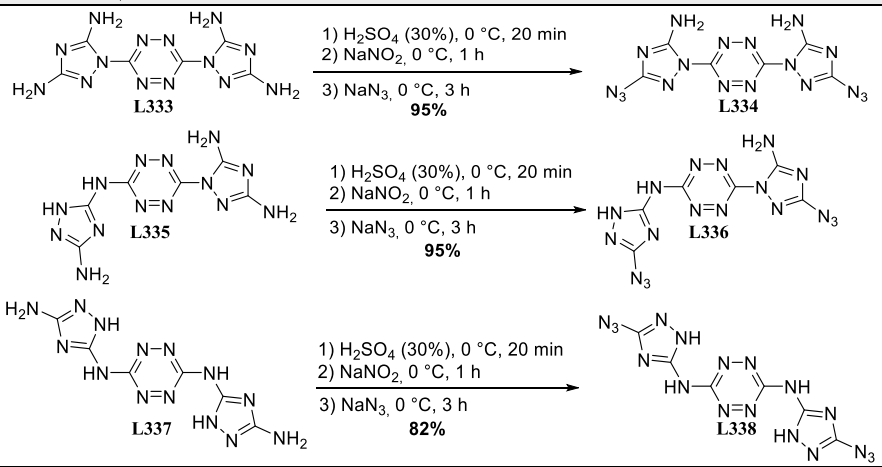
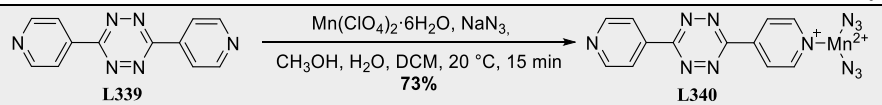
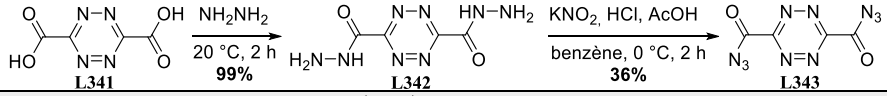
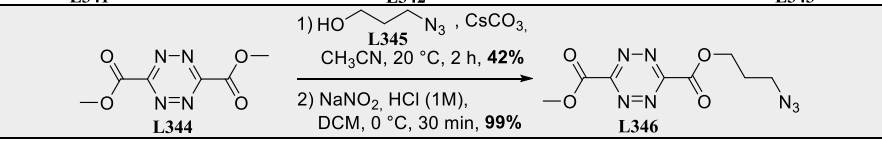
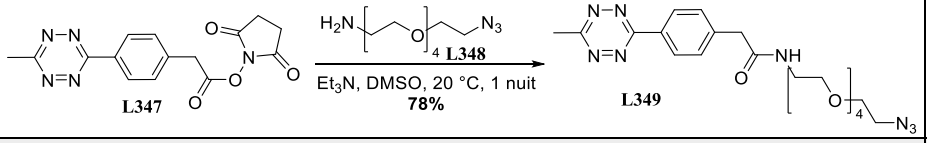
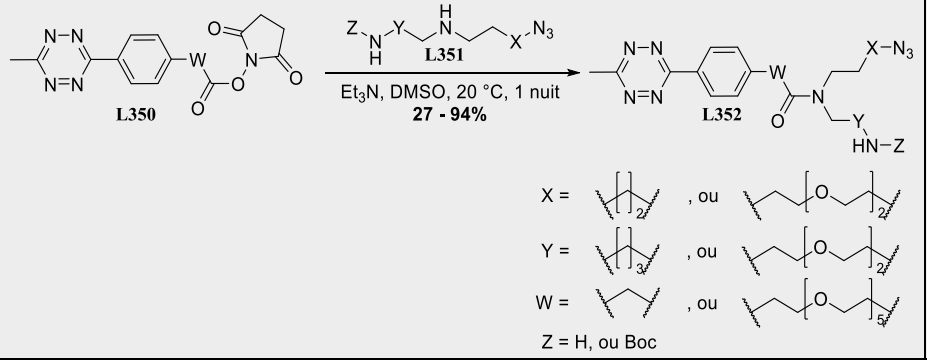


Figure 16 : Ligand fréquemment utilisé dans la CuAAC par solubilité dans l'eau croissant.[350]

3.1.2. Synthèse des azidotétrazines

Dans la littérature, nous avons trouvé 59 azidotétrazines (Tableau 15). Une partie de ces azidotétrazines ont été conçues pour des matériaux énergétiques instables (entrées 1-2).[351] Pour des finalités en biologie, les azidotétrazines ont été envisagées pour la CuAAC comme vu précédemment (entrée 1) et pour la réaction SPAAC (entrées 6-11). Les approches de synthèse des azidotétrazines sont très diversifiées. Le plus souvent, le groupe azido est introduit directement avec l'azoture de sodium ou via une chaine azido-PEG_n (entrées 6, 8, 10, 15 et 16) sur des précurseurs tétraziniques porteurs de groupements amines (entrée 1-3 et 9), acides carboxyliques (entrée 4), esters (entrée 5-7), alcools (entrées 10-11), halogénés (entrées 12-14) ou phosphate d'alkyle (entrée 15). L'accès aux précurseurs tétraziniques reste en général la principale difficulté.

[351] Ghule, V. D.; Sarangapani, R.; Jadhav, P. M.; Tewari, S. P. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2012**, *33* (2), 564–570.

Entrée	Réaction	Référence	Date
Stratégie par post-fonctionnalisation de tétrazines facilement accessibles par synthèse (Pinner)			
1		Chavez *et al*[352]	1999
2		Gozin *et al*[353]	2016
3		Kar *et al*[354]	2013
4		Lin *et al*[355] Bohle *et al*[356]	1954 2004
5		Meinecke *et al*[365]	2019
6		Li *et al*[357]	2014
7		Walker *et al*[363]	2019

[352] Chavez, D. E.; Hiskey, M. A. *J. Energ. Mater.* **1999**, *17* (4), 357–377.
[353] Gozin, M.; Aizikovich, A.; Shlomovich, A.; Cohen, A.; Pechersky, T. WO2016067292A1, **2016**.
[354] Kar, P.; Drew, M. G. B.; Gómez-García, C. J.; Ghosh, A. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (3), 1640–1649.
[355] Lin, C.-H.; Lieber, E.; Horwitz, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76* (2), 427–430.
[356] Weinreb, S. M.; Bohle, M. *Thieme*, **2004**, *17* (2), 585–597.
[357] Li, Z.; Wang, D.; Li, L.; Pan, S.; Na, Z.; Tan, C. Y. J.; Yao, S. Q. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (28), 9990–9998.

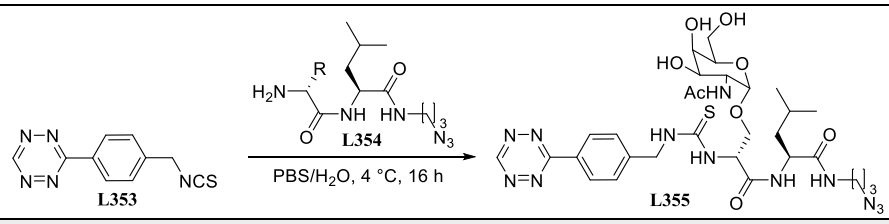
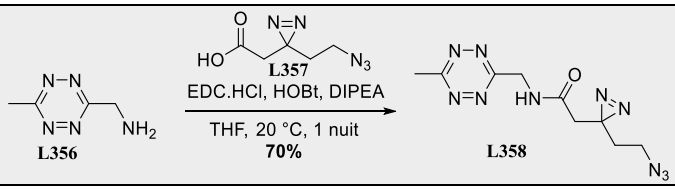
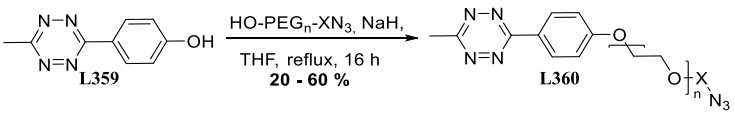
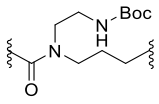
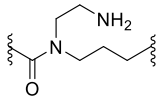
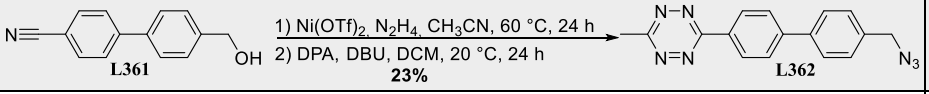
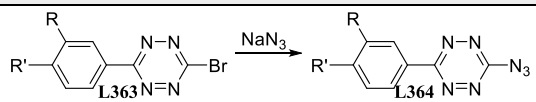
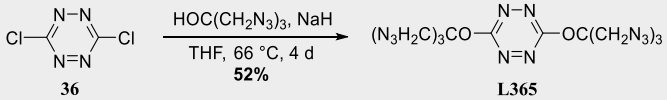
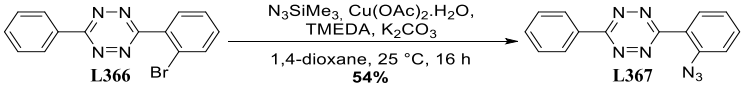
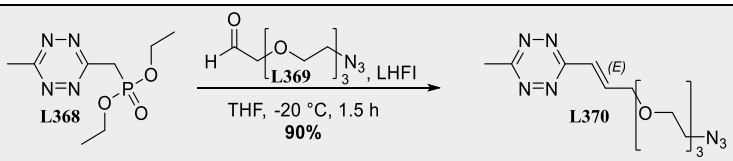
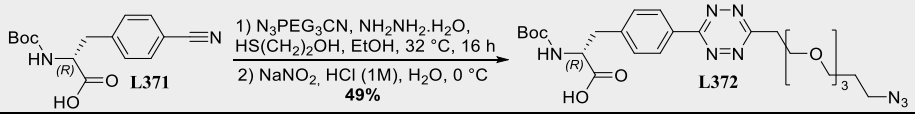
8		Kramer *et al*[358]	2019
9		Pan *et al*[359]	2017
10	   X = CH_2CH_2 (n = 3[176,357] , 4[360,361,362]) ; (n = 5[363]) ; (n = 5[363]), fullerene (n = 8[364])	Li *et al*[357,361] Walker *et al*[363] Yoo *et al*[360] Lee *et al*[362] Stéen *et al*[176] Gulumkar *et al*[364]	2018 2019 2020 2021 2021 2022
11		Meinecke *et al*[365]	2019
12	 R = H ou NO_2, R' = H, Cl, NO_2	Ershov et Postovskii[366]	1971
13		Duddu *et al*[367]	2008
14		Mboyi *et al*[368]	2020
15		Mao *et al*[145]	2019
Stratégie par formation de cycle tétrazinique selon la réaction de Pinner			
16		Mao *et al*[145]	2019

Tableau 15 : Synthèse d'azidotétrazine dans la littérature.

[358] Kramer, J. R.; Onoa, B.; Bustamante, C.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, *112* (41), 12574–12579.
[359] Pan, S.; Jang, S.-Y.; Wang, D.; Liew, S. S.; Li, Z.; Lee, J.-S.; Yao, S. Q. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2017**, *56* (39), 11816–11821.
[360] Yoo, J. S.; Bhise, A.; Lee, W. H. KR20200125472A, **2020**.
[361] Li, J.; Chen, M.; Liu, Z.; Zhang, L.; Felding, B. H.; Moremen, K. W.; Lauvau, G.; Abadier, M.; Ley, K.; Wu, P. *ACS Cent. Sci.* **2018**, *4* (12), 1633–1641.
[362] Lee, W.; Sarkar, S.; Pal, R.; Kim, J. Y.; Park, H.; Huynh, P. T.; Bhise, A.; Bobba, K. N.; Kim, K. I.; Ha, Y. S.; Soni, N.; Kim, W.; Lee, K.; Jung, J.-M.; Rajkumar, S.; Lee, K. C.; Yoo, J. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, *4* (3), 2544–2557.
[363] Walker, J. A.; Bohn, J. J.; Ledesma, F.; Sorkin, M. R.; Kabaria, S. R.; Thornlow, D. N.; Alabi, C. A. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30* (9), 2452–2457.
[364] Gulumkar, V.; Tähtinen, V.; Ali, A.; Rahkila, J.; Valle-Delgado, J. J.; Äärelä, A.; Österberg, M.; Yliperttula, M.; Virta, P. *ACS Omega* **2022**, *7* (1), 1329–1336.
[365] Meinecke, J.; Koert, U. *Org. Lett.* **2019**, *21* (18), 7609–7612.
[366] Ershov, V. A.; Postovskii, I. Ya, *Khim. Geterotsikl. Soedin.*, **1971**, *7* (5), 711-715.
[367] Duddu, R.; Dave, P. R.; Damavarapu, R.; Surapaneni, R.; Gilardi, R.; Parrish, D. *Synth. Commun.* **2008**, *38* (5), 767–774. ; Duddu, R.; Dave, P.; Damavarapu, R.; Surapaneni, R. US8153786B1, **2012**.

Durant la période de ce projet, une dizaine d'azidotétrazines ont été publiées (entrée 5, 7, 8, 10-11 et 14-16). Ces molécules sont donc populaires actuellement.

3.2. Approches et azidotétrazines envisagées

Nous avons choisi en premier lieu pour accéder aux azidotétrazines, des approches par substitution nucléophile avec l'azoture de sodium d'un tosylate (stratégie 1) ou d'un halogène (stratégie 2) à partir de tétrazines déjà formées (Schéma 56). Nous avons ensuite étudié la formation des azidotétrazines par réaction de Pinner d'azidonitriles (stratégie 3).

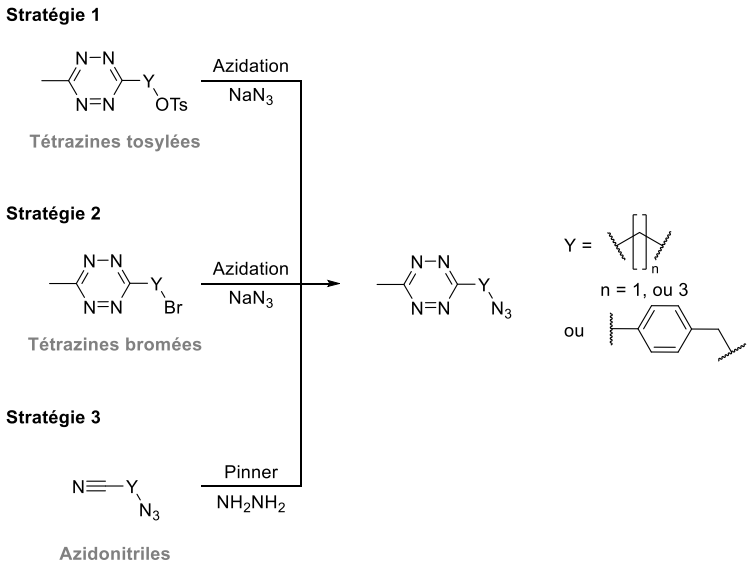


Schéma 56 : Synthèse des azidotétrazines par 3 stratégies différentes.

3.3. Synthèse des azidotétrazines à partir des tétrazinetosylates

À notre connaissance, seulement 6 références concernant des tétrazinetosylates existent dans la littérature (Tableau 16). Les synthèses reposent tous sur la tosylation avec le chlorure de tosyle en présence d'une base (pyridine ou triéthylamine) dans le dichlorométhane à 0 ou 20 °C pendant 12 à 48 h, d'une tétrazine alcool accessible en deux ou trois étapes de synthèse avec une réaction de Pinner. La tosylation est réalisée avec un rendement compris entre 14 et 94%. En moyenne, le rendement est de 55%.

[368] Mboyi, C. D.; Vivier, D.; Daher, A.; Fleurat-Lessard, P.; Cattey, H.; Devillers, C. H.; Bernhard, C.; Denat, F.; Roger, J.; Hierso, J.-C. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2020**, *59* (3), 1149–1154.

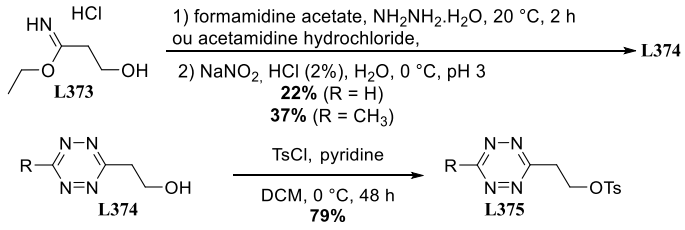
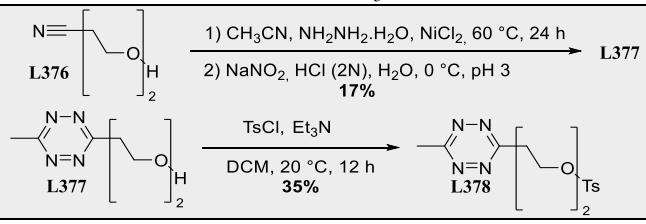
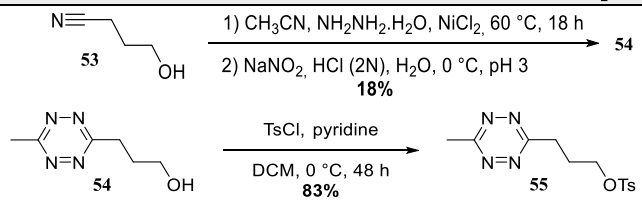
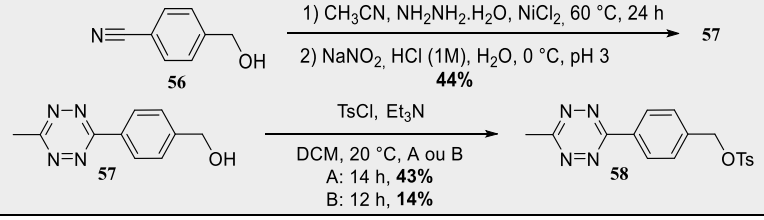
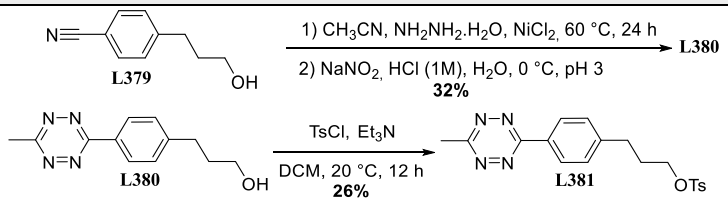
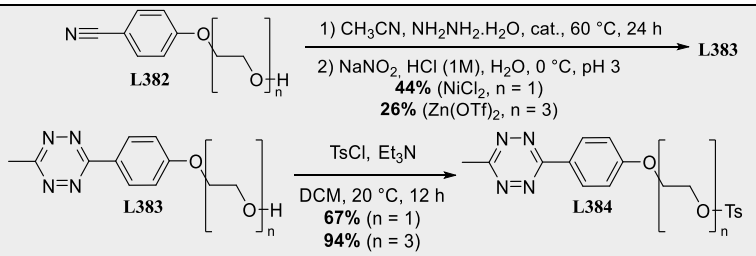
Entrée	Réaction	Référence	Date
1	 R = H ou CH_3	Devaraj *et al*[369]	2015
2		Cui *et al*[372]	2017
3		Denk *et al*[126] Syvänen *et al*[370]	2014 2020
4		(B) Da Pieve *et al*[371] (n = 1)	2016 2017
5		Cui *et al*[372]	2017
6		(A) Zhang *et al*[373] (n = 3)	2017 2020

Tableau 16 : Synthèse de tétrazinetosylates à partir de tétrazinealcools dans la littérature.

Les tétrazine tosylates décrites sont pour la plupart constituées du cycle 4-méthyltétrazine relié au groupe tosylate par une chaine carbonée aliphatique (entrées 1-3). Les autres tétrazine comportent un motif 4-méthyltétrazinephényle (entrées 4-6).

[369] Devaraj, N. K.; Karver, M. R.; Hilderbrand, S. a; Weissleder, R. WO2014065860A1, **2014**.
[370] Syvänen, S.; Fang, X. T.; Faresjö, R.; Rokka, J.; Lannfelt, L.; Olberg, D. E.; Eriksson, J.; Sehlin, D. *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, *11* (24), 4460–4468.
[371] Da Pieve, C.; Allott, L.; Martins, C. D.; Vardon, A.; Ciobota, D. M.; Kramer-Marek, G.; Smith, G. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (8), 1839–1849.
[372] Cui, M.; Liu, B.; Zhang, X. CN107522673A, **2017**.
[373] Zhang, P.; Gao, D.; An, K.; Shen, Q.; Wang, C.; Zhang, Y.; Pan, X.; Chen, X.; Lyv, Y.; Cui, C.; Liang, T.; Duan, X.; Liu, J.; Yang, T.; Hu, X.; Zhu, J.-J.; Xu, F.; Tan, W. *Nat. Chem.* **2020**, *12* (4), 381–390.

3.3.1. Tétrazinetosylates aliphatiques

a) Littérature

Ces tétrazinetosylates ont généralement été développées pour introduire le fluor-18. Historiquement, c'est Denk *et al* en 2014 qui a été le premier à utiliser la tétrazinetosylate **55** pour la radiochimie au fluor-18 (Tableau 16, entrée 3).[126] Cette radiochimie a été répétée par Syvänen *et al* en 2020.[370]

La synthèse de la tétrazine tosylate **55** est réalisée en 4 étapes (Schéma 57, A). La première étape est la conversion du 3-chloro-1-propanol **59** en 4-hydroxybutanenitrile **53**. Historiquement, elle a été réalisée pour la première fois par Deutsch *et al* en 2001 en utilisant uniquement le KCN dans un mélange éthanol et eau (v/v : 3/1) à reflux pendant 1,5 h.[374] avec un rendement de 25%. Ce protocole a été repris par Epple *et al* en 2007 avec un rendement de 37%.[375] Ce protocole repose sur une substitution nucléophile du chlore par le cyanure. Ce type de réaction n'est généralement pas réalisé dans l'eau, mais dans des solvants aprotiques polaires. Ainsi, Denk *et al* en 2014 ont optimisé cette réaction avec un rendement de 48% en utilisant le cyanure de potassium (KCN) dans l'acétonitrile (CH_3CN) en présence d'iodure de tétrabutylammonium (TBAI) et de 18-crown-6 à reflux pendant 24 h. Le 18-crown-6 piège le potassium du KCN pour rendre l'ion cyanure plus réactifs, tandis que le contre-ion tétrabutylammonium améliore la solubilité de l'ion cyanure. Ce protocole a été refait par Baalmann *et al* en 2019 avec un rendement de 41%.[259]

Le nitrile **53** est ensuite engagé dans la réaction de Pinner avec l'acétonitrile et l'hydrazine hydraté à 60 °C pendant 18 h en présence du catalyseur métallique de chlorure de nickel ($NiCl_2$). L'intermédiaire formé est réoxydé à 0 °C à pH 3 par l'acide nitrique généré *in situ* par le mélange de nitrite de sodium ($NaNO_2$) et l'acide chlorhydrique (HCl). Le rendement est de 18% en hydroxytétrazine **54**. Cette synthèse est reprise, et adaptée par Gong *et al*,[376] et Wu *et al*[175] à partir des hydroxynitriles **L385** pour synthétiser de nouvelles tétrazinealcools **386** (présentant des chaînes alkyles plus longues) avec cette fois l'utilisation de trifluorométhanesulfonate de zinc (II) ($Zn(OTf)_2$) (à la place de $NiCl_2$) à 60 °C pendant 48 h (Schéma 57, B). Les rendements en tétrazinealcools **L386** correspondants sont compris entre 20 et 46%.

[374] Deutsch, H. M.; Ye, X.; Shi, Q.; Liu, Z.; Schweri, M. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36* (4), 303–311.
[375] Epple, R.; Cow, C.; Azimioara, M.; Russo, R.; Xie, Y.; Wang, X. WO2007056366A2, **2007**.
[376] Gong, Q.; Wu, H.; Dong, P. CN108997402A, **2018**.

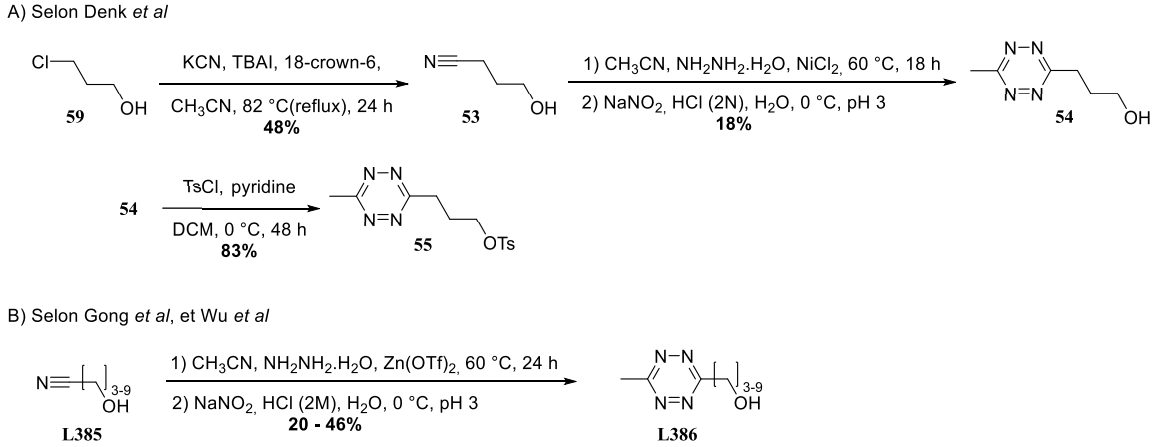
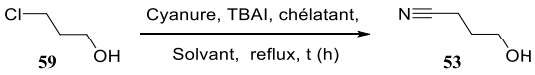


*Schéma 57 : Synthèse des tétrazines tosylées **55** et **L386** selon Denk et al,[126] Gong et al,[376] et Wu et al.[175]*

La tosylation de la tétrazinealcool **54** (avec n = 3) avec le chlorure de tosyle et la pyridine conduit à la tétrazinetosylate **55** avec un rendement de 83%. Étant donné les bons rendements, nous avons envisagé de répéter cette synthèse afin d'obtenir la tétrazine **55** et de la convertir en azidotétrazine.

b) Résultats

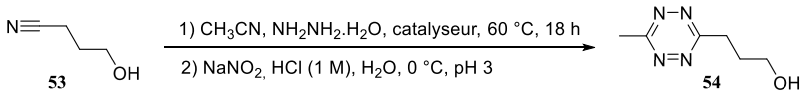
La conversion du 3-chloro-1-propanol **59** en 4-hydroxybutanenitrile **53**, selon le protocole de Denk *et al*[126] avec KCN, TBAI et 18-crown-6 dans l'acétonitrile à reflux pendant 24 h, a conduit à un rendement de seulement 17% (Tableau 17, entrée 1). En remplaçant le 18-crown-6 par K_{222} n'a aucune influence sur ce rendement (Tableau 17, entrée 2). La source des ions cyanures (de KCN à NaCN) a diminué le rendement à 2% (Tableau 17, entrée 3), car le sodium est plus petit et moins piégé par le chélatant. Le changement de solvant (DMF, AcOEt, acétone ou eau) à reflux a conduit respectivement à 17%, 33%, 19% et 1% (Tableau 17, entrée 4-7). L'augmentation de la température à 140 ou 153 °C pour le DMF a augmenté le rendement respectivement à 62% et 65% (Tableau 17, entrée 9-10). Dans les mêmes conditions, la réaction après 65 h a formé le nitrile **53** avec un rendement de 61% (Tableau 17, entrée 11). En résumé, le meilleur rendement a été obtenu avec un rendement de 65% dans les conditions adaptées de Denk *et al*[126] après 65 h.



Entrée	Cyanure	Chélatant	Solvant	Température (°C)	Temps (h)	Rendement (%)
1	KCN	18-crown-6	CH_3CN	82 (reflux)	24	17
2	KCN	K_{222}	CH_3CN	82 (reflux)	24	18
3	NaCN	K_{222}	CH_3CN	82 (reflux)	24	2
4	KCN	K_{222}	DMF	82	24	17
5	KCN	K_{222}	AcOEt	77 (reflux)	24	33
6	KCN	K_{222}	Acétone	56 (reflux)	24	19
7	KCN	K_{222}	DMF	40	24	1
8	KCN	K_{222}	DMF	110	24	19
9	**KCN**	**K_{222}**	**DMF**	**153 (reflux)**	**65**	**65**
10	KCN	K_{222}	DMF	140	65	62
11	KCN	K_{222}	CH_3CN	82 (reflux)	65	61

Tableau 17 : Quelques paramètres clés de la réaction de cyanation.

La réaction de Pinner entre le 4-hydroxybutanenitrile **53**, l'acétonitrile et l'hydrazine hydraté ($NH_2NH_2.H_2O$) à 60 °C pendant 24 h en présence du catalyseur métallique de chlorure de nickel ($NiCl_2$), suivie de l'oxydation à 0 °C avec l'acide nitrique généré *in situ* par le mélange à pH 3 de nitrite de sodium ($NaNO_2$) et l'acide chlorhydrique (HCl), a conduit au méthyltétrazinepropanol **54** avec un rendement est de 3% seulement (Tableau 18, entrée 1). L'utilisation de trifluorométhanesulfonate de nickel (II) ou de zinc a permis d'augmenter le rendement à 14 et 15% (Tableau 18, entrées 2-3). En revanche, avec l'acide 3-mercaptopropionique ($HS(CH_2)_2CO_2H$) dans l'éthanol (EtOH), le méthyltétrazinepropanol **54** n'a pas pu être détecté (Tableau 18, entrée 4). Ce protocole n'est pas adapté avec des substrats portant des fonctions alcools. De plus, nous avons aussi constaté que le méthyltétrazinepropanol **54** était relativement soluble en phase aqueuse rendant difficile son extraction et son isolement.



Entrée	Catalyseur	Rendement (%)
1	$NiCl_2$	1-3
2	$Ni(OTf)_2$	15
3	$Zn(OTf)_2$	14
4	$HS(CH_2)_2CO_2H$	0

Tableau 18 : Différents catalyseur pour la réaction de Pinner.

Le méthyltétrazinepropanol **54** traité avec le chlorure de *p*-toluènesulfonyle (TsCl) en présence de pyridine anhydre dans le dichlorométhane anhydre à 0 °C pendant 48 h a conduit au méthyltétrazinetosylate **55** avec un rendement de 19%.

Pour cette synthèse selon Denk *et al*, nous avons obtenu un rendement global en méthyltétrazinetosylate **55** de 2% seulement (Schéma 58).

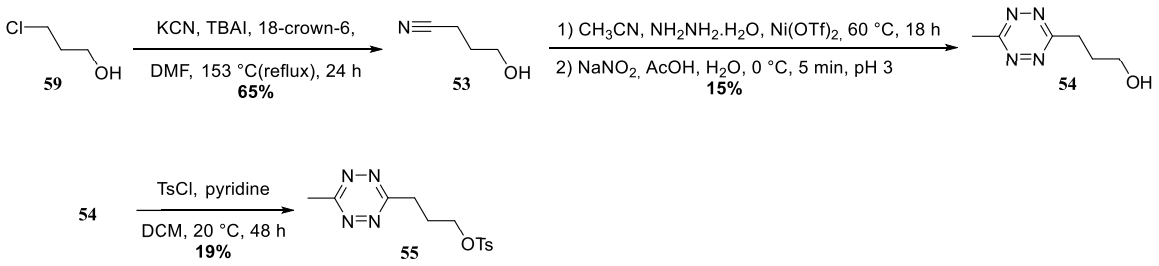


*Schéma 58 : Synthèse optimisée de la tétrazine tosylée **55**.*

Nous nous sommes tournés vers une nouvelle stratégie qui met en jeu tout d'abord la tosylation du 4-hydroxybutanenitrile **53** puis la réaction de Pinner (Schéma 59). La raison principale était d'obtenir la tétrazinetosylate **55** moins soluble dans l'eau que l'hydroxytétrazine **54** pour faciliter les traitements, et d'utiliser un substrat sans alcool libre pour appliquer le protocole de Mao *et al*.[145] Cependant, la tosylation du 4-hydroxybutanenitrile 53 n'a pas été efficace, le rendement ne dépassant pas 10%. Malgré ce rendement bien trop faible, nous avons réalisé la réaction de Pinner avec le tosylate **60** dans les conditions de Denk *et al*.[126] La tétrazine tosylée **55** a été obtenue avec un rendement de 30%. Un substrat moins hydrophile a bien amélioré cette étape. Cependant, le groupe tosyle étant un bon groupe partant, il a pu être substitué par l'hydrazine durant ce protocole. Ce protocole devrait être refait avec un groupement protecteur de l'alcool moins labile dans les conditions de Pinner, et facile à déprotéger pour vérifier ces hypothèses. Malheureusement, ces essais n'ont pas été réalisés.

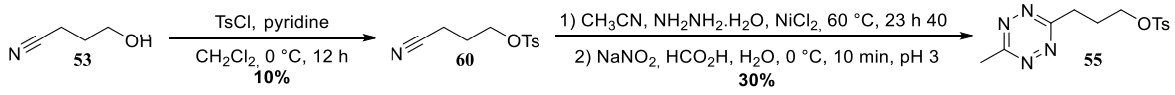


*Schéma 59 : Voie de synthèse alternative pour la 3-(3-azidopropyl)-6-méthyltétrazine **55**.*

Le rendement global en tétrazine tosylée **55** à partir du 3-chloro-1-propanol selon cette voie a été de 1% (Schéma 59), inférieur à celui obtenu selon la voie précédente (Schéma 58). La tétrazine tosylée **55** ayant tout de même pu être isolée, nous l'avons valorisée en l'engageant dans l'étape suivante d'azidation pour ensuite étudier la CuAAC. La tétrazine tosylate **55** a été convertie en azidotétrazine **61** avec l'azoture de sodium (NaN_3) dans le *N*,*N*-diméthylformamide (DMF) à 60 °C pendant 28 h avec un rendement de 71% (Schéma 60).

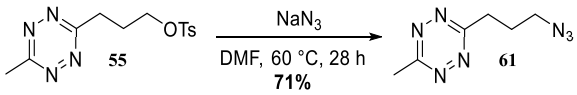
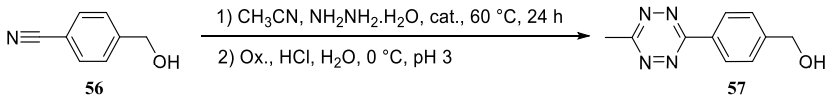


*Schéma 60 : Synthèse de l'azidotétrazine **61**.*

3.3.2. À partir de la tétrazine tosylée 58

Comme présenté précédemment dans le Tableau 16 (entrée 6), Da Pieve *et al* en 2016,[372] puis Cui *et al*. en 2017,[371] ont respectivement synthétisé la tétrazinetosylate **58** à partir du 4-(hydroxyméthyl)benzonitrile **56** via la tétrazinealcool **57** avec un rendement global de 14 et 43%. Les réactions de Pinner sont réalisées selon le même protocole en changeant le catalyseur ($Ni(OTf)_2$, $Zn(OTf)_2$ et $NiCl_2$) ou l'oxydant du $NaNO_2$ en $PhI(OAc)_2$ (PIDA) (Tableau 19). Les rendements sont faibles à moyens compris entre 13 et 66%.



Entrée	Catalyseur	Oxydant	Rendement (%)	Référence	Date
1	$Ni(OTf)_2$	$NaNO_2$	66	Yang *et al*[147]	2012
				Devaraj *et al*[301]	2013
2	$Zn(OTf)_2$	$NaNO_2$	13	Hansell *et al*[377]	2014
3	$Zn(OTf)_2$	$NaNO_2$	26	Lorenzo *et al*[378]	2016
4	$NiCl_2$	$NaNO_2$	44	Da Pieve *et al*[372]	2016
5	$Ni(OTf)_2$	$PhI(OAc)_2$	39	Werther *et al*[379]	2017
6	$Ni(OTf)_2$	$NaNO_2$	41	Sen *et al*[380]	2017
7	$NiCl_2$	$NaNO_2$	44	Cui *et al*[371]	2017
8	$Ni(OTf)_2$	$PhI(OAc)_2$	34	Macias-Contreras *et al*[381]	2020

*Tableau 19 : Synthèse de la tétrazineméthanol **57** dans la littérature.*

Nous avons tenté de reproduire sans succès les protocoles de Yang *et al*,[147] Lorenzo *et al*,[378] et Cui *et al*[371] (entrées 1, 3 et 7) utilisant le 4-(hydroxyméthyl)benzonitrile **56**, l'acétonitrile (CH_3CN) et l'hydrazine hydraté ($NH_2NH_2.H_2O$) en présence de $Ni(OTf)_2$, $Zn(OTf)_2$ ou $NiCl_2$) à 60 °C pendant 24 h. Nous nous sommes alors tournés vers le protocole de Mao *et al* (Schéma 61).[145] Le 4-(hydroxyméthyl)benzonitrile **56** est mis à réagir avec CH_3CN et $NH_2NH_2.H_2O$ à 61 °C pendant 36 h en présence de l'acide 3-mercaptopropionique ($HS(CH_2)_2CO_2H$) dans l'éthanol (EtOH). L'intermédiaire formé est réoxydé à 0 °C par l'acide nitrique généré *in situ* par le mélange à pH 3 de nitrite de sodium ($NaNO_2$) et l'acide chlorhydrique (HCl). Le rendement en tétrazinealcool **57** est de 37%. Nous avons constaté que l'alcool **57** est difficile à extraire du milieu réactionnel. Une grande partie est perdue dans la phase aqueuse lors des extractions. Nous avons aussi observé la formation à l'état de traces de

[377] Hansell, C. F.; Lu, A.; Patterson, J. P.; O'Reilly, R. K. *Nanoscale* **2014**, *6* (8), 4102–4107.
[378] Lorenzo, M. M.; Decker, C. G.; Kahveci, M. U.; Paluck, S. J.; Maynard, H. D. *Macromolecules* **2016**, *49* (1), 30–37.
[379] Werther, P.; Möhler, J. S.; Wombacher, R. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23* (72), 18216–18224.
[380] Sen, R.; Gahtory, D.; Escorihuela, J.; Firet, J.; Pujari, S. P.; Zuilhof, H. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23* (53), 13015–13022.
[381] Macias-Contreras, M.; He, H.; Little, K. N.; Lee, J. P.; Campbell, R. P.; Royzen, M.; Zhu, L. *Bioconjugate Chem.* **2020**, *31* (5), 1370–1381.

la tétrazinedialcool symétrique **62** (rendement isolé inférieur à 1%). La confirmation de la structure de ce dialcool **62** a été confirmée en procédant à la même réaction sans acétonitrile.

La tosylation de la tétrazinealcool **57** avec le chlorure de *p*-toluènesulfonyle (TsCl) en présence de pyridine anhydre dans le dichlorométhane anhydre à 20 °C pendant 96 h a conduit à la tétrazine tosylate **58** avec un rendement de 1% seulement.

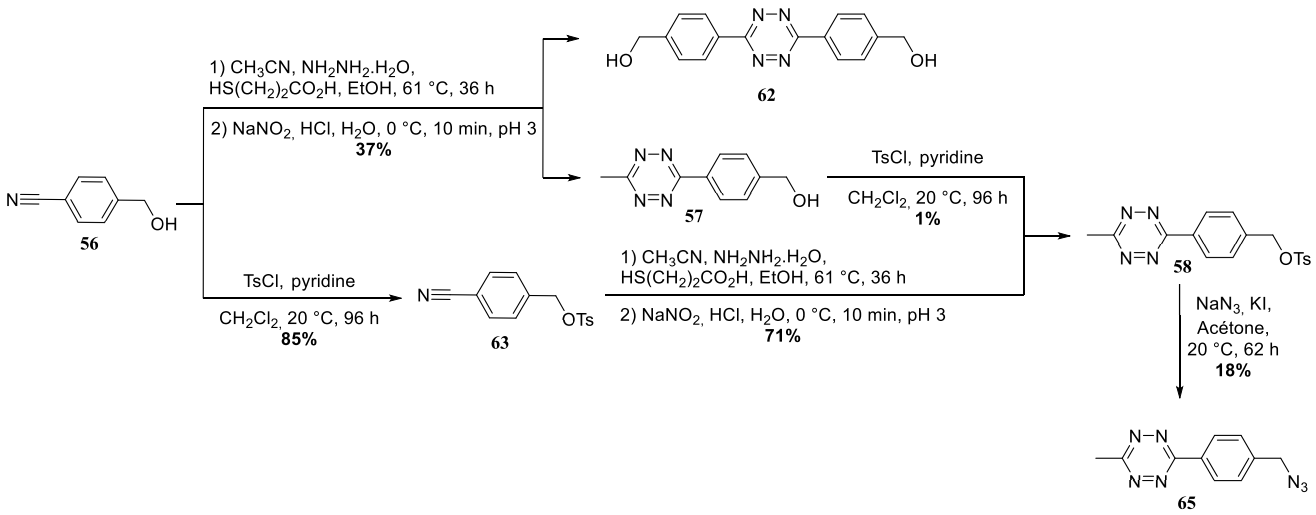


*Schéma 61 : Synthèse de l'azidotétrazine **65** via la tétrazine tosylée **58**.*

Comme précédemment, nous avons inversé l'ordre des étapes dans la synthèse de la tétrazine **58** (Schéma 61). Ainsi, le 4-(hydroxyméthyl)benzonitrile **56** a été tosylé en 4-cyanobenzyl-4-méthylbenzènesulfonate **63** avec le chlorure de *p*-toluènesulfonyle (TsCl) en présence de pyridine anhydre dans le dichlorométhane anhydre à 20 °C pendant 96 h avec un rendement de 85%. Le nitrile tosylée **63** est transformé suivant le protocole de Mao *et al*[145] précédemment décrit en tétrazine tosylée **58** avec un rendement de 71%, soit un rendement global sur 3 étapes de 60%. La tétrazine tosylée **58** a finalement conduit à l'azidotétrazine **65** par réaction avec l'azoture de sodium (NaN_3) en présence d'iodure de potassium (KI) dans l'acétone à 20 °C avec un rendement de 18%.

3.4. Synthèse des azidotétrazines 64 et 65 à partir des bromotétrazines 25 et 27

Ayant en main les bromotétrazines **25** et **27** obtenues précédemment (cf. Schéma 33 p. 96 et Schéma 37 p. 99), nous avons cherché à les convertir en les azidotétrazines correspondantes **64** et **65** avec l'azoture de sodium (Schéma 62). La tétrazine **64** a été obtenue avec un rendement de 41% après réaction dans le *N*,*N*-diméthylformamide (DMF) à 60 °C pendant 28 h. La tétrazine **65** a été obtenue avec un rendement de 78% après réaction en présence d'iodure de potassium (KI) dans l'acétone à 20 °C pendant 62 h. Les rendements

globaux de synthèse des tétrazine **64** et **65** sont de 7% et 42% à partir de l'acétonitrile et du *p*-tolunitrile **20** respectivement.

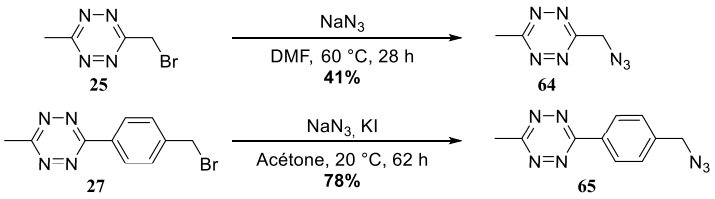


*Schéma 62 : Synthèse des azidotétrazines **64** et **65** à partir des bromotétrazines **25** et **27**.*

3.5. Synthèse des azidotétrazines par réaction de Pinner impliquant un azidonitrile

La dernière approche de synthèse d'azidotétrazines que nous avons examiné concerne la réaction de Pinner impliquant un azidonitrile (Schéma 63). Nous avons préparé les trois azidonitriles **68**, **69** et **70** à partir des bromonitriles **66**, **67** et **6** par réaction de substitution nucléophile avec l'azoture de sodium (NaN_3) en présence d'iodure de potassium (KI) dans l'acétone à 20-30 °C pendant 15-16 h. Cette étape a conduit à l'azidonitrile **68** avec un rendement de 26% seulement, et aux azidonitriles **69** et **70** avec des rendements de 97%. Les produits bruts obtenus ont été quasiment purs.

Nous avons impliqué les azidonitriles **68**, **69** et **70** dans la réaction de Pinner suivant le protocole de Mao *et al*,[145] avec l'acétonitrile (CH_3CN) et l'hydrazine hydraté ($NH_2NH_2.H_2O$) à 40 °C pendant 21-24 h en présence de l'acide 3-mercaptopropionique ($HS(CH_2)_2CO_2H$) dans l'éthanol (EtOH). L'intermédiaire formé est réoxydé à 0 °C par l'acide nitrique généré *in situ* par le mélange à pH 3 de nitrite de sodium ($NaNO_2$) et un acide. Les azidotétrazines **64**, **61** et **65** ont été obtenues avec des rendements de 10, 71 et 48% respectivement (Schéma 63). Nous avons été là encore confrontés au problème de volatilité de l'azidotétrazine **64**, notamment lors de l'élimination de l'acide 3-mercaptopropionique à l'évaporateur rotatif, pouvant expliquer le faible rendement obtenu.

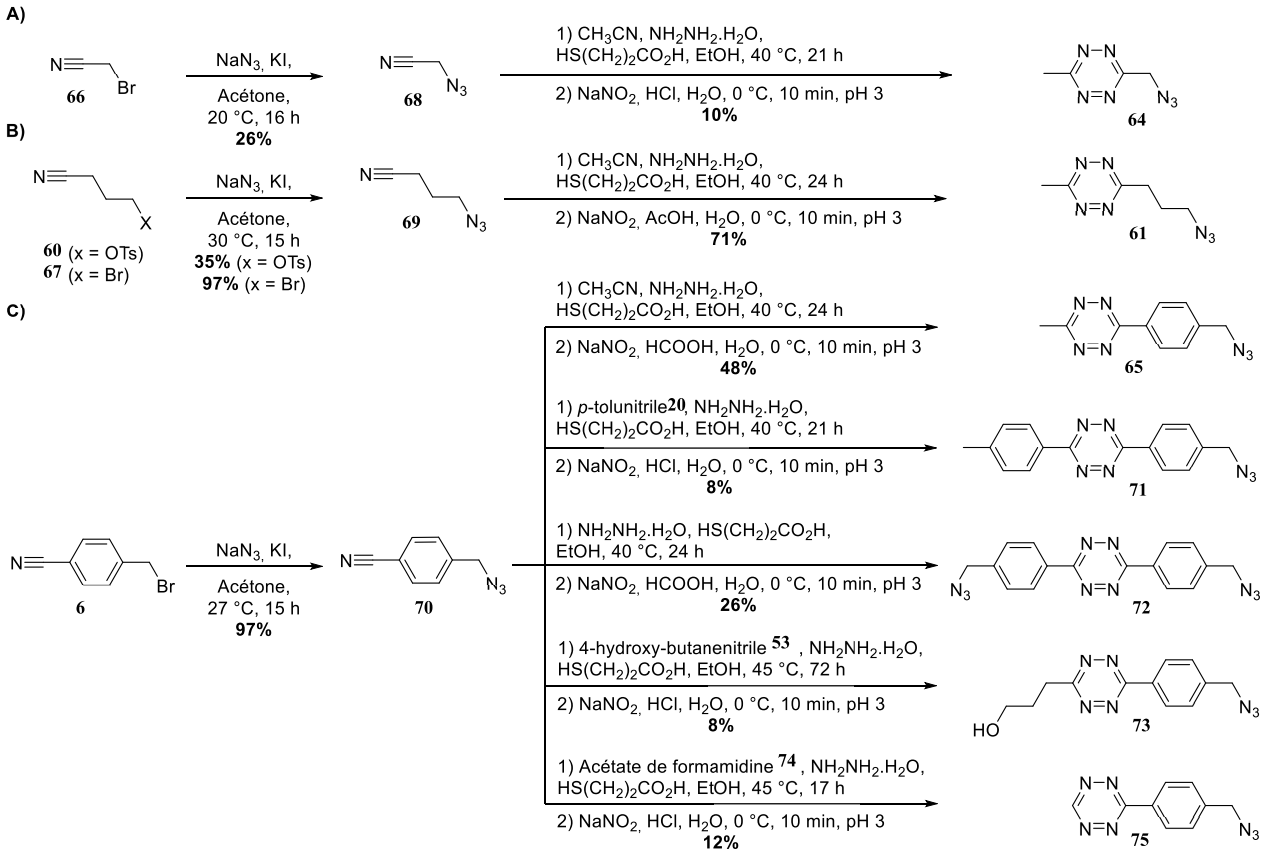


*Schéma 63 : Synthèse des azidotétrazines à partir des bromonitriles **66**, **67** et **6**.*

Nous avons étendu le protocole à la réaction de Pinner de l'azidonitrile **70** avec le *p*-tolunitrile **20**, l'hydroxybutanenitrile **53** et l'acétate de formamidine **74** (Schéma 63). Les azidotétrazines correspondantes attendues **71**, **73** et **75** ont été obtenues avec des rendements de 8 à 12% seulement. Nous avons constaté lors de la synthèse de l'azidotétrazine **71**, la formation majoritaire de l'azidotétrazine symétrique **72** qui a été isolée avec un rendement de 22%. Pour confirmer la structure de l'azidotétrazine **72**, nous avons réalisé la réaction de Pinner avec l'azidonitrile **70** sans aucun autre nitrile. L'azidotétrazine **72** a alors été isolée avec un rendement de 26%. Lors de la synthèse des azidotétrazines **73** et **75**, le nitrile **70** non converti a été récupéré de façon majoritaire.

En bilan, les deux azidotétrazines **61** et **65** ont été obtenues par cette voie avec des rendements très satisfaisants.

3.6. Conclusion

En conclusion, 7 nouvelles azidotétrazines ont été synthétisées avec des rendements faibles à modérés. Parmi celles-ci, les azidotétrazines **61** et **65** ont pu être préparées efficacement par réaction de Pinner impliquant les azidonitriles **69** et **70**. Dans la suite du travail, nous avons privilégié la valorisation de l'azidotétrazine **65** obtenue avec l'un des meilleurs rendements globaux de 46% à partir du 4-(bromométhyl)benzonitrile **6** peu cher

commercialement (Schéma 64). Bien que le rendement total soit supérieur pour la préparation de l'azidotétrazine **61**, celle-ci s'est révélée plus délicate à manipuler en raison de ses propriétés volatiles et de sa capacité à sublimer.

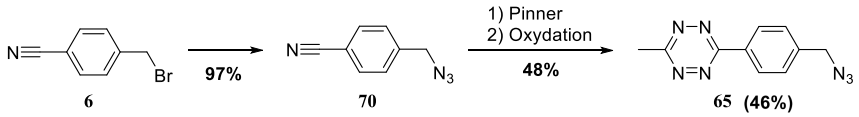


*Schéma 64 : Synthèse totale la plus efficace de l'azidotétrazine **65**.*

3.7. Réaction CuAAC entre les azidotétrazines et la sultone propargylique 15

La butanesultone propargylique **15** a tout d'abord été engagée dans les réactions CuAAC avec les azidotétrazines **64**, **61** et **65** en présence d'iodure de cuivre (CuI à 10% mol) et de triéthylamine (Et_3N à 10% mol) dans le 1,4-dioxane à température ambiance pendant 24 h. Les 1,2,3-triazoles **76**, **77** et **78** correspondants n'ont pas été obtenus dans ces conditions. Nous avons alors utilisé le $CuSO_4$ avec l'ascorbate de sodium dans le 1,4-dioxane. À 20 °C pendant 24 h, nous n'avons constaté aucune formation des triazoles souhaités. Après chauffage à 60 °C pendant 13 h, nous avons bien détecté en LC-MS la formation des triazoles **76** et **77** mais à l'état de traces. En revanche, nous avons isolé la tétrazinesultone **78** avec un rendement de 35% (Schéma 65, A). Nous avons alors remplacé le $CuSO_4$ par $Cu(OAc)_2$ et le dioxane par l'acétone. Avec ces nouvelles conditions, la tétrazine sultone **78** a été obtenue avec un rendement de 49% (Schéma 65, B).

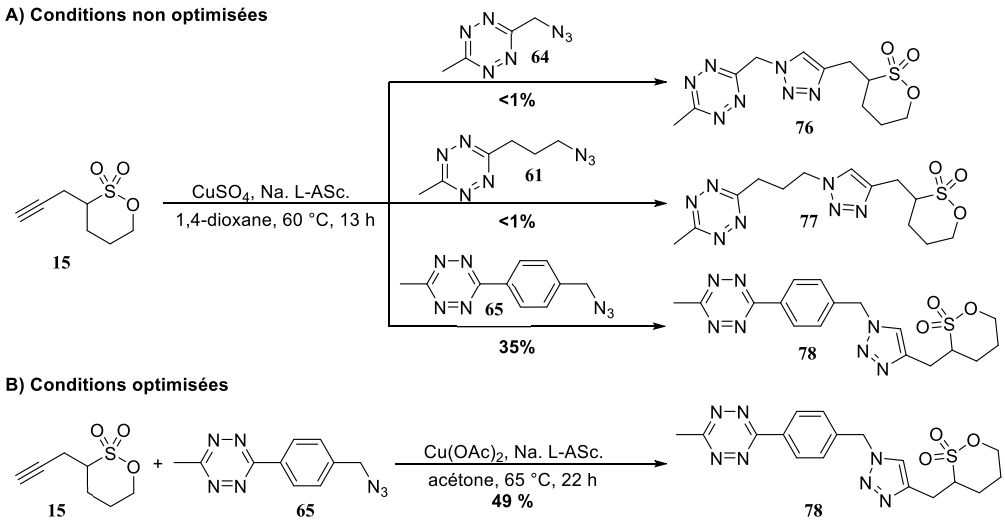


*Schéma 65 : CuAAC entre les azidotétrazines **64**, **61** et **65** et la sultone propargylique **15**.*

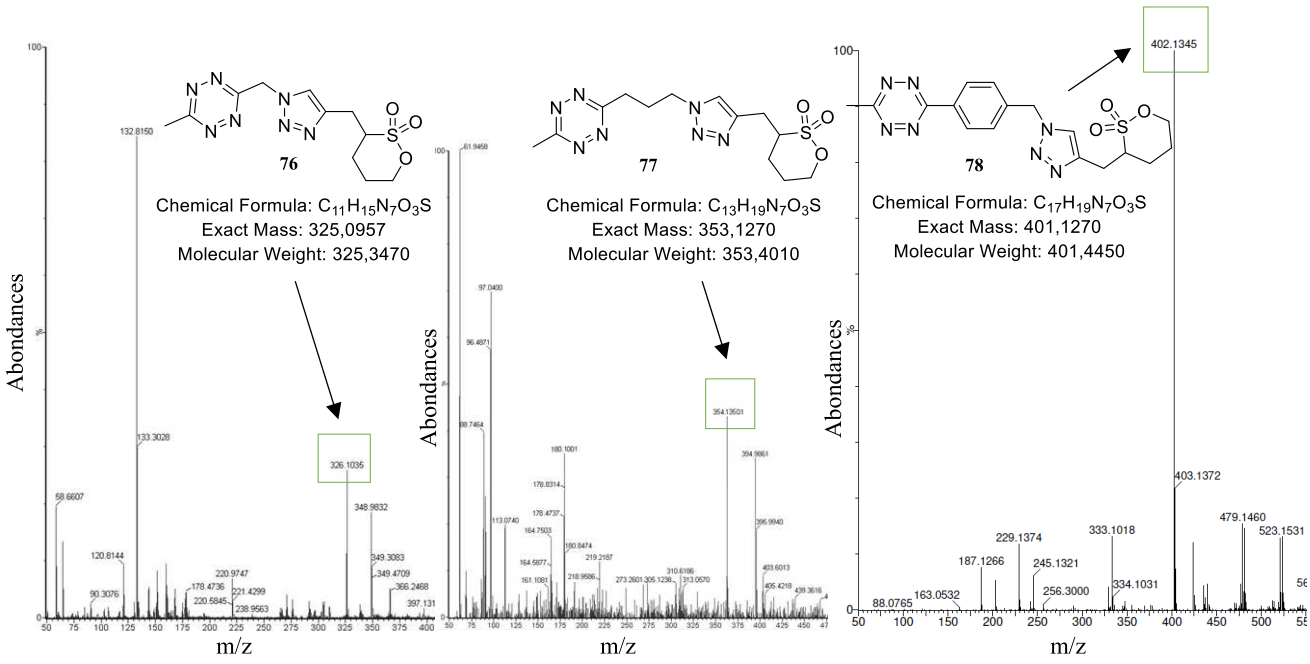


Figure 17 : Spectre de masse ESI⁺ des tétrazines sultones issues de CuAAC.

La tétrazine sultone **78** obtenue avec le rendement le plus satisfaisant sera la seule exploitée dans la suite du projet (cf. chapitre 3).

C. Conclusion générale

Dans ce chapitre, nous avons exploré différentes voies de synthèse de tétrazinesultones (Schéma 66) :

- par fonctionnalisation de la butanesultone commerciale **3** avec les halométhyltétrazines **25** et **27** (voie 1). Cette voie a conduit aux tétrazinesultones **26** et **28** avec des rendements inférieurs à 10%,
- par couplage de Sonogashira entre la butanesultone propargylique **15** (issue de la fonctionnalisation de la butanesultone **3** avec le bromure de propargyle) et les chlorotétrazines **36**, **43**, **45** ou **37** (voie 2). Les rendements en tétrazinesultones **41**, **42**, **46** et **52** n'ont pas dépassé non plus 10%,
- par CuAAC entre la butanesultone propargylique **15** et les azidotétrazines **68**, **69** ou **70** (voie 3). Seule la réaction avec l'azidotétrazine **70** a été probante, et a conduit à la tétrazinesultone **78** avec un rendement de 49%.

La synthèse totale de la tétrazinesultone **78** a été réalisée en seulement 4 étapes à partir du 4-(bromométhyl)benzonitrile **6** commercial avec un rendement global de 23%. Cette synthèse permet donc un accès efficace à la tétrazinesultone **78**.

Les travaux ont porté par la suite sur la chimie de la tétrazinesultone **78**, en particulier sur sa fluoration et sa radiofluoration, pour sa valorisation comme précurseur d'une nouvelle tétrazine radiofluorée utilisable en bioconjugaison (cf. chapitre 3).

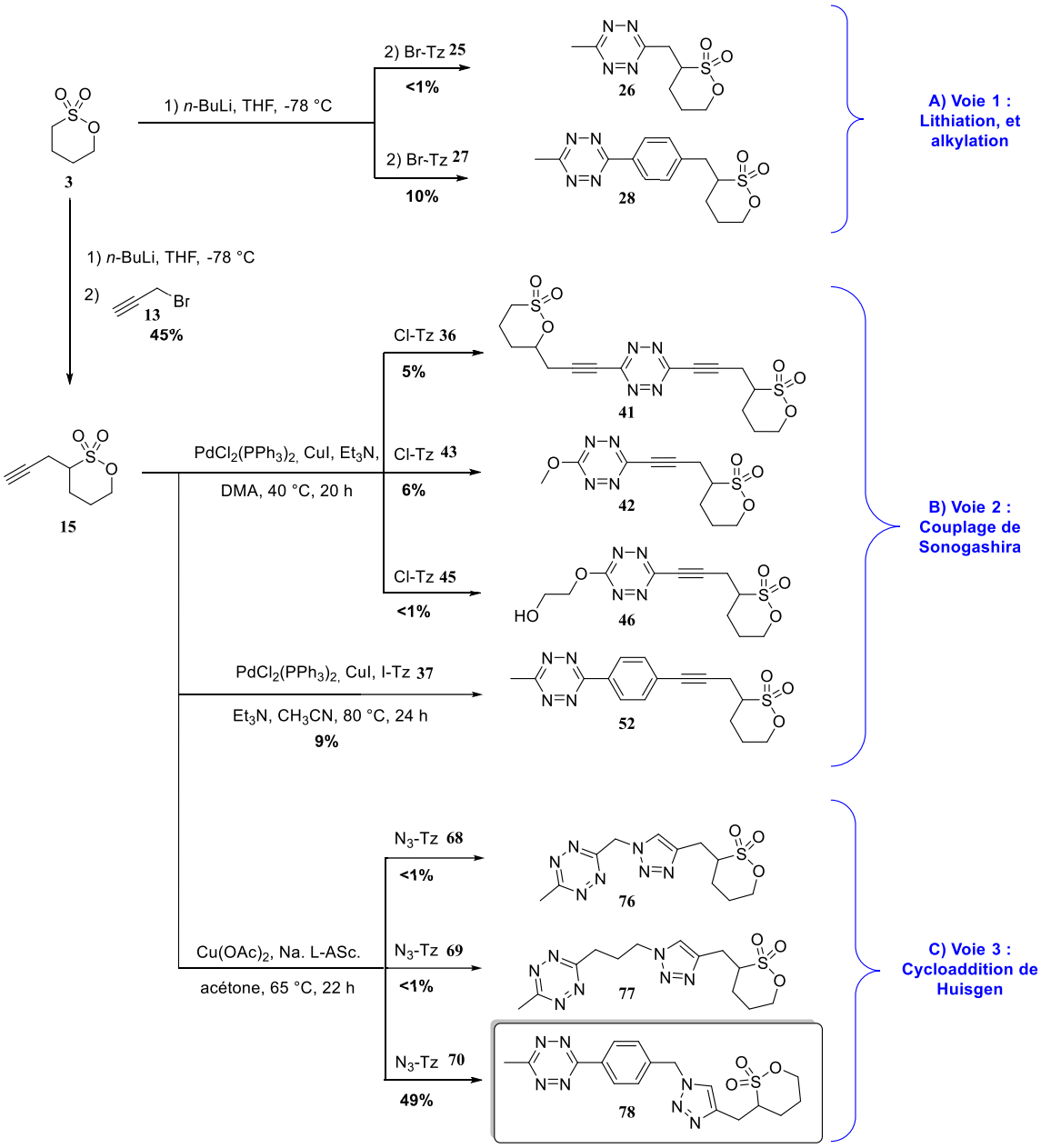


Schéma 66 : Bilan des tétrazinesultones obtenues.

Chapitre

III

Développement des sulfotétrazines pour l'imagerie et évaluation de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79**

3 Développement des sulfotétrazines pour l'imagerie et évaluation de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine [^{18}F]79

Dans ce chapitre, la tétrazine sultone **78** ainsi que ses précurseurs azidotétrazine **65** et sultone propargylique **15** développés précédemment, seront exploités pour accéder aux sulfotétrazines cibles destinées à être valorisées (Schéma 67):

- la fluorosulfotétrazine **79** marquée au fluor-18 pour l'imagerie TEP,
- la sulfotétrazine **80** possédant une entité DOTA **81** pour un marquage avec un radiométal comme ^{111}In pour la TEMP et ^{177}Lu pour le théranostique.
- la sulfotétrazine **82** comportant le motif fluorescéine **83** pour l'imagerie optique.

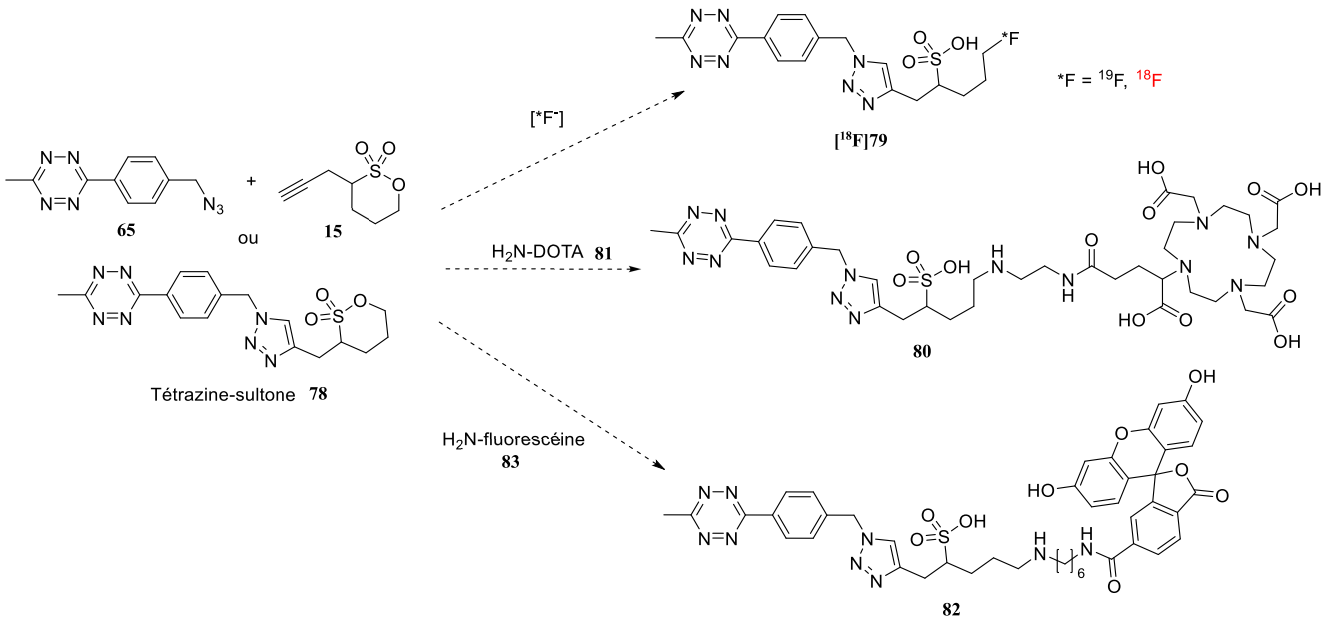


Schéma 67 : Sulfotétrazines cibles destinées à être valorisées en imagerie TEP et optique.

Dans tous les cas, la réaction clé mise en jeu dans les synthèses est l'ouverture du cycle sultone pour simultanément introduire le contrastophore (le radiosiotope fluor-18 et les groupes DOTA et fluorescéine) et libérer le groupe acide sulfonique (cf. chapitre 1). Outre les travaux des synthèses et de radiosynthèse, les études du comportement *in vivo* (biodistribution, pharmacocinétique, radiométabolisme) de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** par imagerie TEP seront également décrites.

A. Synthèse de la fluorosulfotétrazine [^{18}F]79

1. Par fluoration de la tétrazine sultone 78

La première voie envisagée pour accéder à la fluorosulfotétrazine **79** est la fluoration de la tétrazine sultone **78** par attaque nucléophile d'un fluorure (Schéma 68). Nous avons réalisé plusieurs essais avec NaF, KF, CsF ou TBAF, en présence ou non de cryptand K_{222} ou 18-crown-6, dans l'acétonitrile, le tétrahydrofurane, le diméthylformamide, l'acétone, le méthanol, le *tert*-butanol ou le 2,2,2-trifluoroéthanol, en chauffant à 40, 80, 90, 110 °C ou à reflux pendant 4 à 25 h. Dans tous les cas, les analyses LC-MS et RMN ^{1}H et ^{19}F n'ont pas permis de détecter la présence de la tétrazine fluorée **79** attendue ni celle de la tétrazine sultone **78** de départ. Des changements de couleur (passage du rose au brun) indiquant une dégradation de la tétrazine ont été systématiquement observés. En revanche, la formation de la tétrazine fluorée **79** a été détectée par LC-MS dans la réaction de la tétrazine **78** avec CsF (1,1 equiv.) en présence de K_{222} (2 equiv.) et de Cs_2CO_3 (0,3 equiv.) dans l'acétonitrile à reflux pendant 30 min (Figure 18). Nous avons observé que l'ajout de K_{222} (qui a la propriété de piéger l'ion K^+ mais pas Cs^+ en raison de sa taille) facilitait la solubilité de CsF dans le milieu réactionnel, favorisant ainsi la réaction de fluoration. Cependant, tous les essais d'isolement de la fluorosulfotétrazine **79** ont été vains.

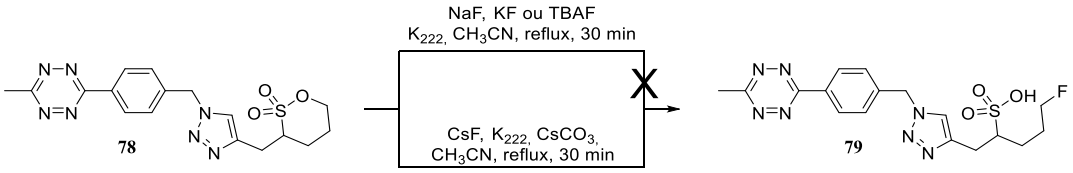


*Schéma 68: Fluoration de la tétrazine sultone **78**.*

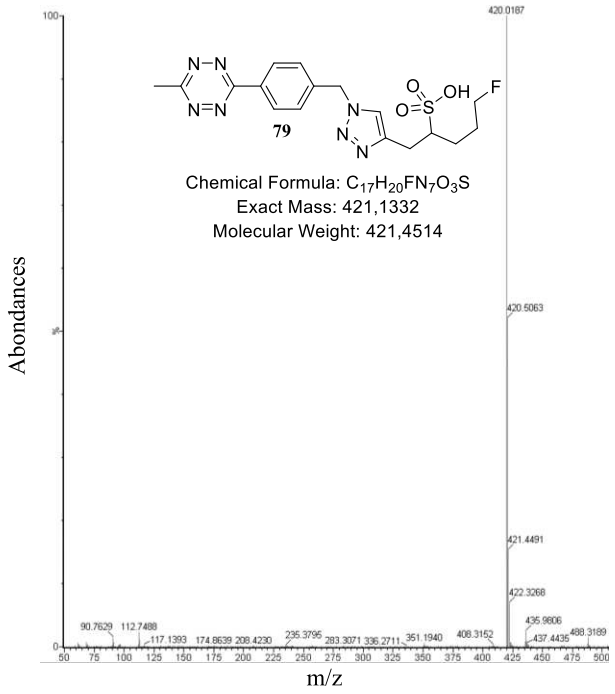


*Figure 18 : Spectre de masse de la fluorosulfotétrazine issu de l'analyse LC-MS de la réaction de fluoration de la tétrazine sultone **79** avec CsF, K_{222} et Cs_2CO_3.*

Ces échecs de fluoration sont en accord avec les conclusions de Zhou *et al*, et de Denk *et al* par exemple rapportant qu'une structure tétrazine n'est pas stable dans les conditions basiques de fluoration au fluor-18 telles que de KF/K_{222}/K_2CO_3 ou TBAF.[126,161]

2. Stratégie en deux étapes

Nous nous sommes tournés vers la stratégie en deux étapes : fluoration de la sultone propargylique **15** puis réaction CuAAC du fluorosulfonate propargylique **84** résultant avec l'azidotétrazine **65** (Schéma 69). Cette stratégie permet d'introduire le fluor en l'absence de tétrazine. Par ailleurs, nous avons constaté dans le chapitre précédent avec la synthèse de la tétrazine sultone **78** que la réaction CuAAC était compatible avec une structure tétrazinique.

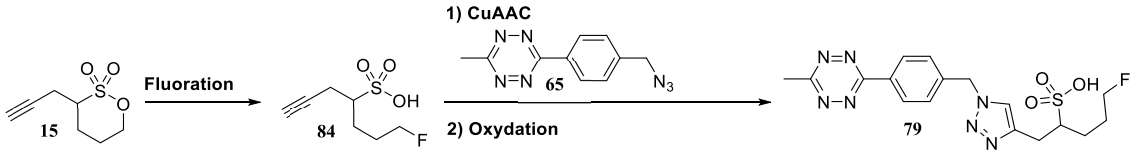


*Schéma 69. Stratégie de synthèse de la fluorosulfotétrazine **79** en 3 étapes.*

2.1. Fluoration de la sultone propargylique 15

Nous avons repris les conditions des essais de fluoration de la tétrazine sultone **78** cités précédemment, à savoir NaF, KF, CsF ou TBAF, en présence ou non de chélatant (18-crown-6 ou K_{222}) dans l'acétonitrile, le tétrahydrofurane, le diméthylformamide, l'acétone, le méthanol, le *tert*-butanol, le 2,2,2-trifluoroéthanol, et en chauffant à 80, 90, 110, 120 °C ou à reflux pendant 15, 18, 20, 24, 48 et 72 h (Schéma 70). Avec le TBAF, quelles que soient les conditions de réaction, les conversions (estimées par RMN ^{1}H et ^{19}F) n'ont jamais été totales, et nous avons été confrontés à des difficultés de séparation du sel d'ammonium avec le produit final **84**. Avec NaF et KF, en présence ou non de cryptand, la sultone de départ **15** est majoritairement récupérée inchangée. Avec CsF (1,1 equiv.) en présence de K_{222} (2 equiv.) et de Cs_2CO_3 (0,3 equiv.) dans l'acétonitrile à reflux pendant 30 min, la conversion a été quantitative. Le fluorosulfonate **84** a été isolé après concentration sous vide puis purification sur cartouche Sep-Pak® Light QMA, et utilisé tel quel dans l'étape suivante.

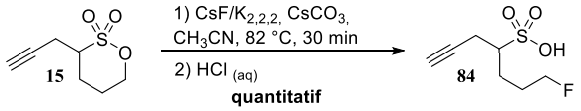
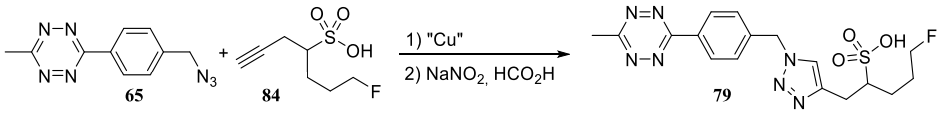


*Schéma 70: Fluoration de la sultone propargylique **15**.*

2.2. Réaction de CuAAC entre le fluorosulfonate propargylique 84 et l'azido tétrazine 65

Plusieurs essais ont été réalisés pour optimiser la réaction de CuAAC entre le fluorosulfonate propargylique **84** et l'azidotétrazine **65**. Nous avons utilisé CuI, $Cu(CH_3CN)_4PF_6$, $Cu(CH_3CN)_4CF_3SO_3$, $CuSO_4$ ou $Cu(OAc)_2$) avec l'ascorbate de sodium (Na Asc) ou non, en présence de Et_3N, DIPEA, DMAP ou s-collidine, à 20 ou 60 °C dans différents solvants (1,4-dioxane, DMF, acétone ou acétone/eau). Les résultats les plus significatifs sont résumés dans le Tableau 20.



Entrée	Sel de cuivre	Base	Additif	Solvant	Température (°C)	Temps (h)	Rendement (%)
1	CuI	Et_3N	-	1,4-dioxane	20	24	2
2	CuI	Et_3N	-	1,4-dioxane	20	0,5	1
3	CuI	DIPEA	-	1,4-dioxane	20	0,5	3
4	CuI	DMAP	-	1,4-dioxane	20	0,5	2
5	CuI	s-collidine	-	1,4-dioxane	20	0,5	3
6	$Cu(CH_3CN)_4$	-	Na Asc	acétone/eau (7/3)	60	0,5	8
7	$CuSO_4$	-	Na Asc	1,4-dioxane	60	0,5	11
8	$CuSO_4$	-	Na Asc	DMF	60	0,5	23
9	$CuSO_4$	-	Na Asc	acétone	60	0,5	38
10	$CuSO_4$	-	Na Asc	H_2O	60	0,5	29
11	$CuSO_4$	-	Na Asc	acétone/eau (7/3)	60	0,5	35
12	$Cu(OAc)_2$	-	Na Asc	acétone/eau (7/3)	20	0,5	20
13	$Cu(OAc)_2$	-	Na Asc	acétone/eau (7/3)	60	0,5	92

*Tableau 20 : CuAAC entre la sultone fluorée **84** et l'azidotétrazine **65**, et réoxydation.*

Avec CuI ou $Cu(CH_3CN)_4PF_6$, quelles que soient les conditions, seules des traces de fluorosulfotétrazine **79** ont été obtenues (rendements <8%, entrées 1-6). Avec $CuSO_4$, les rendements sont restés modestes (rendements compris entre 11 et 38%, entrées 7-11). Avec $Cu(OAc)_2$ et l'ascorbate de sodium dans un mélange acétone/eau (7/3) pendant 30 min, la fluorosulfotétrazine **79** a été obtenue avec un rendement de 20% à 20 °C (entrée 12), et de 92% à 60 °C (entrée 13). Globalement, la nature du sel de cuivre et le solvant sont les deux paramètres qui semblent les plus importants. Les conditions de la réaction de CuAAC trouvées pour la synthèse de tétrazine sultone **78** ne se sont pas avérées adaptées à la synthèse de la fluorosulfotétrazine **84**. En effet, l'utilisation du dioxane ou de l'acétone seul n'a pas été concluante, contrairement au couplage entre l'azidotétrazine **65** et la sultone propargylique **15**, et l'addition d'eau dans l'acétone est nécessaire. Ce résultat peut s'expliquer par les propriétés de solubilité très différentes entre la sultone propargylique **15** (liposoluble) et le fluorosulfonate propargylique **84** (hydrophile).

En bilan, la fluorosulfotétrazine **79** a été obtenue en trois étapes à partir de la sultone propargylique **15** avec un rendement global de 77%.

B. Radiosynthèse de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine [^{18}F]79

Pour le marquage au fluor-18 de la fluorosulfotétrazine **79**, nous avons examiné les deux approches étudiées en chimie non radioactive, c'est-à-dire la radiofluoration directe de la tétrazine sultone **78**, et la séquence radiofluoration / réaction de CuAAC à partir de la sultone propargylique **15**. Les radiosynthèses ont été mises au point manuellement à partir de petites quantités de radioactivité en fluor-18 (< 500 µCi ≈ 18,5 MBq), puis transposées sur automate avec de quantités de radioactivité en fluor-18 plus élevées (de l'ordre de 500 mCi ≈ 18,5 GBq).

1. Production du fluor-18

Le fluor-18 a été produit au sein du cyclotron IBA Cyclone® 18/9 de Cyceron par irradiation d'une cible d'eau enrichie en Oxygène-18 selon la réaction nucléaire ^{18}O (p, n) ^{18}F. Le fluor-18 est récupéré en sortie de cyclotron en solution aqueuse sous forme d'ions fluorures [^{18}F]F$^-$. De façon conventionnelle, avant de les engager dans les réactions de radiofluoration notamment par SN_2 aliphatique, les fluorures [^{18}F]F$^-$ sont tout d'abord retenus sur une cartouche échangeuse d'anions (Sep-Pak® Light QMA-CO_3 de chez ABX préconditionnée avec du K_2CO_3), puis élués avec une solution de K_2CO_3 (0,5 mg) et K_{222} (10,5 mg) dans un mélange eau (300 µL) / acétonitrile (450 µL). Ils sont ensuite séchés par distillation azéotropique sous flux d'azote à 100 °C. Cette méthode implique des conditions basiques de fluoration qui peuvent être incompatibles avec des substrats sensibles, et notamment avec des précurseurs tétraziniques. Pour diminuer la basicité, K_2CO_3 a été remplacé par d'autres bases carbonates, sulfates ou phosphates. Bratteby *et al* en 2021 ont par exemple comparé la radiofluoration de tétrazines sensibles en utilisant $KHCO_3$, $K_2C_2O_4$, $(Bu_4N)_2SO_4$, Bu_4NOMs, Bu_4NOTf, $Bu_4NH_2PO_4$, Et_4NHCO_3 ou Bu_4NHCO_3 dans divers solvants tels que CH_3CN, DMSO ou *t*BuOH/CH_3CN.[382,383] Les meilleurs rendements radiochimiques ont été obtenus avec [^{18}F]Bu_4NF/Bu_4NOMs dans le mélange CH_3CN/DMSO (1/1).[174] Un autre procédé permet de diminuer la quantité de K_2CO_3 jusqu'à 50 µg pour l'élution des [^{18}F]fluorures des cartouches QMA en utilisant du triflate de potassium (KOTf) à environ 10 mg.[384]

[382] Bratteby, K.; Shalgunov, V.; Battisti, U. M.; Petersen, I. N.; van den Broek, S. L.; Ohlsson, T.; Gillings, N.; Erlandsson, M.; Herth, M. M.. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2021**, *4* (5), 1556–1566.
[383] Andersen, I. V.; García-Vázquez, R.; Battisti, U. M.; Herth, M. M. *Molecules* **2022**, *27* (13), 4022–4033.
[384] Bratteby, K.; Shalgunov, V.; Herth, M. M. *ChemMedChem* **2021**, *16* (17), 2612–2622.

2. Radiofluoration de la tétrazine sultone 78

Nous avons tout d'abord tenté la radiofluoration de la tétrazine sultone **78** (5 mg, 12,5 µmol) dans les conditions conventionnelles de radiofluoration avec [^{18}F]KF/K_{222} (10,5 mg, 25 µmol, 2 equiv.)/K_2CO_3 (0,5 mg, 4 µmol, 0,3 equiv.) (obtenu, purifié et séché comme décrit ci-dessus) dans l'acétonitrile à reflux (Schéma 71). Dès les premières minutes (t < 5 min), nous avons observé un changement de coloration du milieu réactionnel qui passe du rouge au brun orangé. Après 1 h, la couleur du milieu réactionnel est jaunâtre. Les analyses par radioHPLC du mélange réactionnel au cours du temps n'ont pas révélé la formation de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine [^{18}F]**79** (par référence avec la fluorosulfotétrazine stable). Les analyses par radioCCM montrent un pic radioactif majoritaire correspondant aux fluorures [^{18}F]F^- et plusieurs autres pics minoritaires avec des R_f compatibles avec des produits organiques. Nous avons émis l'hypothèse que le changement de couleur pouvait correspondre à la réduction du cycle tétrazine en dihydrotétrazine correspondante.[161,385,386,387] Nous avons alors refait des essais en ajoutant, 20 min après le début de la radiofluoration, le nitrite de sodium et l'acide formique pour une réoxydation éventuelle. Nous n'avons pas constaté une recoloration rouge (caractéristique de la tétrazine) du milieu réactionnel, ni détecté par radioCCM et radioHPLC la présence de [^{18}F]fluorosulfotétrazine [^{18}F]**79**. Nous avons répété ces essais en changeant la température (20, 50 ou à reflux) dans le CH_3CN et celle (20, 50, 90, 100, 110, 120 et 130 °C) dans le DMF. Dans tous les cas, les analyses par HPLC et radioCCM sont restées similaires. Dans ces conditions de radiofluoration basiques, la tétrazine sultone de départ se dégrade totalement.

[385] Nickerl, G.; Senkovska, I.; Kaskel, S. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (12), 2280–2282.
[386] Ortiz-Gomez, I.; Ortega-Muñoz, M.; Salinas-Castillo, A.; Álvarez-Bermejo, J. A.; Ariza-Avidad, M.; de Orbe-Payá, I.; Santoyo-Gonzalez, F.; Capitan-Vallvey, L. F. *Talanta* **2016**, *160* (1), 721–728.
[387] Razavi, S. A. A.; Masoomi, M. Y.; Morsali, A. *Chem. – Eur. J.* **2017**, *23* (51), 12559–12564.

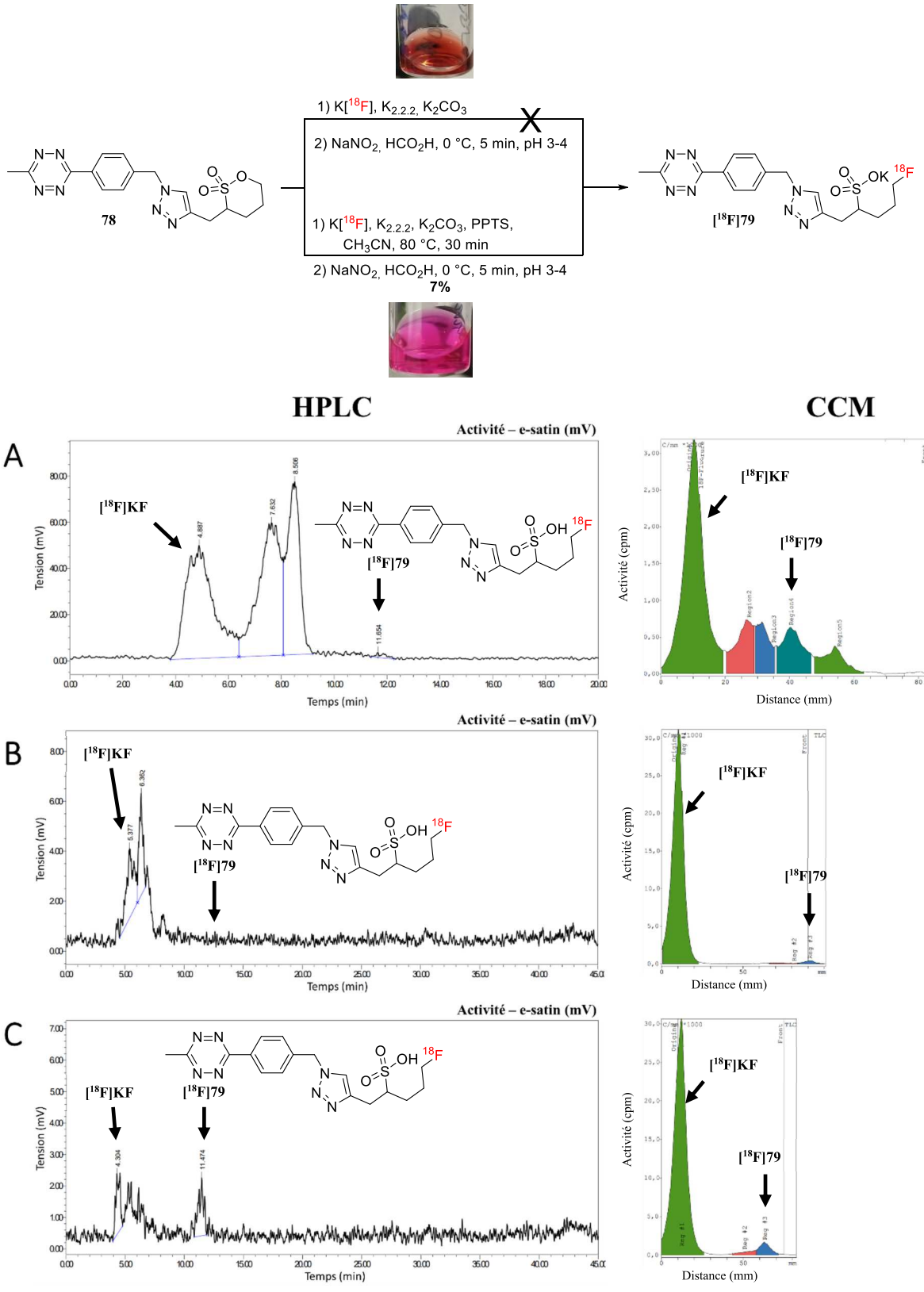


*Schéma 71 : Radiofluoration de la tétrazine sultone **[18F]79** et analyses HPLC et radioCCM avec (A) [18F]KF/K222/K2CO3 dans CH3CN ; (B) [18F]KF/K222/KH2PO4 ; (C) [18F]KF/K222/ K2CO3/PPTS.*

Nous avons alors remplacé K_2CO_3 par $KHCO_3$, KH_2PO_4, K_2HPO_4, K_3PO_4, $KHSO_4$, K_2SO_4, Cs_2CO_3, *t*BuOK, Et_3N, DIPEA, DMAP ou *s*-collidine (en conservant la même quantité

micromolaire). L'élution des ions fluorures [^{18}F]F$^-$ de la cartouche échangeuse d'anions (Sep-Pak® Light QMA-CO_3) a été, comparé à K_2CO_3, aussi efficace pour toutes les bases inorganiques (> 90%) mais moins efficace avec les bases organiques (35-51%). Dans tous les cas, la formation de [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** n'a pas été détectée. Nous avons aussi utilisé la méthode d'élution des [^{18}F]fluorures avec KOTf (10 mg) / K_2CO_3 (0,05 mg) avec ou sans K_{222} (25 mg) pour être dans les conditions les moins basiques possibles. Aucune amélioration n'a été constatée.

Les derniers essais ont été réalisés avec [^{18}F]KF/K_{222} (10,5 mg)/K_2CO_3 (0,5 mg) en présence de toluènesulfonate de pyridium (PPTS, 3,8 mg) dans l'acétonitrile à 80 °C pendant 30 min. Après radiofluoration, le milieu est devenu jaune orangé. La réoxydation par l'acide nitrite (généré *in situ* par le nitrite de sodium et l'acide formique) a conduit à une recoloration rose du milieu. L'analyse par radioHPLC et par radioCCM a mis en évidence un pic correspondant à la tétrazine attendue avec une conversion estimée de 7% (Schéma 71). Après purification par HPLC semi-préparative, la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** a été isolée avec un rendement non corrigé de la décroissance de 5% et corrigé de la décroissance de 7% après 1 h de radiosynthèse totale. Ce résultat reste insuffisant pour pouvoir produire des quantités suffisantes de [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79**.

3. Radiosynthèse multi-étape de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine [^{18}F]79

3.1. Fluoration de la sultone propargylique 15

La radiofluoration de la sultone propargylique **15** a été mise au point précédemment au laboratoire dans le cadre de la thèse de A.-E. Lafargue. [232,233] La réaction est effectuée avec [^{18}F]KF/K_{222} (10,5 mg)/K_2CO_3 (0,5 mg) dans l'acétonitrile (1 mL) à reflux pendant 15 min et en utilisant 5 mg de sultone précurseur. Elle conduit à l'acide [^{18}F]fluorosulfonique **[^{18}F]84** (identifié par radioHPLC et radioCCM) avec des rendements corrigés de la décroissance compris entre 80 et 95% (Figure 19 et Schéma 72). Nous avons repris ces conditions et obtenus des rendements radiochimiques similaires de 90 à 96%. L'acide [^{18}F]fluorosulfonique **[^{18}F]84** a été purifié et isolé par HPLC semi-préparative (Phenomenex Gemini® C18 5 µm, éluant : tampon phosphate à pH 2,1 / EtOH : 72/28, 3,3 mL/min à λ = 254 nm). L'acide [^{18}F]fluorosulfonique **[^{18}F]84** est collecté à 8,6 min avec un rendement non corrigé de 59% après 60 min, soit un rendement corrigé de la décroissance de 92%. Nous avons testé la radiofluoration de la sultone propargylique **15** dans l'acétone mais celle-ci a conduit à des rendements radiochimiques bien inférieurs (30-35%).

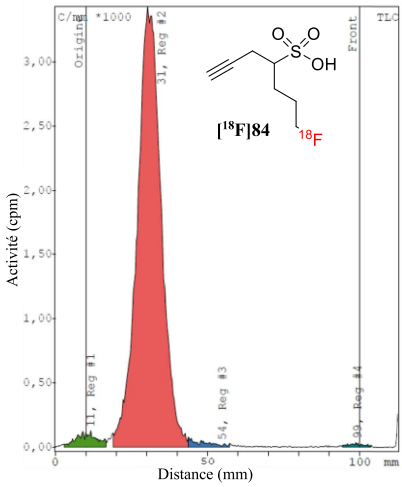
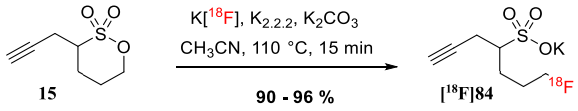


*Figure 19 : Radio-CCM de la fluoration de la sultone propargylique **15**.*



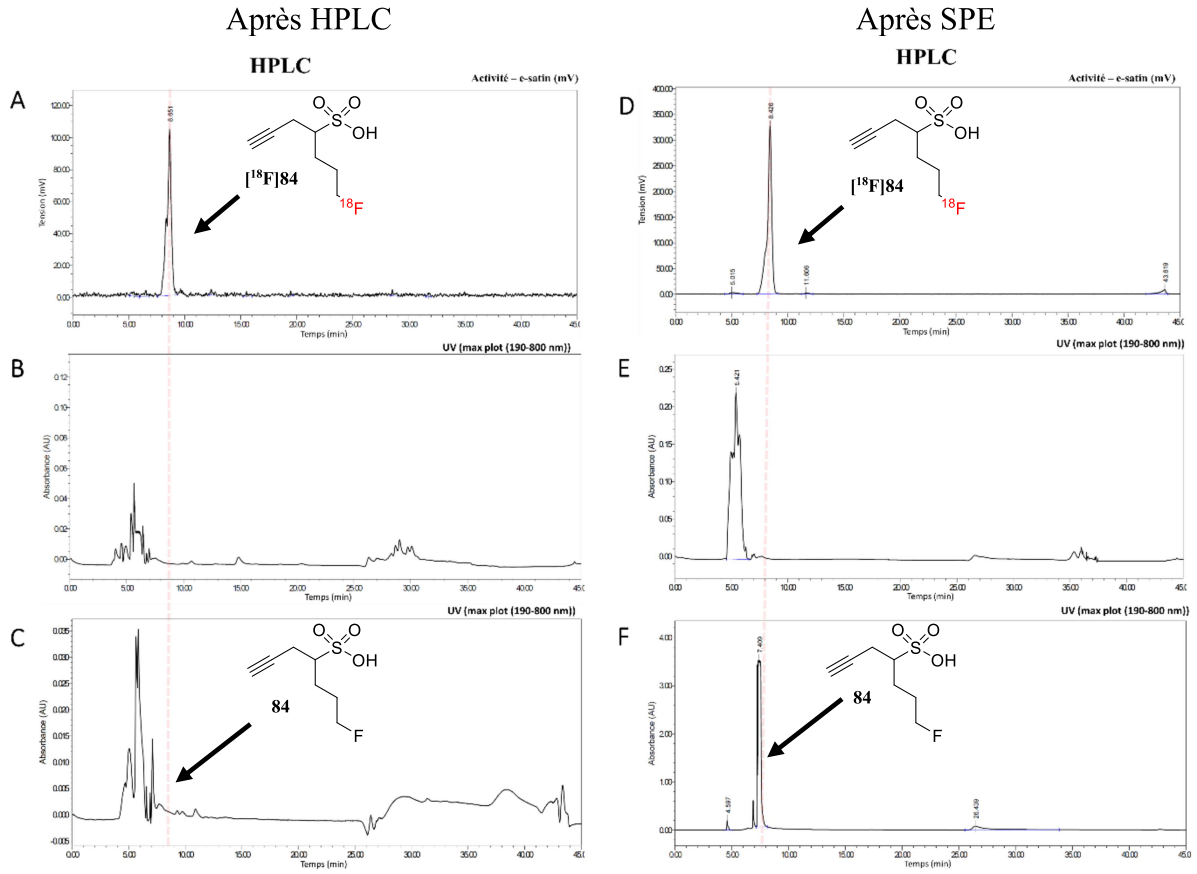


*Schéma 72 : Radiofluoration de la sultone propargylique **15** et comparaison entre **[18F]84** purifié par HPLC semi-préparative (A-B) et SPE (D-E) suivant respectivement l'activité détectée par e-SAT/IN en A) et D), l'UV détectée par la barrette d'iode en B) et E), et comparée à l'UV de l'acide fluorosulfonique **84** à la même concentration en C), et saturée en F).*

Avant d'engager l'acide [^{18}F]fluorosulfonique **[^{18}F]84** dans l'étape suivante de la réaction de CuAAC avec l'azidotétrazine **65**, nous avons cherché à mettre au point sa purification par SPE plus adaptée que par HPLC. Après radiofluoration, le milieu réactionnel a été dilué dans l'eau (10 mL). Nous avons comparé plusieurs cartouches (silice, alumine, Oasis®, C18, tC18, et QMA). Le sulfonate **[^{18}F]84** n'élue pas en phase normale, tandis que la phase inverse et les résines échangeuses d'ions le permettent. La cartouche la plus appropriée s'est avérée être le Sep-Pak® Light QMA (préconditionnée par CH_3CN puis H_2O). Après passage du milieu réactionnel dilué dans l'eau, l'acide [^{18}F]fluorosulfonique **[^{18}F]84** et les fluorures [^{18}F]F^- sont retenus quantitativement sur le Sep-Pak® Light QMA. L'acide [^{18}F]fluorosulfonique **[^{18}F]84** est ensuite élué sélectivement avec l'acétonitrile, sans contamination avec les fluorures [^{18}F]F^-. Le rendement d'élution de l'acide [^{18}F]fluorosulfonique **[^{18}F]84** sur QMA est de l'ordre de 96%. Le remplacement de l'acétonitrile par l'acétone a conduit à une diminution de moitié du rendement d'élution de l'acide [^{18}F]fluorosulfonique **[^{18}F]84**. Nous avons alors conservé

l'acétonitrile comme solvant d'élution. Une distillation azéotropique (avec 3 ajouts successifs d'acétone de 0,5 mL) sous flux d'azote à 50 °C pendant 7 min a ensuite permis d'éliminer l'acétonitrile afin de pouvoir reprendre l'acide [^{18}F]fluorosulfonique **[^{18}F]84** dans un solvant approprié pour la réaction de CuAAC ultérieure.

Il est à noter que la purification par HPLC et celle par QMA ont donné la même pureté radiochimique (>95%) en l'acide [^{18}F]fluorosulfonique **[^{18}F]** (Schéma 72). Au vu du temps gagné par SPE versus par HPLC, cette purification intermédiaire a été adoptée.

3.2. CuAAC avec l'azidotétrazine 65

Nous avons repris les conditions de réaction de CuAAC définies en chimie non radioactive entre l'acide fluorosulfonate **[^{18}F]84** et l'azidotétrazine **65**. Ces conditions correspondent à l'utilisation de $Cu(OAc)_2$ et de L-ascorbate de sodium dans un mélange acétone/eau 7/3 à 60 °C. Plusieurs essais ont été réalisés, notamment pour ajuster les quantités et l'ordre d'addition de chacun des réactifs ainsi que les volumes de solvant et les temps de réaction. Par ailleurs, nous avons observé des changements de couleur (passage du rose au brun ou jaune orangé) pouvant indiquer la présence de dihydrotétrazine, la forme réduite de tétrazine, mais aussi la dégradation des tétrazines précurseurs ou finales. Une étape supplémentaire d'oxydation a donc dû être ajoutée (comme en chimie non radioactive) sans savoir si les conditions d'oxydation étaient appropriées. L'étude et les travaux d'optimisation de l'ensemble de cette séquence cycloaddition/oxydation, ont été particulièrement longs, et restent difficiles à détailler et à rationnaliser. Seuls les résultats probants et significatifs sont décrits ci-après.

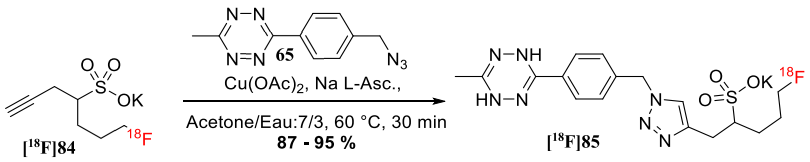


*Schéma 73 : CuAAC entre l'acide fluorosulfonate **[^{18}F]84** et l'azidotétrazine **65**.*

La réaction a été réalisée à partir de l'acide [^{18}F]fluorosulfonique **[^{18}F]84** purifié par SPE et repris dans l'acétone, avec l'azidotétrazine **65** (5 mg) et un mélange (de couleur jaune fraichement préparé dans un réacteur séparé sous azote 2 min avant la CuAAC) de $Cu(OAc)_2$ (8 mg) et L-ascorbate de sodium (30 mg) dans l'acétone/eau 7/3 (1 mL) (Schéma 73). Après chauffage pendant 30 min, le milieu réactionnel est devenu jaune orangé. L'oxydation de **[^{18}F]85** a alors été effectuée à 0 °C pendant 5 min avec l'acide nitrite généré *in situ* par réaction du nitrite de sodium (30,5 mg) avec l'acide formique (100 µL). La couleur du mélange réactionnel a viré au rouge. L'analyse par HPLC et radio CCM de ce mélange réactionnel final a conduit à des résultats non reproductibles. Il a alors été nécessaire de prépurifier ce mélange avant de l'injecter en HPLC.

Cette pré-purification a été réalisée sur un Sep-Pak® tC18 Plus Long Environmental préconditionné avec de l'éthanol puis l'eau. Le mélange réactionnel a été dilué dans l'eau puis déposé sur la cartouche tC18. Cette cartouche a été lavée à l'eau avant de procéder à l'élution avec l'éthanol. Le lavage à l'eau permet d'éliminer les éventuels ions fluorures [^{18}F]F^{-} et le [^{18}F]fluorosulfonate **[^{18}F]84** résiduels (Schéma 73). La solution d'éthanol récupérée a été ensuite diluée dans une solution de tampon phosphate (3,5 mL, pH = 2,1) et injectée en une seule fois en HPLC semi-préparative (conditions identiques à celles décrites ci-avant pour le [^{18}F]fluorosulfonate propargylique). La [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** a été collectée sur moins de 2 min à 28-29 min. La contre-pression de la colonne et le débit maximal de la pompe (3,3 mL/min) ne permettent pas de réduire ce temps. Selon cette séquence de radiosynthèse, la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** a été obtenue à partir du [^{18}F]fluorosulfonate **[^{18}F]84** avec un rendement radiochimique corrigé de la décroissance (RCD) compris entre 87 et 95%. Cette étape de CuAAC a été répétée deux fois avec un rendement (RCD) compris entre 91 et 99%. Il a nécessité pas moins de 60 essais avant d'être optimisé.

Curieusement, la même réaction réalisée avec $Cu(OAc)_2$ sans L-ascorbate de sodium a conduit à un rendement radiochimique comparable. Nous avons aussi testé la réaction de CuAAC dans l'acétonitrile (pour éviter l'élimination de l'acétonitrile après la purification par SPE du [^{18}F]fluorosulfonate **[^{18}F]84** mais les rendements radiochimiques n'ont pas dépassé 5%. L'utilisation d'acide chlorhydrique ou d'acide acétique conduit à plus de sous-produits radioactifs que nous n'avons pas pu identifier. Enfin, il est à noter qu'en l'absence de purification intermédiaire de l'acide [^{18}F]fluorosulfonique **[^{18}F]84** par SPE, les rendements s'effondrent et restent entre 0 et 12%.

3.3. Bilan de la radiosynthèse totale de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine [^{18}F]79

En bilan, le schéma 74 et la figure 20 résument la radiosynthèse totale de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** avec les radiochromatogrammes HPLC analytique pour chaque étape du protocole.

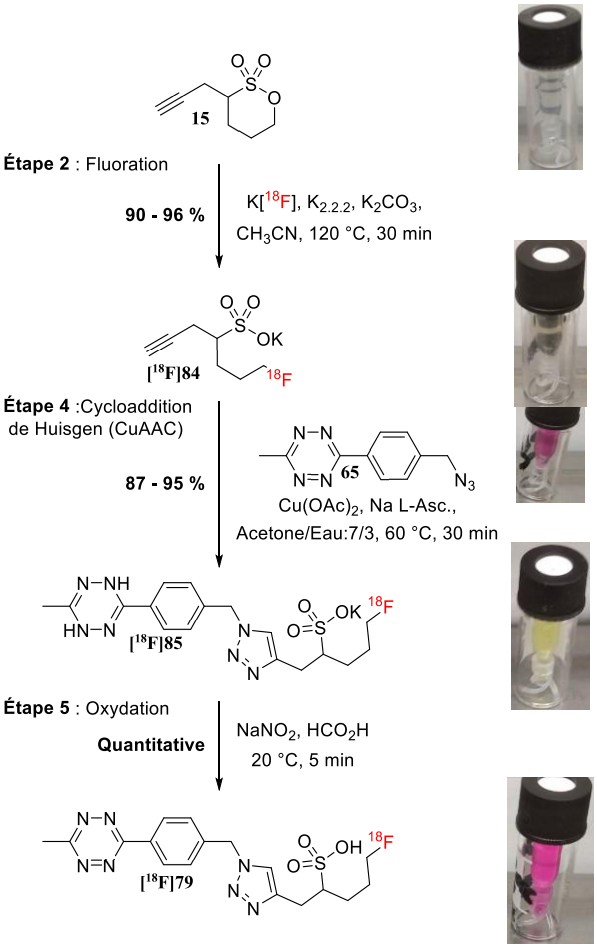


*Schéma 74 : Marquage en 3 étapes pour la synthèse de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79**.*

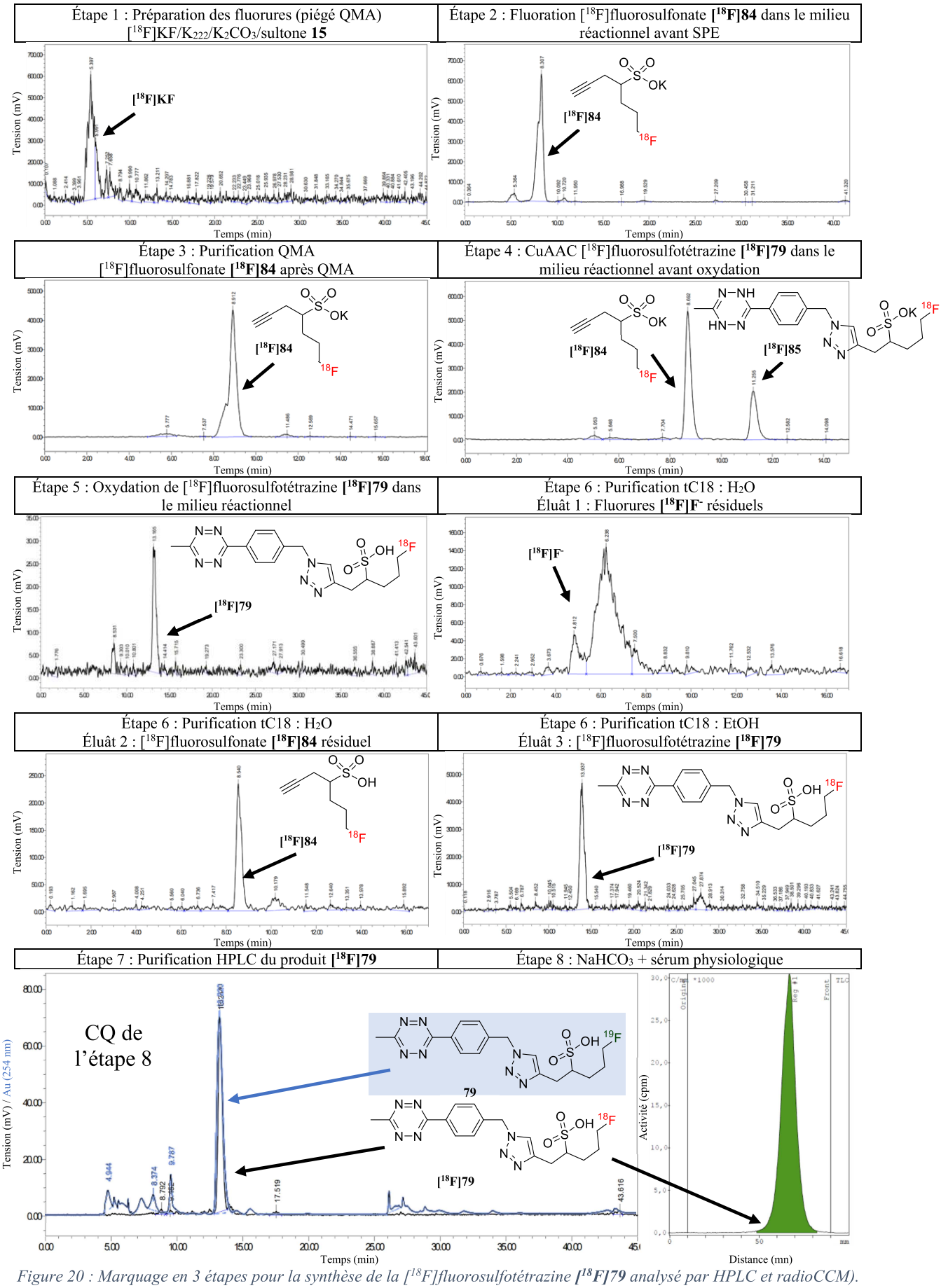


*Figure 20 : Marquage en 3 étapes pour la synthèse de la [18F]fluorosulfotétrazine **[18F]79** analysé par HPLC et radioCCM).*

3.4. Radiosynthèse totale automatisée de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine [^{18}F]79

La radiosynthèse de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** a été transposée sur l'automate de radiosynthèse TRACERlab FX N Pro pour produire les doses injectables et réaliser les études précliniques. Etant donné le nombre d'étapes de la radiosynthèse et de pré-purifications, plusieurs modifications et adaptations ont dû être effectuées. Le procédé général est décrit ci-dessous.

La solution aqueuse de fluorures [^{18}F]F$^-$ issue du cyclotron est déposée sur la cartouche Sep-Pak® Light QMA-CO_3. Les fluorures [^{18}F]F$^-$ sont élués avec une solution de K_2CO_3 (0,5 mg) et K_{222} (10,5 mg) dans un mélange eau (300 µL) /acétonitrile (450 µL) dans le 1er réacteur, et séchés azéotropiquement à 95 °C pendant 9 min sous pression réduite (0,04 kPa). La solution de sultone propargylique **15** (5 mg, sublimée) dans l'acétonitrile (1,6 mL) est ajoutée, et le mélange est chauffé à reflux pendant 15 min. Une fois refroidi, le mélange réactionnel est déposé sur le Sep-Pak® Light QMA. Après séchage, élution avec l'acétonitrile vers le réacteur 2, puis concentration sous vide, sont ajoutés successivement l'acétone, le mélange ascorbate de sodium (30,5 mg) et acétate de cuivre (8,4 mg) dans l'eau (300 µL) effectué pendant la concentration sous vide, et enfin l'azidotétrazine **65** (5,2 mg, sublimée) dans l'acétone (350 µL). Le réacteur 2 est chauffé à 60 °C sous pression d'hélium pendant 25 min. Après refroidissement à 20 °C, la solution de nitrite de sodium (30,5 mg) dans l'eau (300 µL), puis d'acide formique (100 µL) sont ajoutés et le mélange est laissé sous agitation à 20 °C pendant 5 min. Après addition d'eau (10 mL), le mélange est déposé sur la cartouche Sep-Pak® tC18 Plus Long Environnemental préconditionné avec l'éthanol puis l'eau. La cartouche est lavée avec l'eau (10 mL) puis séchée et enfin éluée avec l'éthanol (1,5 mL). La solution éthanolique est diluée dans une solution de tampon phosphate (3,5 mL, pH 2,1) puis envoyée dans la boucle d'injection HPLC semi-préparative (Phenomenex Gemini® C18 5 µm, éluant : tampon phosphate à pH 2,1 / EtOH : 72/28, 3,3 mL/min à λ = 254 nm) (Figure 21). La [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** est collectée en 1,4 min (V = 5,6 mL) à 28-29 min.

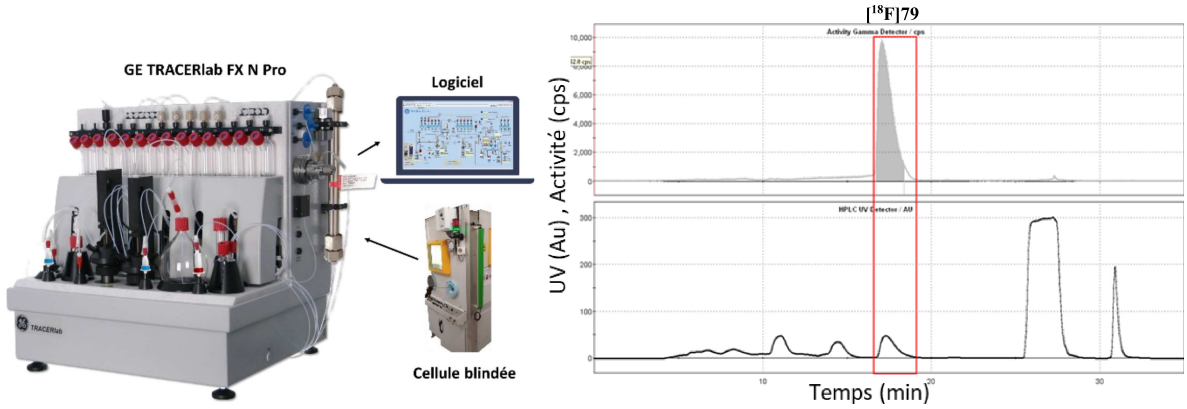


Figure 21 : Chromatogrammes HPLC semi-préparative en fin de radiosynthèse automatisée de la ***[18F]79****.*

La [18F]fluorosulfotétrazine **[18F]79** a été finalement formulée en diluant la collecte HPLC dans 9,2 mL de sérum physiologique (NaCl 0,9%) et 0,8 mL d'une solution de $NaHCO_3$ (1,4%) (soit un volume total de 15,6 mL). Ainsi, le pourcentage d'éthanol dans le milieu de formulation est 9,9%, et le pH est égal à 6,78, valeurs compatibles pour une injection *in vivo*. La [18F]fluorosulfotétrazine **[18F]79** formulée a été contrôlée par HPLC analytique et radioCCM (Figure 22).

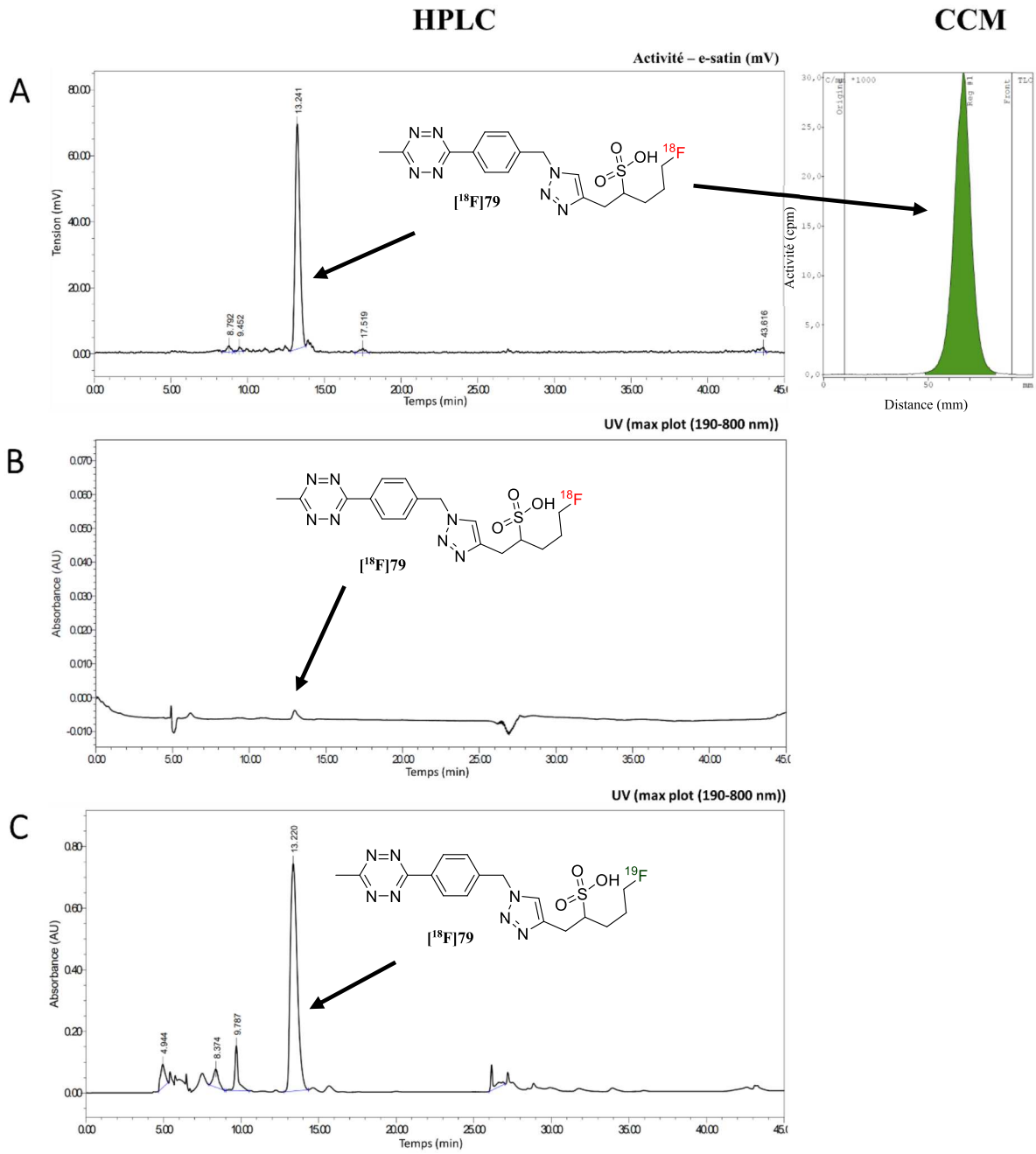


*Figure 22 : Analyse HPLC analytique de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** formulée avec l'activité détectée par e-SAT/IN en A), l'UV détectée par la barrette d'iode en B) et comparée à l'UV de la fluorosulfotétrazine **79** en C).*

Ce protocole sur automate a été répété entièrement 3 fois. Des lots de [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** (67 mCi ≈ 2,4 GBq) ont été finalement obtenus à partir de [^{18}F]F$^-$ (411 mCi ≈ 15,2 GBq) avec un rendement radiochimique non corrigé de l'ordre de 15 à 20% en 90-95 min (correspondant à un rendement radiochimique corrigé de la décroissance de 27-31%), une activité volumique de 8,9 mCi/mL ≈ 329,6 MBq/mL, une activité molaire de 4,4 mCi/µmol ≈ 163,9 MBq/µmol, une pureté radiochimique de 97% et une pureté chimique de 92%.

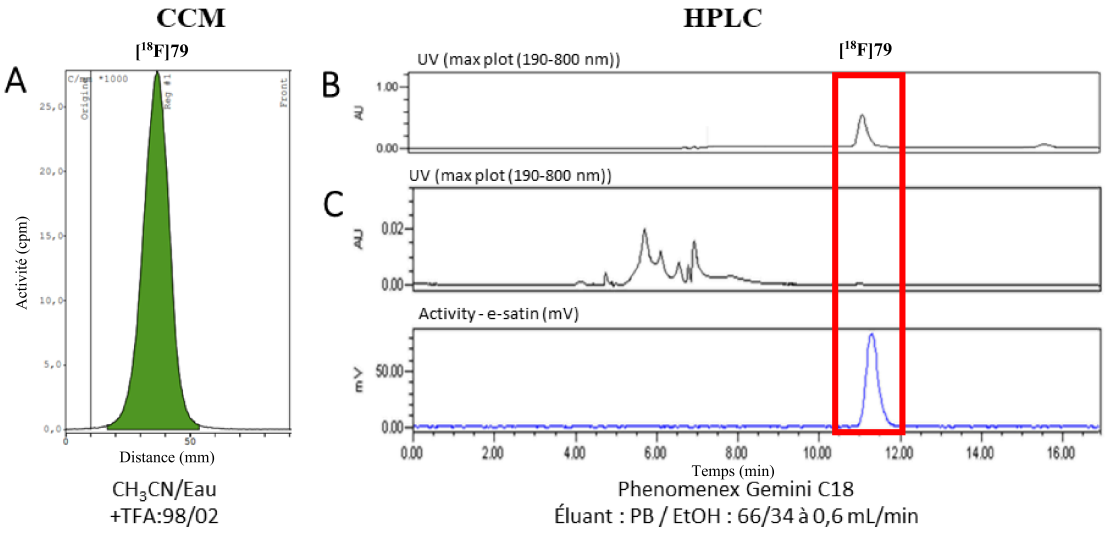


Figure 23 : Analyses de ***[18F]79*** *pour le contrôle qualité avec en la CCM en (A) et le chromatogramme HPLC en (B).*

Suivant les recommandations du guide « Good Manufacturing Practice (GMP) », publiées par la « Food and Drug Administration (FDA) » américaine, ainsi que la pharmacopée européenne pour le contrôle qualité avant l'injection *in vivo*, un ensemble de tests et de mesures physico-chimiques ont été réalisés sur deux lots différents (Tableau 21). Les résultats obtenus sont en accord avec les valeurs exigées par ces normes pour le contrôle qualité avant l'injection *in vivo*.

Contrôle	Méthode	Norme de conformité	Résultats
Apparence	Inspection visuelle	Limpide et incolore	
pH	Bandelette papier pH	4,5 < pH < 8,5	6,78
Radioactivité volumique	Mesure Capintec™	100 à 400 MBq/mL	158,73 MBq/mL
Concentration radioactive	Chambre d'ionisation	À définir	Pas fait
Identification radiochimique	HPLC analytique	Identique à la référence au fluor-19	Identique à la référence **79**
Pureté radiochimique	Radio-CCM HPLC analytique	Produit > 95% Fluorure < 5%	> 95%
Identification radio-nucléidique	Calcul de la période $P = \frac{\lvert \ln 2 \times (t_2 - t_1) \rvert}{\ln\left(\frac{A_2}{A_1}\right)}$	105 < T < 115 min	110 min
Pureté radio-nucléidique	Spectre γ	511 keV	511keV
Pureté chimique	HPLC UV	Produit > 95%	> 95%
Cryptand résiduel	Test colorimétrique de Mock (1997)	$[K_{222}]$ < 0,22 mg/mL	0,18 mg/mL
Traces de solvants	CPG	$[CH_3CN]$ < 0,41 mg/mL	Pas fait
Intégrité du filtre	Test du point de bulle[388]	> 3,45 bars	Pas fait
Stérilité	Mise en culture par thioglycolate, trypcase et Saboureau	Stérile	Pas fait
Endotoxines bactériennes	Test Lysate Amoebocyte Limulus (LAL)	< 17,5 UI / mL UI = unités infectieuses	Pas fait

Tableau 21 : Contrôle qualité réalisée sur le lot de la ***[^{18}F]79*** *issus de l'optimisation finale sur automate de synthèse.*

[388] Vallabhajosula S., *Springer: Dordrecht*, **2009**. ; Clanton, J.; Sandler, M. P. Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT. *J. Nucl. Med.* **2010**, *51* (4), 660–661.

C. Évaluation de la tétrazine radioactive dans son milieu de formulation

1. Hydrophilie

L'hydrophilie de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** a été évaluée par les mesures des LogP et $LogD_{7,4}$ réalisées selon la méthode « flask shake » à partir de deux lots de production différents. Les expérimentations ont été faites en triplicata. La [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** a été ajoutée à un mélange 1/1 d'eau ou de PBS (pH 7,4) et de *n*-octanol préparé 20 min avant et laissé sous agitation. Après agitation pendant 40 min, les phases ont été séparées par centrifugation et la radioactivité dans chacune des phases a été mesurée au compteur gamma. Les valeurs calculées des LogP et $LogD_{7,4}$ ont ensuite été moyennées.

La valeur moyenne de LogP (*n*-Octanol/H_2O) est de -1,27 ± 0,02 (n = 6), et celle de $LogD_{7,4}$ (*n*-octanol/PBS) est de -1,70 ± 0,02 (n = 6). Ces valeurs traduisent une hydrophilie très significative de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79**.

2. Stabilité

La stabilité de [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** dans son milieu de formulation (sérum physiologique) a été suivie par HPLC toutes les 2 h pendant 12 h jusqu'à la limite de quantification (signal/bruit = 10). Elle a également été suivie après dilution de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** dans un tampon phosphate (PBS) à pH 7,4 (Figure 24).

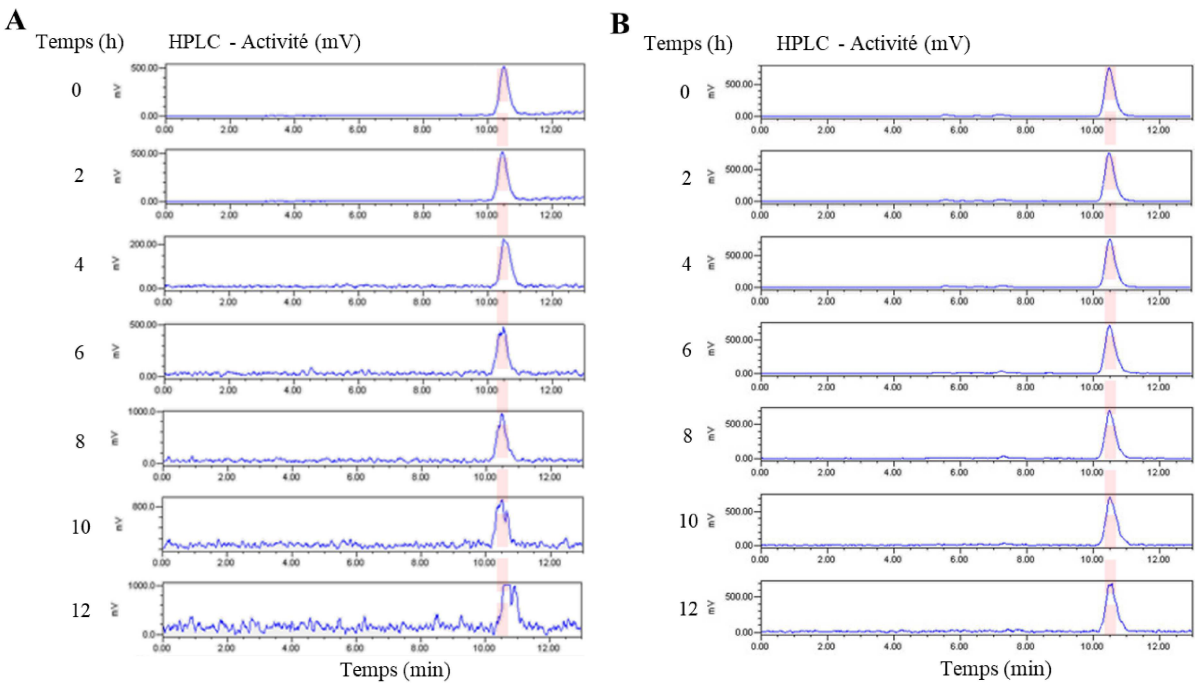


*Figure 24 : Étude de la stabilité de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** formulée (A) dans le sérum physiologique et (B) dans le PBS.*

Les chromatogrammes sont tous quasiment identiques et ne révèlent la présence que d'un seul pic radioactif correspondant à la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79**. La [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** est donc parfaitement stable dans les deux milieux de formulation et tampon PBS jusqu'à 12 h.

3. Biodistribution chez la souris saine par imagerie TEP

La biodistribution et les propriétés pharmacocinétiques de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** ont été étudiées par imagerie TEP chez la souris saine (mâle SWISS de 38 g) après injection de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** par intraveineuse (iv) dans la veine dorsale de la queue (Figure 25). Les acquisitions ont été réalisées pendant 60 min. Les courbes d'activité temporelle (TAC) ont été extraites des images TEP et normalisées en tant que valeur d'absorption standardisée (SUV). Les données ont été exprimées en pourcentage par rapport à la dose initiale injectée (%DI).

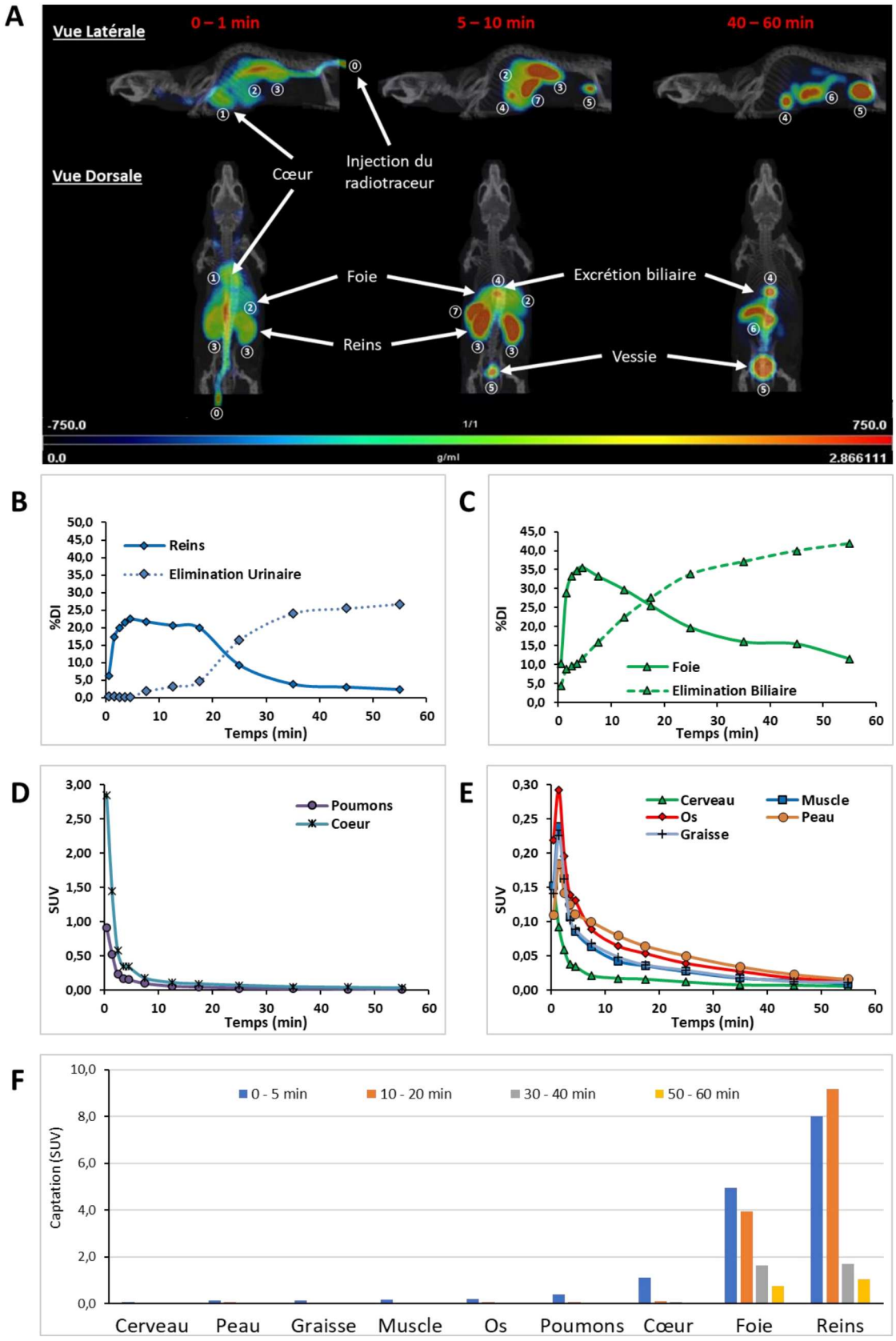


*Figure 25 : (A) Images TEP/CT de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** chez la souris SWISS mâle ; (B) TAC pour la voie urinaire ; (C) TAC pour la voie hépatobiliaire ; (D) TAC pour les poumons et le cœur ; (E) TAC pour le cerveau, les muscles et les os ; (F) Biodistribution dans les principaux organes.*

Les images TEP après une injection lente dans le sang par la veine dorsale de la queue ⓪, montrent que la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** perfuse rapidement dans le cœur et l'ensemble des tissus en moins d'une minute (Figure 7A). À 5 min, l'ensemble de la radioactivité est concentré dans les organes d'élimination foie ② et reins ③, puis à 40 min, dans les intestins ⑥ et la vessie ⑤.

L'élimination rapide de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** à la fois par voie urinaire (reins et vessie) et par voie hépatobiliaire (foie et intestins) est illustrée clairement dans les TAC et histogrammes (Figure 25, B, C et G). Après 1 h, la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** est éliminée à 68%, avec 27% par voie urinaire et 41% par voie hépatobiliaire (correspondant à un ratio urinaire/hépatobiliaire d'environ 2/3). L'élimination hépatobiliaire est majoritaire, ce qui pourra être désavantageuse pour de futures études *in vivo*, où une activité résiduelle parasite sera détectée dans l'abdomen durant l'imagerie.

La [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** est faiblement captée dans les tissus et les organes sains tels que le cœur (%DI < 0,13%), les poumons (%DI < 0,06%) et le muscle (%DI < 0,02%) dans les 5 premières min. Elle s'élimine ensuite progressivement de ces organes, et aucune rétention n'est observée au cours du temps.

Les demi-vies de distribution d'élimination sanguines ont été évaluées à 1 min et 42 min respectivement.

Dans le cerveau, le niveau de radioactivité reste quasiment nul (%DI < 0,01%) tout au long des 60 min d'acquisition. La [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique (BHE) plutôt lipophile. Ce résultat était prévisible voire attendu en raison de l'hydrophilie (LogP = -1,3 ; $LogD_{7,4}$ = -1,7) et de la présence du groupe sulfonate chargé de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79**.

De même pour les os, aucune fixation n'a été observée, les taux de radioactivité étant restés très faibles (%DI < 0,04% à 5 min puis < 0,01% à 60 min). Ce résultat révèle qu'aucune dé-radiofluoration n'a lieu *in vivo*. Les études de radiométabolisme ont été approfondies ensuite.

4. Radiométabolisme *in vivo*

Les études de radiométabolisme de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** ont été réalisées par analyse HPLC et radioCCM des échantillons sanguins prélevés 30 min après injection du radiotraceur **[^{18}F]79** chez les souris saines SWISS. Les prélèvements sanguins ont tout d'abord été traités par addition d'acétonitrile puis centrifugation. Les surnageants ont été récupérés puis filtrés avant d'être analysés. Il est à noter que plus de 95% de la radioactivité initiale a été récupérée dans les surnageants, et que la radioactivité contenue dans les culots était négligeable. Ce résultat indique que la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** ne se lie pas aux protéines plasmatiques. Les mêmes échantillons surnageants ont été également analysés 135 min après la première analyse. Les chromatogrammes HPLC et CCM obtenus sont identiques à ceux du

contrôle qualité (CQ) de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79**. Aucun autre pic radioactif n'a été révélé suggérant l'absence de métabolite. La [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** reste donc stable chez la souris saine après 30 min.

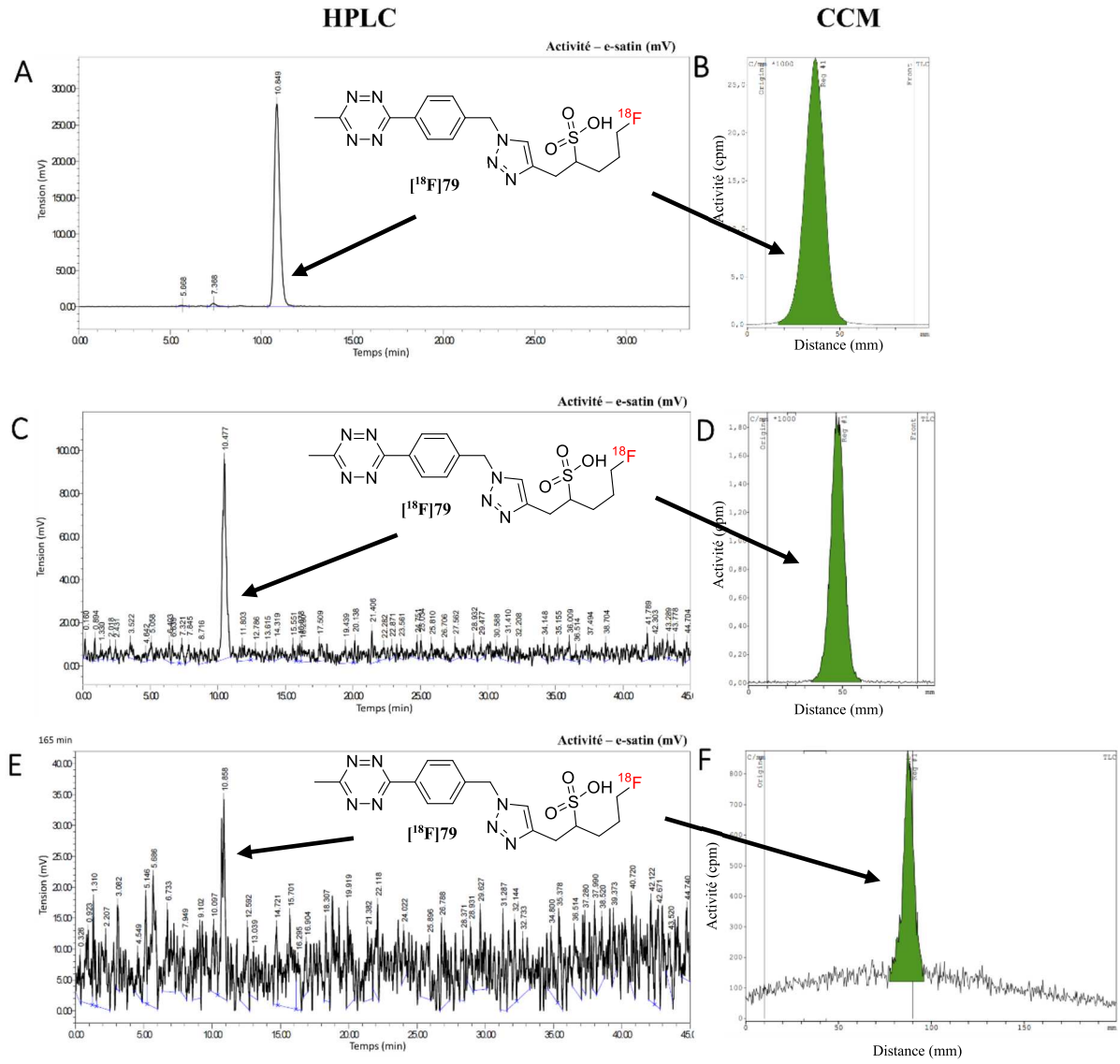


*Figure 26: Radiochromatogrammes HPLC et CCM A-B) du CQ de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** formulée après radiosynthèse, C-D) du plasma prélevé à 30 min après injection iv, E-F) du même échantillon de plasma que C-D) analysé 135 min plus tard (plaque CCM F) deux fois plus longue que B) et D)).*

5. Conclusion

Ces études préliminaires semblent montrer que la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** reste stable *in vivo* chez la souris pendant au moins 30 min, qu'elle ne se lie pas aux protéines plasmatiques, qu'elle s'élimine rapidement par voie hépatobiliaire (environ à 60%) et rénale (à environ 40%) et qu'elle ne s'accumule pas dans les organes sains. Ces caractéristiques et ces propriétés pharmacocinétiques semblent appropriées pour des applications en imagerie, en particulier pour des exploitations dans des stratégies de pré-ciblage mettant en jeu la réaction IEDDA *in vivo*, et laissent présager qu'il n'y aura pas de marquage non spécifique. Un premier test de couplage IEDDA entre la fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** et le TCO-NH_2 non conjugué a été réalisé avec succès en tube. Ce test a permis de mettre en évidence que le couplage est immédiat et spontané, dès la mise en commun des deux réactifs. Les développements de préciblage sont poursuivis au laboratoire.

D. Valorisation des tétrazines sultones pour les autres modalités d'imagerie

Dans l'optique de valoriser les sulfotétrazines et leurs précurseurs sultones, nous avons envisagé d'étendre la chimie développée pour la fluorosulfotétrazine **79** à la synthèse des deux sulfotétrazines **80** et **82** possédant les entités fluorescéine et DOTA respectivement (Schéma 75). Ces composés pourraient en effet conduire à des applications en théranostique après radiomarquage avec des radiométaux appropriés, et en imagerie optique par fluorescence pour des investigations au niveau cellulaire complémentaires des études *in vivo*. La réaction clé dans cette stratégie reste l'ouverture du cycle sultone, avec cette fois non pas un fluorure comme nucléophile mais une amine primaire. Nous avons choisi les réactifs DOTA-NH_2 **81** et fluoresceine-NH_2 **83** disponibles commercialement, et envisagé leur réaction avec la tétrazine sultone **78**. Les amines primaires étant moins « basiques » que le fluorure, on pouvait s'attendre à ce que les conditions de réaction soient plus douces, que le cycle tétrazine reste stable dans le milieu réactionnel, que la réaction d'ouverture engendre moins de dégradation et, de surcroit, soit plus efficace.

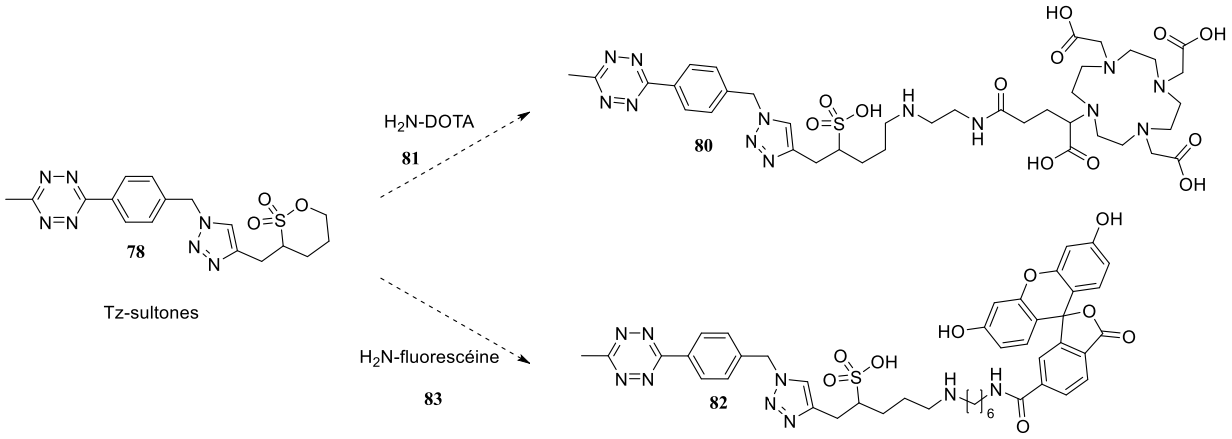


Schéma 75 : Valorisation des Tz-sultones pour la radiochimie des radiométaux, et pour l'imagerie optique par fluorescence.

Au préalable, nous avons étudié la réaction d'ouverture de sultones par des amines avec des composés modèles.

1. Ouverture de la benzylsultone 5 modèle par des amines

Nous avons choisi la benzylsultone **5** (précédemment obtenue efficacement et facilement par benzylation de la butanesultone commerciale **3**, (cf. chapitre 2 : A.2.2) comme sultone modèle pour étudier la réaction d'ouverture avec des amines. Nous avons utilisé des amines commerciales : la benzylamine, l'acide γ-aminobutyrique, les 3 dérivés de DOTA **81**, **86** et **87** et de fluorescéine (notée aussi 6-FAM-NH_2) **83** (Schéma 76). Ces amines ont permis d'obtenir respectivement les tétrazines **88** à **93**.

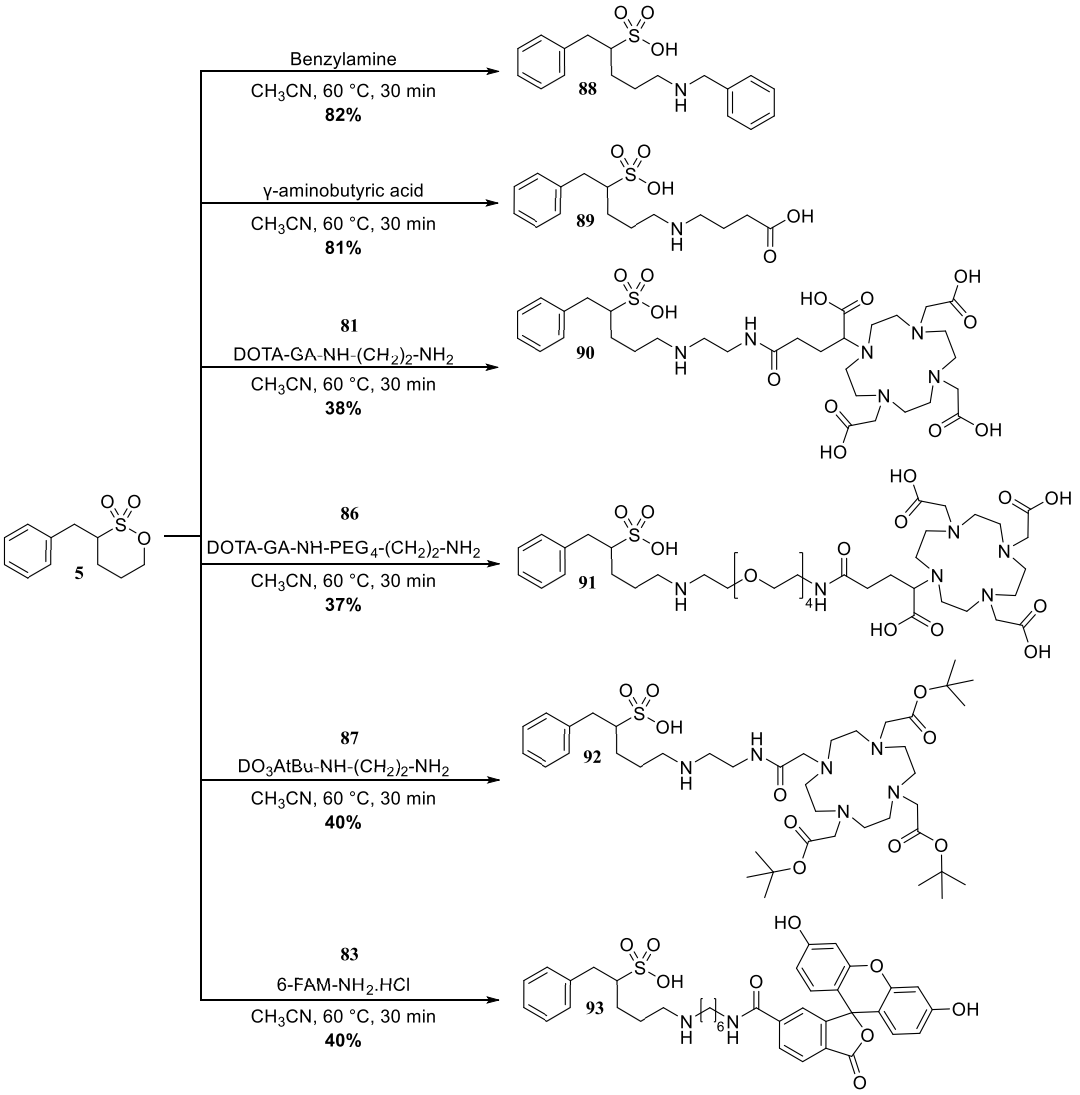


*Schéma 76 : Synthèse modèle entre la sultone benzylique **5**, et des dérivés DOTA et 6-FAM.*

Les réactions ont été réalisées par simple chauffage de la benzylsultone **5** et de l'amine dans l'acétonitrile anhydre à 60 °C pendant 30 min. Des rendements très bons (82 et 81%) ont été obtenus avec la benzylamine et l'acide γ-aminobutyrique. Les rendements ont été moyens avec le DOTA-GA-NH-$(CH_2)_2$-NH_2 **81** (38%), le DOTA-GA-NH-PEG_4-$(CH_2)_2$-NH_2 **86** (37%), le DO3AtBu-NH-$(CH_2)_2$-NH_2 **87** (40%) et l'aminohexylaminocarbonylfluorescéine **83** (40%). Un seul essai a été réalisé pour chacune de ces réactions. La benzylsultone **5** de départ qui n'a pas réagi est récupérée à la fin de chacune de ces réactions. Ces essais seraient à refaire sur une période plus longue (de 4 à 12 h) pour améliorer les rendements. Faute de temps, ces essais n'ont pas été menés. Cependant, ces résultats montrent la faisabilité de la réaction d'ouverture du cycle sultone par des amines dans des conditions relativement douces.

2. Ouverture de la tétrazine sultone 78 par des amines

Nous avons étendu le protocole précédent (chauffage dans l'acétonitrile à 60 °C pendant 30 min) à l'ouverture de la tétrazine sultone **78** avec la benzylamine, la *N*-butylamine, le DOTA-GA-NH-$(CH_2)_2$-NH_2 **81** et l'aminohexylaminocarbonylfluorescéine **83** (Schéma 77). Les rendements obtenus ont été beaucoup plus faibles qu'avec la benzylsultone **5**, compris entre 4 et 12%. Cependant, les sulfonates finaux **80**, **82**, **94** et **95** ont bien été caractérisés. Comme avec la benzylsultone **5**, la tétrazine sultone **78** de départ est majoritairement récupérée en fin de réaction. Bien que faibles, ces résultats restent encourageants pour obtenir facilement les nouvelles tétrazines fonctionnalisées **80** et **82**, et des essais d'optimisation seront poursuivis.

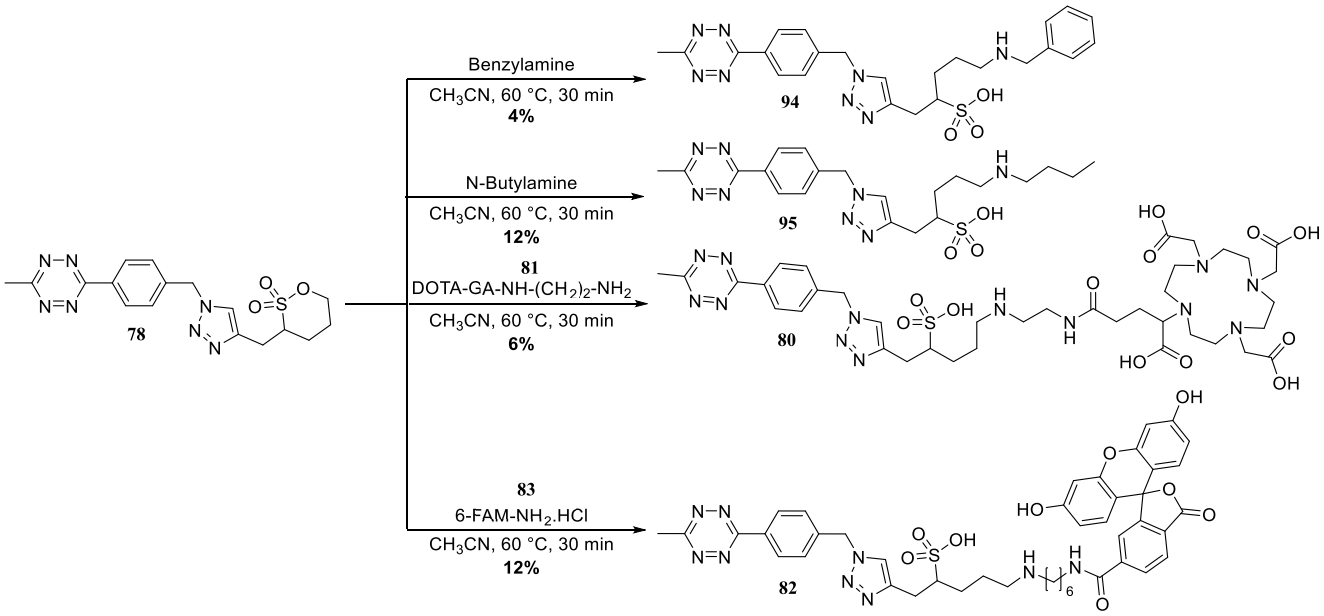


*Schéma 77: Synthèse de tétrazine sufonate model **94** et **95**, et application à la DOTA-sulfotétrazines **80** et au 6-FAM-sulfotétrazine **82**.*

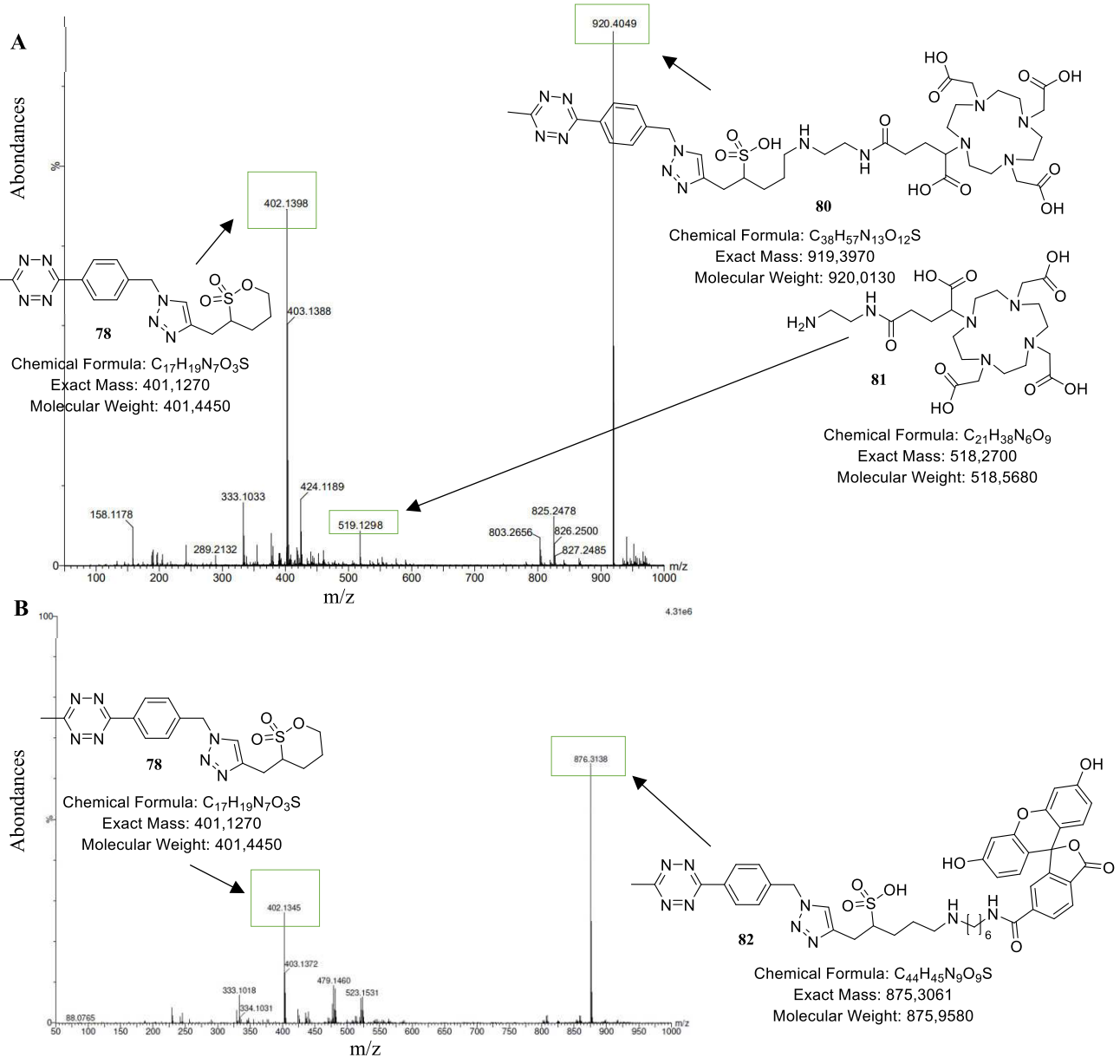


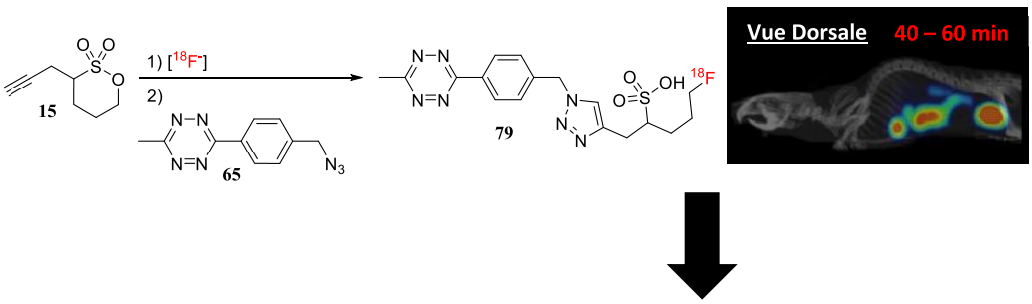
*Figure 27 : Analyse HRMS du brut de la synthèse de la DOTA-sulfotétrazines **80** (A), et de la 6-FAM-sulfotétrazine **82** (B).*

3. Conclusion

Nous avons constaté la faisabilité de la réaction d'ouverture de la tétrazine sultone **78** par des amines simples et fonctionnalisées. Ainsi, la tétrazine sultone **78** peut être considérée comme une plate-forme permettant d'introduire facilement divers contrastophores portant une fonction amine primaire, tels que des chélates (DOTA) ou des dérivés de fluorescéines (6-FAM).

E. Conclusion générale et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons développé la synthèse et le marquage au fluor-18 de la fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** (Schéma 78). La radiosynthèse a été réalisé en 3 étapes - radiofluoration de la butanesultone propargylique **15**, puis CuAAC avec l'azidotétrazine **65** et enfin oxydation - en 90-95 min avec un RDC de 27-31%, une pureté radiochimique de 97% et une pureté chimique de 92%. Les valeurs de LogP = -1,3 et $LogD_{7,4}$ = -1,7 mesurées pour la fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79** mettent en évidence son caractère hydrophile. Les courbes et les voies d'élimination révélées par imagerie TEP sont en accord avec les propriétés d'hydrophilie. Les études *in vivo* ont également mis en évidence une stabilité totale de la fluorosulfotétrazine **[^{18}F]79**. Ces résultats sont prometteurs pour son utilisation dans la réaction IEDDA, qu'elle soit *in vivo* (stratégie de pré-ciblage) on non. Ce travail est en cours actuellement au laboratoire (Schéma 78).



Perspectives : Évaluation *in vivo* en pré-ciblage

*Schéma 78. Synthèse de la fluorosulfotétrazine **79** et évaluation in vivo.*

Par ailleurs, nous avons constaté que le groupe sultone représentait une plate-forme potentielle pour introduire d'autres contrastophores que le fluor-18, comme un fluorophore ou une entité chélatante (Schéma 79). Le cycle butanesultone a été en effet ouvert par les réactifs nucléophiles 6-FAM-NH_2 et DOTA-GA-NH_2 ouvrant la voie à la conception d'agents d'intérêts pour l'imagerie et le théranostique. Les rendements d'ouverture restent modestes dans le cas des tétrazinesultones mais sont très satisfaisants dans le cas de la benzylsultone prise comme modèle. Nous envisageons alors de généraliser cette réaction à d'autres structures sultones pour la conception d'agents pertinents macromoléculaires.

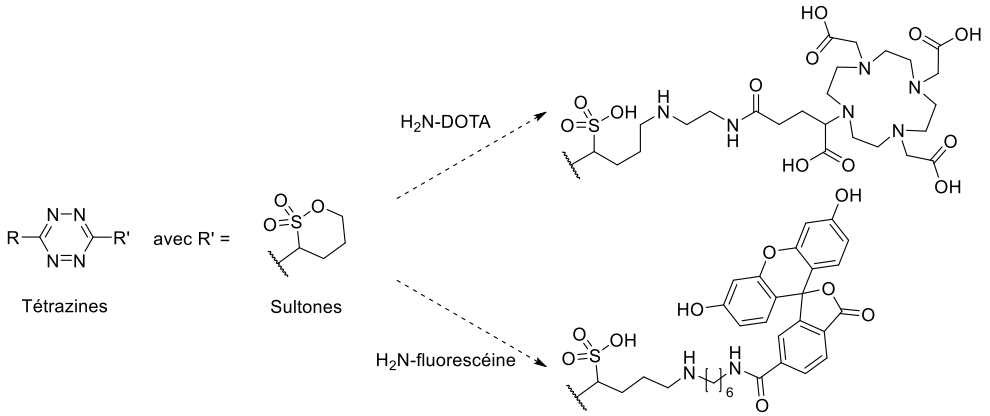


Schéma 79 : Valorisation des tétrazinesultones pour la radiochimie des radiométaux et pour l'imagerie optique par fluorescence.

Chapitre

IV

Développement et radiomarquage à l'indium-111 et au lutétium-177 d'analogues du NeoBOMB1

4 Développement et radiomarquage à l'indium-111 et au lutétium-177 d'analogues du NeoBOMB1

A. NeoBOMB1 et son récepteur GRPR

1. Diversité des types de cancers

Selon l'organisation mondiale de la santé, l'une des principales causes de mortalité dans le monde est le cancer, juste après les maladies cardiaques et les accidents vasculaires cérébraux (AVC).[389] Le cancer peut toucher n'importe lequel de nos organes ou tissus cellulaires.[390] Chaque année, la société américaine de lutte contre le cancer publie l'évolution des nouveaux cas de cancers déclarés ainsi que les décès associés.[390] Le rapport de 2022 sur l'année 2021 montre que les quatre premiers type de cancers observés chez cette population sont le cancer de la prostate, du sein, du côlon et du rectum (Tableau 22).[390]

N°	US 2021	Homme				Femme			
	Organes	Nouveaux cas estimés		Morts estimés		Nouveaux cas estimés		Morts estimés	
1	Prostate	248530	26%	34130	11%	-	-	-	-
2	Sein	-	-	-	-	281550	30%	43600	15%
3	Poumon	119100	12%	69410	22%	116060	13%	62470	22%
4	Côlon et rectum	79520	8%	28520	9%	69980	8%	24460	8%
5	Vessie urinaire	64280	7%	12260	4%	19450	2%	4940	2%
6	Corps utérin	-	-	-	-	66570	7%	12940	4%
7	Lymphome	45630	5%	12170	4%	35930	4%	8550	3%
8	Leucémie	35530	4%	13900	4%	25560	3%	9760	3%
9	Pancréas	31950	3%	25270	8%	28480	3%	22950	8%
-	Totaux	970250	100%	319420	100%	927910	100%	289150	100%

Tableau 22 : Dix principaux types de cancer pour l'estimation des nouveaux cas de cancer et des décès par sexe, États-Unis, 2021.

Le type de cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez l'homme est le cancer de la prostate (PC), et celui du sein (BC) chez la femme aux États-Unis. Ce sont aussi la deuxième cause de décès respectivement chez l'homme et chez la femme.[390] Lorsqu'il est diagnostiqué tôt, le taux de survie de ces cancers est bien meilleur, et peu avoisiner les 100%. Il existe une

[389] *Cancer*. https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer (consulté le 2022-03-01).
[390] Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Fuchs, H. E.; Jemal, A. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71* (1), 7–33.

grande variation dans le diagnostic et les résultats des traitements chez les patients en raison de la grande hétérogénéité de ces tumeurs malignes appartenant à différentes catégories histologiques (tels que les luminales A et B, les facteurs de croissance et les triples négatifs).[391] Ces sous-types sont importants pour le traitement et le pronostic de la maladie.

2. Récepteur du peptide libérant de la gastrine (GRPR)

2.1. Intérêt

Au cours des dernières décennies, plusieurs auteurs ont montré que le récepteur du peptide libérant de la gastrine (GRPR) était exprimé dans différents cancers.[392,393,394] Il est défini comme un récepteur couplé aux protéines G. En 2007, Cornelio *et al* publie une revue présentant le pourcentage de surexpression du GRPR dans 14 types de cancers différents (Tableau 23).[392]

Cancer	% de surexpression de GRPR	Cancer	% de surexpression de GRPR	Cancer	% de surexpression de GRPR
Pancréas	17	Ovaire	77	Prostate	100
Poumon	33	Œsophage	83	Gastrinome	100
Utérus	38	Carcinoïde gastro-intestinal	85	Côlon	100
Estomac	50	Neuroblastome	100	Rein	100
Sein	72	Tête et Cou	100		

Tableau 23 : Expression de GRPR maximal dans les tumeurs humaines d'après Cornelio et al.[392]

D'après le tableau 23, les GRPR sont surexprimés dans la plupart des principaux types de cancers humains. Dans la littérature, le GRPR est déjà utilisé dans des applications en phase clinique pour les cancers du sein (Phase I),[395] de la prostate (Phase I),[396,397] du poumon à petites cellules (Phase II), [396,398,399,400] du colon et du rectum (Phase I),[401] dont des essais sur les tumeurs solides (Phase I).[399,402] D'autres essais ont montré que le GRPR pouvait aussi être ciblé dans le

[391] Perou, C. M.; Sørlie, T.; Eisen, M. B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S. S.; Rees, C. A.; Pollack, J. R.; Ross, D. T.; Johnsen, H.; Akslen, L. A.; Fluge, Ø.; Pergamenschikov, A.; Williams, C.; Zhu, S. X.; Lønning, P. E.; Børresen-Dale, A.-L.; Brown, P. O.; Botstein, D. *Nature* **2000**, *406* (6797), 747–752.
[392] Cornelio, D. B.; Roesler, R.; Schwartsmann, G. *Ann. Oncol.* **2007**, *18* (9), 1457–1466.
[393] Moody, T. *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* **2014**, *18* (10), 711–714.
[394] Dalm, S. U.; Verzijlbergen, J. F.; De Jong, M. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (2), 260–278.
[395] Santos-Cuevas, C. L.; Ferro-Flores, G.; Arteaga de Murphy, C.; Pichardo-Romero, P. A. *Nucl. Med. Commun.* **2008**, *29* (8), 741–747.
[396] De Vincentis, G.; Scopinaro, F.; Varvarigou, A.; Ussof, W.; Schillaci, O.; Archimandritis, S.; Corleto, V.; Longo, F.; Fave, G. D. *Tumori J.* **2002**, *88* (3), S28–S30.
[397] Kramer, G.; Steiner, G. E.; Gröbl, M.; Hrachowitz, K.; Reithmayr, F.; Paucz, L.; Newman, M.; Madersbacher, S.; Gruber, D.; Susani, M.; Marberger, M. *The Prostate* **2004**, *58* (2), 109–120.
[398] Kelley, M. J.; Linnoila, R. I.; Avis, I. L.; Georgiadis, M. S.; Cuttitta, F.; Mulshine, J. L.; Johnson, B. E. *Chest* **1997**, *112* (1), 256–261.
[399] Gandhi, L.; Camidge, D. R.; Ribeiro de Oliveira, M.; Bonomi, P.; Gandara, D.; Khaira, D.; Hann, C. L.; McKeegan, E. M.; Litvinovich, E.; Hemken, P. M.; Dive, C.; Enschede, S. H.; Nolan, C.; Chiu, Y.-L.; Busman, T.; Xiong, H.; Krivoshik, A. P.; Humerickhouse, R.; Shapiro, G. I.; Rudin, C. M. *JCO* **2011**, *29* (7), 909–916.
[400] Rudin, C. M.; Hann, C. L.; Garon, E. B.; Ribeiro de Oliveira, M.; Bonomi, P. D.; Camidge, D. R.; Chu, Q.; Giaccone, G.; Khaira, D.; Ramalingam, S. S.; Ranson, M. R.; Dive, C.; McKeegan, E. M.; Chyla, B. J.; Dowell, B. L.; Chakravartty, A.; Nolan, C. E.; Rudersdorf, N.; Busman, T. A.; Mabry, M. H.; Krivoshik, A. P.; Humerickhouse, R. A.; Shapiro, G. I.; Gandhi, L. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18* (11), 3163–3169.
[401] Sjölund, K.; Fasth, S.; Ekman, R.; Hultén, L.; Jiborn, H.; Nordgren, S.; Sundler, F. *Neurogastroenterol. Motil.* **1997**, *9* (3), 143–150.
[402] Schwartsmann, G.; DiLeone, L. P.; Horowitz, M.; Schunemann, D.; Cancella, A.; Pereira, A. S.; Richter, M.; Souza, F.; da Rocha, A. B.; Souza, F. H.; Pohlmann, P.; De Nucci, G. *Invest. New Drugs* **2006**, *24* (5), 403–412.

cas des cancers de la vessie,[403] des ovaires[404] et de l'utérus.[405] Cette surexpression de GRPR dans différents types de cancers à la fois primaire et métastatique en fait un récepteur de choix pour le ciblage moléculaire avec des peptides.

Par exemple, Reubi *et al* ont montré par des études d'autoradiographie que 65% des tumeurs mammaires analysées exprimaient le GRPR.[406] De plus, les métastases ganglionnaires précoces expriment également le GRPR. Des résultats similaires ont été obtenus par Gugger *et al*[407] et Dalm *et al*.[408] Ces auteurs ont montré que le GRPR est surexprimé même dans différents sous-groupes, notamment, pour les cas positifs aux récepteurs d'œstrogène avec une surexpression du gène 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2).[408,409]

Pour toutes ces raisons, le besoin en médecine nucléaire de cibler le GRPR à la fois pour le diagnostic et le traitement des cancers est en nette augmentation ces dernières décennies.

2.2. Limites

Parmi ces cancers, le GRPR n'est pas toujours le récepteur le plus populaire. Par exemple, dans le cas du cancer de la prostate, « l'antigène membranaire spécifique de la prostate » (PSMA) est plus utilisé que le GRPR. Le PSMA n'est pas présent que dans la prostate mais aussi dans les glioblastomes, par exemple.[410,411] En effet, tous les cancers de la prostate n'expriment pas le GRPR de la même manière. Visser *et al* ont constaté de faibles niveaux d'expression de GRPR dans les cancers de la prostate peu différenciées.[412] Cela implique que d'autres cibles peuvent être plus pertinentes dans ce cas. Dans la littérature, ils existent une multitude de revue listant des cibles et des molécules radiomarquées utilisés en préclinique et en clinique. Tous peuvent être potentiellement des concurrents pour le GRPR. Parmi eux, les récepteurs les plus populaires actuellement à l'étude sont: les récepteurs hormonaux (HER2), le récepteur de la somatostatine (SSTR), le récepteur du folate (FR), le récepteur de chimiokine C-X-C de type 4 (CXCR4), le récepteur du neuropeptide Y1 (NPY1R) et le récepteur 1 du polypeptide intestinal vasoactif (VIP-R1).[394,413] En 2017, Bednarova *et al* compare dans une revue différents radiotraceurs (^{18}F-FDG, ^{18}F-NaF, ^{18}F-FDHT, ^{18}F-acétate, ^{18}F-choline, ^{18}F-FACBC, ^{68}Ga-PSMA, ^{64}Cu/^{68}Ga/^{18}F-JMV594) dans le cas du cancer de la prostate.[414] Ces auteurs concluent qu'il est très difficile de comparer différents radiotraceurs entre eux. En effet, les populations de patients, les conditions opératoires et la variabilité des scanners limitent les

[403] Markwalder, R.; Reubi, J. C. *Cancer Res.* **1999**, *59* (5), 1152–1159.
[404] Sun, B.; Schally, A. V.; Halmos, G. *Regul. Pept.* **2000**, *90* (1), 77–84.
[405] Fleischmann, A.; Waser, B.; Gebbers, J.-O.; Reubi, J. C. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90* (8), 4722–4729.
[406] Reubi, C.; Gugger, M.; Waser, B. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2002**, *29* (7), 855–862.
[407] Gugger, M.; Reubi, J. C. *Am. J. Pathol.* **1999**, *155* (6), 2067–2076.
[408] Dalm, S. U.; Martens, J. W. M.; Sieuwerts, A. M.; Deurzen, C. H. M. van; Koelewijn, S. J.; Blois, E. de; Maina, T.; Nock, B. A.; Brunel, L.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Jong, M. de; Melis, M. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56* (5), 752–757.
[409] Dalm, S. U.; Sieuwerts, A. M.; Look, M. P.; Melis, M.; Deurzen, C. H. M. van; Foekens, J. A.; Jong, M. de; Martens, J. W. M. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56* (10), 1487–1493.
[410] Nomura, N.; Pastorino, S.; Jiang, P.; Lambert, G.; Crawford, J. R.; Gymnopoulos, M.; Piccioni, D.; Juarez, T.; Pingle, S. C.; Makale, M.; Kesari, S. *Cancer Cell Int.* **2014**, *14* (1), 26–34.
[411] Evans, J. C.; Malhotra, M.; Cryan, J. F.; O'Driscoll, C. M. *Br. J. Pharmacol.* **2016**, *173* (21), 3041–3079.
[412] Visser, M. de; Weerden, W. M. van; Ridder, C. M. A. de; Reneman, S.; Melis, M.; Krenning, E. P.; Jong, M. de. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48* (1), 88–93.
[413] Lappano, R.; Jacquot, Y.; Maggiolini, M. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (12), 3840–3876.
[414] Bednarova, S.; Lindenberg, M. L.; Vinsensia, M.; Zuiani, C.; Choyke, P. L.; Turkbey, B. *Transl. Androl. Urol.* **2017**, *6* (3), 41323–41423.

comparaisons. L'utilisation de deux ou plusieurs radiotraceurs dans la même étude est souvent difficile en raison des dépenses et des expositions aux radiations. De plus, la plupart des molécules radiomarquées en sont encore au stade précoce de l'évaluation clinique et il est donc difficile de dire quel agent est le plus utile pour l'imagerie de la maladie et la stratification des risques. Ces auteurs ont toutefois repéré des tendances. Notamment, le [^{18}F]FDG, le radiotraceur le plus utilisé en imagerie médicale, est peu performant pour les diagnostics des cancers précoces du sein et de la prostate, mais peut indiquer l'agressivité de la maladie.

Ces dernières années, différentes publications ont tenté de comparer les ligands radiomarqués du récepteur PSMA et ceux du GRPR.[415,416,417,418,419,420,421] Les auteurs arrivent aux mêmes conclusions. Chaque radiotraceur a son propre intérêt et peut être plus recommandé dans certains cas plutôt que d'autres. Sans réelle réponse, certains auteurs choisissent de faire des molécules à double cibles, par exemple PSMA et GRPR.[422] D'autres auteurs ciblent les types de cancer plus particuliers où les molécules concurrentes sont dans des stades cliniques moins avancés. Notre laboratoire a choisi de cibler le GRPR dans le cas du cancer du sein ou du cancer précoce de la prostate.

2.3. Structure

Au cours des dernières années, plusieurs molécules ciblant le récepteur du peptide libérant de la gastrine (GRPR) ont été décrits. Bien que la majorité d'entre elles aient été étudiées dans le cancer de la prostate, ces études ont élargi nos connaissances sur les propriétés et la structure de ce récepteur. Les lignées cellulaires cancéreuses ont révélé des quantités similaires d'ARN$_m$ pour le GRPR ainsi que pour son peptide associé le GRP. Le séquençage de l'ARN$_m$ a permis au groupe de Carroll *et al*, et Benya *et al* de le caractériser (Figure 28).

[415] Liolios, C.; Sachpekidis, C.; Schäfer, M.; Kopka, K. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **2019**, *62* (8), 510–522.
[416] Schollhammer, R.; De Clermont Gallerande, H.; Yacoub, M.; Quintyn Ranty, M.-L.; Barthe, N.; Vimont, D.; Hindié, E.; Fernandez, P.; Morgat, C. *EJNMMI Res.* **2019**, *9* (1), 52–59.
[417] Hoberück, S.; Michler, E.; Wunderlich, G.; Löck, S.; Hölscher, T.; Froehner, M.; Braune, A.; Ivan, P.; Seppelt, D.; Zöphel, K.; Kotzerke, J. *Nuklearmedizin* **2019**, *58* (5), 352–362.
[418] Cultrara, C. N.; Shah, S.; Antuono, G.; Heller, C. J.; Ramos, J. A.; Samuni, U.; Zilberberg, J.; Sabatino, D. *Mol. Ther. Nucleic. Acids* **2019**, *18*, 863–870.
[419] Yordanova, A.; Linden, P.; Hauser, S.; Feldmann, G.; Brossart, P.; Fimmers, R.; Essler, M.; Holdenrieder, S.; Ahmadzadehfar, H. *The Prostate* **2020**, *80* (1), 17–27.
[420] Liolios, C.; Koutsikou, T. S.; Salvanou, E.-A.; Kapiris, F.; Machairas, E.; Stampolaki, M.; Kolocouris, A.; Efthimiadou, E. K.; Bouziotis, P. *Int. J. Pharm.* **2022**, *624*, 122008–122022.
[421] Giovacchini, G.; Giovannini, E.; Riondato, M.; Ciarmiello, A. *Curr. Radiopharm.* **2017**, *10* (1), 6–15.
[422] Bandari, R. P.; Jiang, Z.; Reynolds, T. S.; Bernskoetter, N. E.; Szczodroski, A. F.; Bassuner, K. J.; Kirkpatrick, D. L.; Rold, T. L.; Sieckman, G. L.; Hoffman, T. J.; Connors, J. P.; Smith, C. J. *Nucl. Med. Biol.* **2014**, *41* (4), 355–363.

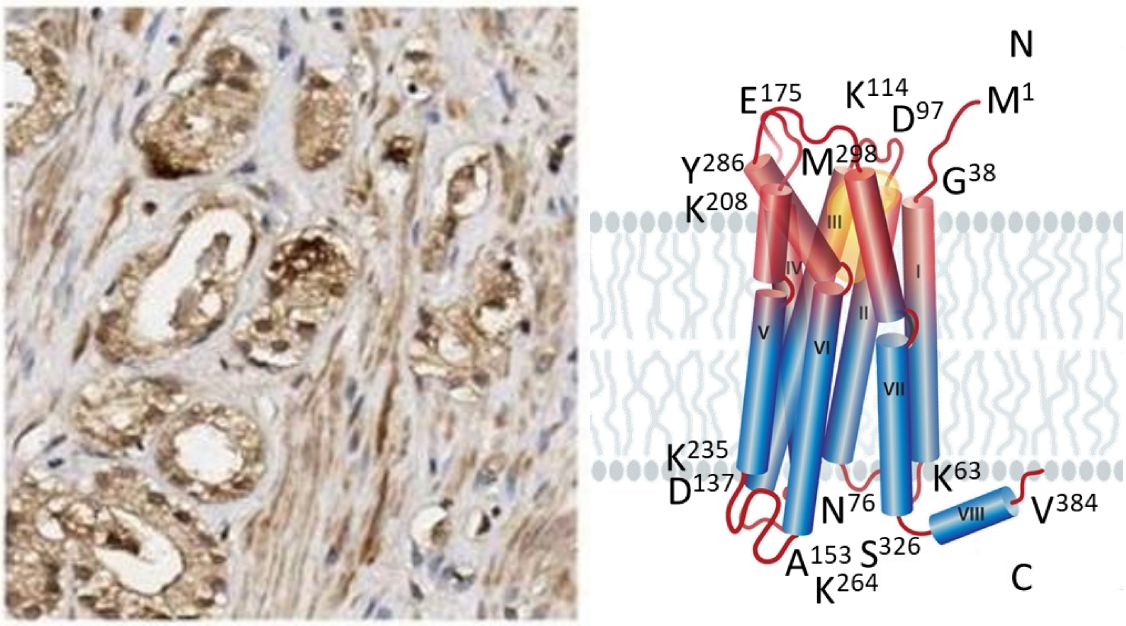


Figure 28: Cellule du cancer de la prostate (à gauche) et structure du récepteur GRPR à droite.

Le GRPR est un récepteur heptahélicoïdal composé d'une chaîne polypeptidique simple mais de longueur variable (Figure 28). Ce peptide traverse la bicouche lipidique sept fois, formant sept domaines transmembranaires (I-VII) et un domaine intracytoplasmique (VIII). Chacun de ces sept domaines hydrophobes (I à VII) possède une structure en hélice α et est relié au domaine transmembranaire par une boucle extra ou intra cellulaire. Les hélices α sont étroitement accolées et définissent une fente centrale diédrique étroite et profonde. Quant au domaine intracytoplasmique (VIII), il se situe en position C-terminal après le septième domaine transmembranaire (VII). Cette partie (VIII) contient plusieurs sites de phosphorylation impliqués dans les phénomènes d'internalisation du récepteur.

Le GRPR est couplé aux protéines G humaine. Sa caractérisation a permis de le classer dans le groupe β selon la classification GRAFs appartient à la famille « Rhodopsin-like » de la superfamille des récepteurs couplés aux Protéines G (RCPG). Les protéine G sont une famille de protéines qui permettent le transfert d'informations à l'intérieur de la cellule. Elles participent ainsi à un mécanisme appelé transduction du signal. Ce groupe β n'accepte que les peptides. Dans le cas de GRPR, ce sont les GRP et leurs analogues de la bombésine. Ces GRP sont des neuropeptides qui implique un signal nerveux régulant les processus physiologiques et comportementaux.[423,424] Le GRP est aussi appelé prepro-GRP, neuromédine C ou dérivé de bombésine. Il est l'équivalent mammifère de la bombésine tétradécapeptidique des amphibiens.[425]

[423] Lebacq-Verheyden, A.-M.; Bertness, V.; Kirsch, I.; Hollis, G. F.; McBride, O. W.; Battey, J. *Somat. Cell. Mol. Genet.* **1987**, *13* (1), 81–86.
[424] Justice, M. J.; Gilbert, B. J.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Buchberg, A. M.; Ceci, J. D.; Matsuda, Y.; Chapman, V. M.; Patriotis, C.; Makris, A.; Tsichlis, P. N.; Jenkins, N. A.; Copeland, N. G. *Genomics* **1992**, *13* (4), 1281–1288.
[425] Anastasi, A.; Erspamer, V.; Bucci, M. *Arch. Biochem. Biophys.* **1972**, *148* (2), 443–446.

Ce récepteur est le plus étudié de la famille des récepteurs peptidiques de la bombésine composée de quatre sous-types de récepteurs. Ces sous-types sont le neuromédine B (NMB ou BB1), le neuromédine C (GRP ou BB2), le récepteur orphelin (BB3) et le récepteur de bombésine (BBN ou BB4).[426] Ces sous-types ont tous des molécules de haute affinité pour eux qui une fois liés déclenchent leur internalisation et des effets biologiques.[427,428] Le peptide GRP ou la bombésine ont une haute affinité pour le GRPR, mais celui de BB3 a une affinité très faible pour lui.[427] Il intervient dans deux types de signaux : soit physiologiques ou soit physiopathologiques.[427,429] Les signaux physiologiques sont le relargage de peptides hormonales, la sécrétion gastrique, la contraction musculaire, le changement du rythme circadien ou dans le système immunitaire. Certains signaux du GRPR implique la mémoire.[430,431] D'autres impliquent des effets sur les réponses émotionnelles, les interactions sociales et le comportement alimentaire.[427] Les signaux physiopathologiques sont la croissance, la prolifération, la survie et la mobilité des cellules. Ces derniers interviennent dans la progression des cancers primaires ou métastatiques.[427]

3. Analogues de la bombésine : des agonistes au antagonistes actuels

Le GRPR lie le peptide libérant de la gastrine (GRP), ainsi que toute une famille de peptides analogues. Le GRP de mammifère (GRP) est un neuropeptide de 27 acides aminés isolé de l'estomac porcin comme précurseur du prepro-GRP (148 acides aminés) par Spindel *et al* en 1984. Le GRP partage la même séquence C-terminal avec le tétradécapeptide bombésine, c'est-à-dire la séquence peptidique HLM-NH_2 (histidine(H), leucine (L) et méthionine (M)) présentant une fonction biologique similaire.[425] Ainsi, la bombésine et les fragments de bombésine présentent une forte affinité pour GRPR. Le GRP, la bombésine et ses fragments appartiennent à une même famille de peptide dont le représentant le plus utilisé est la bombésine. Les peptides de cette famille présentent généralement une stabilité exceptionnelle et une clairance rapide du sang, une pénétration tissulaire rapide, ainsi qu'une faible immunogénicité, qui conviennent bien à des fins diagnostiques et thérapeutiques.

Au cours des dernières années, plusieurs ligands radiomarqués ciblant le GRPR ont été décrits et viennent enrichir cette famille d'analogue de la bombésine.[432] Bien que la majorité d'entre eux aient été étudiés dans le cancer de la prostate, ces études ont élargi nos connaissances sur leurs interactions avec le récepteur et leur absorption dans d'autres organes contribuant au bruit de fond. Nous avons choisi de citer quelques-uns des plus populaires dans le tableau 24.

[426] Smith, C. J.; Volkert, W. A.; Hoffman, T. J. *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30* (8), 861–868.
[427] Jensen, R. T.; Battey, J. F.; Spindel, E. R.; Benya, R. V. *Pharmacol. Rev.* **2008**, *60* (1), 1–42.
[428] Roesler, R.; Schwartsmann, G. *Front. Endocrinol.* **2012**, *159* (3), 1–12.
[429] Laukkanen, M. O.; Castellone, M. D. *Curr. Drug Targets* **2016**, *17* (5), 508–514.
[430] Roesler, R.; Luft, T.; Schwartsmann, G. *Dement. neuropsychol.* **2007**, *1*, 118–123.
[431] Roesler, R.; Kent, P.; Luft, T.; Schwartsmann, G.; Merali, Z. *Neurobiol. Learn. Mem.* **2014**, *112*, 44–52.
[432] Mansi, R.; Wang, X.; Forrer, F.; Kneifel, S.; Tamma, M.-L.; Waser, B.; Cescato, R.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15* (16), 5240–5249.

Entrée	Nom	Chélate	Espaceur	Séquence				Année	Référence
				N-terminal	Commune	C-terminal			
1	GRP[1-27] (Neuromédine C, GRP ou BB2)	DO3A	-	APVSVGGTVL AKMYPRGNH	WAVGH	LM	NH_2	2009	Ischia *et al*[433]
2	GRP[14-27]	DO3A	-	MYPRGNH	WAVGH	LM	NH_2	2001	Tokita *et al*[434]
3	Bombésine BBN[7-14]	DO3A	-	-	QWAVGH	LM	NH_2	1988	Coy *et al*[435]
4	AMBA	DO3A	$CH_2CONPhCO$	-	QWAVGH	LM	NH_2	2006	Lantry *et al*[436]
5	BZH	DO3A	PEG_2	GY	QWAV$_\beta$AH	ThiNle	NH_2	2005	Schuhmacher *et al*[437]
6	Neuromédine B (NMB ou BB1)	DO3A	-	GNL	WATGH	FM	NH_2	2011	Marsouvanidis *et al*[438]
7	JMV594	DO3A	-	-	fQWAVGH	StaL	NH_2	1998	Azay *et al*[439]
8	MP2346	DO3A	-	PQRYGN	QWAVGH	LM	NH_2	2007	Biddlecombe *et al*[440]
9	DOTABOM	NO2A	$NH(CH_2)_{2\text{-}8}$	-	QWAVGH	LM	NH_2	2004	Correia *et al*[441]
10	RM2 (BAY86-7548)	DOTA	G-Pip	-	fQWAVGH	StaL	NH_2	2014	Wieser *et al*[442]
11	RM26	NOTA	PEG_2	-	fQWAVGH	StaL	NH_2	2013	Varasteh *et al*[443]
12	BB2r	DO3A	$(CH_2)_7$	-	WAVGH	LM	NH_2	2012	Wagh *et al*[444]
13	AR	DOTA	$PEG_4(CH_2)_2CO$	-	fQWAVGH	StaL	NH_2	2010	Abiraj *et al*[445]
14	MATBBN	NOTA	-	GGGRDN	fQWAVGH	L	NHEt	2014	Pan *et al*[446]
15	ATBBN	NOTA	-	-	fQWAVGH	L	NHEt		
16	MJ9	NOTA NODA-GA	Pip	G	fQWAVGH	StaL	NH_2	2014	Gourni *et al*[447]
17	SCH1	NODA-GA	$NH(CH_2)_7CO$	-	fQWAVGH	StaL	NH_2	2016	Sun *et al*[448]
18	SB3	DO3A	*p*ADA	-	fQWAVGH	L	NHEt	2016	Maina *et al*[449]
19	BEYG5	DTPA DOTA	-	YGN	QWAVGH	LM	NH_2	2012	Pujatti *et al*[450]
20	PESIN	NOTA	$PEG_4(CH_2)_2CO$		QWAVGH	LM	NH_2	2016	Sun *et al*[448]
21	Cystabn	DO3A	-	C	fQWAVGH	StaL	NH_2	2016	Akbar *et al*[451]
22	NeoBOMB1 (NeoBOMB, NeoB, NeoRAY)	DOTA DO3A	*p*ADA	-	fQWAVGH	-	DMH4A	2016	Nock *et al*[452]
23	ProBOMB1 (ProBOMB ou ProB)	DO3A	*p*ADA	-	fQWAVGH	L-ψ(CH_2 N)-P	NH_2	2019	Lau *et al*[453]
24	TacsBOMB (TacsB)	DO3A	Pip-G	-	fQWAVGH	LThz	NH_2	2022	Wang *et al*[454]

Tableau 24 : Exemples de peptides analogues de GRP/bombésine.

Deux classes d'analogues de la bombésine marqués avec une variété de radioisotopes différents ont été développées, les agonistes et les antagonistes.[455] L'agoniste s'internalise et entraine une réponse du récepteur. L'antagoniste bloque l'accès pour l'agoniste et donc n'entraine aucune réponse du récepteur. Des études antérieures (Tableau 24 entrée 2-3,5-7,10) ont montré une affinité de liaison élevée des agonistes aux GRPR. Ces auteurs ont montré que

[433] Ischia, J.; Patel, O.; Shulkes, A.; Baldwin, G. S. *BioFactors* **2009**, *35* (1), 69–75.
[434] Tokita, K.; Katsuno, T.; Hocart, S. J.; Coy, D. H.; Llinares, M.; Martinez, J.; Jensen, R. T. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (39), 36652–36663.
[435] Coy, D. H.; Heinz-Erian, P.; Jiang, N. Y.; Sasaki, Y.; Taylor, J.; Moreau, J. P.; Wolfrey, W. T.; Gardner, J. D.; Jensen, R. T. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263* (11), 5056–5060.
[436] Lantry, L. E.; Cappelletti, E.; Maddalena, M. E.; Fox, J. S.; Feng, W.; Chen, J.; Thomas, R.; Eaton, S. M.; Bogdan, N. J.; Arunachalam, T.; Reubi, J. C.; Raju, N.; Metcalfe, E. C.; Lattuada, L.; Linder, K. E.; Swenson, R. E.; Tweedle, M. F.; Nunn, A. D. *J. Nucl. Med.* **2006**, *47* (7), 1144–1152.
[437] Schuhmacher, J.; Zhang, H.; Doll, J.; Mäcke, H. R.; Matys, R.; Hauser, H.; Henze, M.; Haberkorn, U.; Eisenhut, M. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46* (4), 691–699.
[438] Marsouvanidis, P. J.; Maina, T.; Sallegger, W.; Krenning, E. P.; de Jong, M.; Nock, B. A. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (21), 8579–8587.
[439] Azay, J.; Nagain, C.; Llinares, M.; Devin, C.; Fehrentz, J. A.; Bernad, N.; Roze, C.; Martinez, J. *Peptides* **1998**, *19* (1), 57–63.
[440] Biddlecombe, G. B.; Rogers, B. E.; de Visser, M.; Parry, J. J.; de Jong, M.; Erion, J. L.; Lewis, J. S. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18* (3), 724–730.
[441] G. Correia, J. D.; Paulo, A.; D. Raposinho, P.; Santos, I. Radiometallated Peptides for Molecular Imaging and Targeted Therapy. *Dalton Trans.* **2011**, *40* (23), 6144–6167.
[442] Wieser, G.; Popp, I.; Mansi, R.; Grosu, A.; Schultze-Seemann, W.; Maecke, H.; Müller, A.; Weber, W.; Meyer, P. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55* (1), 17–17.
[443] Varasteh, Z.; Velikyan, I.; Lindeberg, G.; Sörensen, J.; Larhed, M.; Sandström, M.; Selvaraju, R. K.; Malmberg, J.; Tolmachev, V.; Orlova, A. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24* (7), 1144–1153.
[444] Wagh, N. K.; Zhou, Z.; Ogbomo, S. M.; Shi, W.; Brusnahan, S. K.; Garrison, J. C. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23* (3), 527–537.
[445] Abiraj, K.; Mansi, R.; Tamma, M.-L.; Fani, M.; Forrer, F.; Nicolas, G.; Cescato, R.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52* (12), 1970–1978.
[446] Pan, D.; Xu, Y. P.; Yang, R. H.; Wang, L.; Chen, F.; Luo, S.; Yang, M.; Yan, Y. *Amino Acids* **2014**, *46* (6), 1481–1489.
[447] Gourni, E.; Mansi, R.; Jamous, M.; Waser, B.; Smerling, C.; Burian, A.; Buchegger, F.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55* (10), 1719–1725.
[448] Sun, Y.; Ma, X.; Zhang, Z.; Sun, Z.; Loft, M.; Ding, B.; Liu, C.; Xu, L.; Yang, M.; Jiang, Y.; Liu, J.; Xiao, Y.; Cheng, Z.; Hong, X. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (8), 1857–1864.
[449] Maina, T.; Bergsma, H.; Kulkarni, H. R.; Mueller, D.; Charalambidis, D.; Krenning, E. P.; Nock, B. A.; de Jong, M.; Baum, R. P. *Eur. J. Nucl. Med. Mol Imaging* **2016**, *43* (5), 964–973.
[450] Pujatti, P. B.; Massicano, A. V. F.; Mengatti, J.; de Araújo, E. B. *Appl. Radiat. Isot.* **2012**, *70* (5), 856–863.
[451] Akbar, M. J.; Ferreira, P. C. L.; Giorgetti, M.; Stokes, L.; Morris, C. J. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2019**, *10* (1), 2553–2562.
[452] Nock, B. A.; Kaloudi, A.; Lymperis, E.; Giarika, A.; Kulkarni, H. R.; Klette, I.; Singh, A.; Krenning, E. P.; Jong, M. de; Maina, T.; Baum, R. P. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (1), 75–80.
[453] Lau, J.; Rousseau, E.; Zhang, Z.; Uribe, C. F.; Kuo, H.-T.; Zeisler, J.; Zhang, C.; Kwon, D.; Lin, K.-S.; Bénard, F. *ACS Omega* **2019**, *4* (1), 1470–1478.
[454] Wang, L.; Zhang, Z.; Merkens, H.; Zeisler, J.; Zhang, C.; Roxin, A.; Tan, R.; Bénard, F.; Lin, K.-S. *Molecules* **2022**, *27* (12), 3777–3791.
[455] Nanda, P. K.; Wienhoff, B. E.; Rold, T. L.; Sieckman, G. L.; Szczodroski, A. F.; Hoffman, T. J.; Rogers, B. E.; Smith, C. J. *In Vivo* **2012**, *26* (4), 583–592.

l'internalisation cellulaire spécifique augmentait fortement l'absorption tumorale. Cependant, d'autres études ont prouvé que les antagonistes ont une affinité de liaison considérablement plus élevée avec le GRPR (Tableau 24 entrée 13, 19, 22, 24, 31, 33 et 34). Ces dernières décennies, les agonistes ont été totalement abandonnés au profit des antagonistes. Des effets secondaires considérables chez les patients ont été observés, notamment des nausées, des diarrhées, des crampes abdominales ou une tachycardie transitoire.[456] Des produits de dégradation sont aussi observés pour certains des molécules s'internalisant. De plus, une absorption élevée et durable dans le foie et les organes exprimant physiologiquement le GRPR a été observés contribuant au bruit de fond et à la mauvaise qualité des images pour les agonistes.[457]

D'après le tableau 24, beaucoup de ligands antagonistes ciblant GRPR ont été développés aux cours du temps. La grande majorité se base sur une séquence QWAVGH. Son extrémité C-terminal est généralement fonctionnalisé par les séquences peptidiques LM-NH_2 (leucine (L) et méthionine (M)), SM-NH_2 (sérine (L) et méthionine (M)) ou 2,6-diméthylheptan-4-amine (DMH4A).

L'un des antagonistes les plus étudiés pour l'imagerie est le JMV594 conçu par Llinares *et al*. Dans l'ensemble, les études ont montré une efficacité élevée des antagonistes dans la détection des cancers primaires, tandis que pour les métastases osseuses, les taux de détection étaient beaucoup plus faibles. Les antagonistes RM2 et TE2A-AR06 ont présenté une bien meilleure pharmacocinétique que les agonistes.[458,459] Ils sont aussi rapidement éliminés des organes sains exprimant le GRPR.[459,460] Cependant, RM2 présente une accumulation tumorale limitée. RM26 n'a pas cette limite. RM26 présente une clairance sanguine rapide via le rein et une absorption spécifique de GRPR dans le pancréas.[443] Cependant, RM26 présente une vitesse d'internalisation lente. En 2013, Bratonovic *et al* ont modifié la séquence terminale au profit de LP-NH_2 (leucine et proline). Cette séquence terminale est propre au ProBOMB1 et permet de réduire l'absorption pancréatique par rapport aux autres dérivés de la bombésine, tout en conservant la spécificité de la cible.[461] Cependant, le ProBOMB1 a une absorption tumorale dépendante du radionucléide. Pour résoudre ce problème un espaceur cationique a été ajouté le 4-amino-(1-carboxymethyl)-pipéridine. La ProBOMB2 s'élimine de la tumeur avec le temps dans les reins augmentant sa dose absorbée. Pour protéger les reins, l'albumine peut être ajouté pour atténuer la dose reçue par la vessie.[461]

Ainsi à partir de l'agoniste bombésine ou GRP, les auteurs ont réalisés des modifications sélectives des acides aminés de la séquence générant beaucoup de nouveaux peptides. Eux-mêmes ont été fonctionnalisé en C-terminal de manière différentes, puis des radionucléides différents ont été utilisé nécessitant de modifier le chélate.[70] Par exemple, un changement de

[456]Mather, S. J.; Nock, B. A.; Maina, T.; Gibson, V.; Ellison, D.; Murray, I.; Sobnack, R.; Colebrook, S.; Wan, S.; Halberrt, G.; Szysko, T.; Powles, T.; Avril, N. *Mol. Imaging Biol.* **2014**, *16* (6), 888–895.
[457] Wiele, C. V. de; Dumont, F.; Dierckx, R. A.; Peers, S. H.; Thornback, J. R.; Slegers, G.; Thierens, H. *J. Nucl. Med.* **2001**, *42* (11), 1722–1727.
[458] Mansi, R.; Wang, X.; Forrer, F.; Waser, B.; Cescato, R.; Graham, K.; Borkowski, S.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, *38* (1), 97–107.
[459] Wieser, G.; Mansi, R.; Grosu, A. L.; Schultze-Seemann, W.; Dumont-Walter, R. A.; Meyer, P. T.; Maecke, H. R.; Reubi, J. C.; Weber, W. A. *Theranostics* **2014**, *4* (4), 412–419.
[460] Kähkönen, E.; Jambor, I.; Kemppainen, J.; Lehtiö, K.; Grönroos, T. J.; Kuisma, A.; Luoto, P.; Sipilä, H. J.; Tolvanen, T.; Alanen, K.; Silén, J.; Kallajoki, M.; Roivainen, A.; Schäfer, N.; Schibli, R.; Dragic, M.; Johayem, A.; Valencia, R.; Borkowski, S.; Minn, H. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19* (19), 5434–5443.
[461] Bratanovic, I. J.; Zhang, C.; Zhang, Z.; Kuo, H.-T.; Colpo, N.; Zeisler, J.; Merkens, H.; Uribe, C.; Lin, K.-S.; Bénard, F. *J. Nucl. Med.* **2021**.

chélate peut modifier le profil de distribution.[462,463] Enfin, le chélate est espacé du peptide avec différent type d'espaceur. En 2012, Wagh *et al* ont modulé l'activité biologique du peptide BB2r pour cibler les cellules cancéreuses hypoxiques de la prostate en changeant l'espaceur par des espaceurs comportant un, deux ou trois groupements nitroimidazoles.[444] Toutes ces modifications modulent les propriétés d'absorption, de pharmacocinétique et de clairance du radiotraceur. Plus récemment, la modification de l'espaceur par sa charge, sa rigidité et sa longueur ont permis de surmonter certaines limites des antagonistes.[461]

Bien que certains antagonistes de GRPR présentent un ou plusieurs avantages par rapport aux autres, ils peuvent aussi souffrir d'inconvénients. Par exemple, [^{68}Ga]DOTA-RM2 présente la formation de trois métabolites après 20 min issus du clivage *in vivo* de [^{68}Ga]DOTA et entre les acides aminés alanine et valine.[464]

En quête de stabilité, de nombreuses modifications structurales ont été testé ces dernières années (Tableau 24). Notamment, le remplacement de certain acide aminé clé comme Gln^7-Trp^8 de la séquence du RM2 limitant la dégradation *in vivo*.[465]

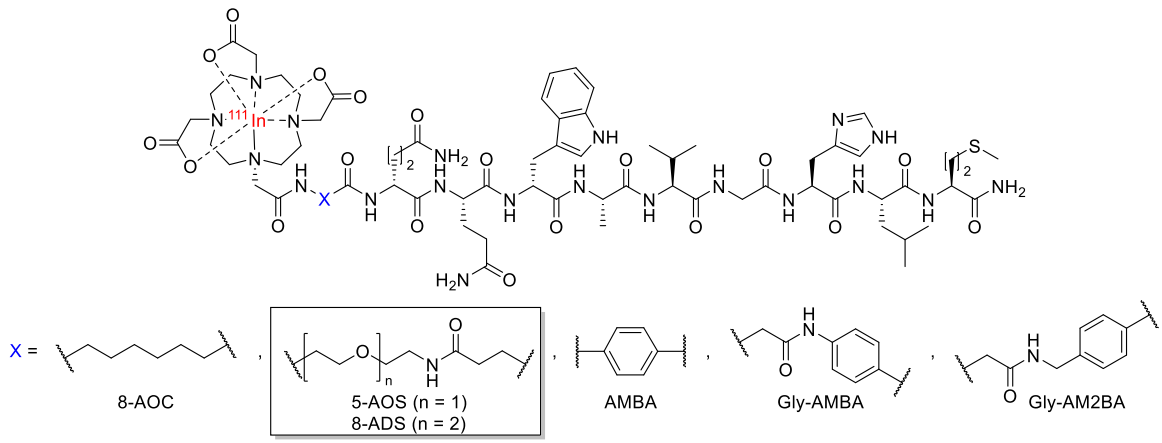


Schéma 80 : Comparaison d'espaceur pour la bombésine BBN[7-14].[466]

En 2008, Garrison *et al* ont comparé différents types d'espaceurs sur le BBN[7-14] (Schéma 79) basés sur des groupements hydrocarbonés, PEG$_{1-2}$ et aromatiques.[466] Ils ont observé que les espaceurs aromatiques présentent généralement une rétention hépatobiliaire significativement plus élevée par rapport à ceux hydrocarbonés ou pegylés, tandis que ceux pegylés sont plus excrétés. De même, les espaceurs hydrocarbonés ou aromatiques présentent généralement une absorption et une rétention *in vivo* plus élevées dans le pancréas par rapport à ceux pegylés. Tout en conservant une accumulation tumorale comparable. Cette étude a

[462] Mitran, B.; Varasteh, Z.; Selvaraju, R. K.; Lindeberg, G.; Sörensen, J.; Larhed, M.; Tolmachev, V.; Rosenström, U.; Orlova, A. *Int. J. Oncol.* **2016**, *48* (5), 2124–2134.
[463] Varasteh, Z.; Mitran, B.; Rosenström, U.; Velikyan, I.; Rosestedt, M.; Lindeberg, G.; Sörensen, J.; Larhed, M.; Tolmachev, V.; Orlova, A. *Nucl. Med. Biol.* **2015**, *42* (5), 446–454.
[464] Roivainen, A.; Kähkönen, E.; Luoto, P.; Borkowski, S.; Hofmann, B.; Jambor, I.; Lehtiö, K.; Rantala, T.; Rottmann, A.; Sipilä, H.; Sparks, R.; Suilamo, S.; Tolvanen, T.; Valencia, R.; Minn, H. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54* (6), 867–872.
[465] Guenther, T.; Deiser, S.; Felber, V.; Beck, R.; Wester, H.-J. *J. Nucl. Med.* **2022**, *63* (9), 1364–1370.
[466] Garrison, J. C.; Rold, T. L.; Sieckman, G. L.; Naz, F.; Sublett, S. V.; Figueroa, S. D.; Volkert, W. A.; Hoffman, T. J. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (9), 1803–1812.

démontré l'importance de l'espaceur non seulement sur la clairance *in vivo* de la molécule radioactive, mais également sur l'absorption et la rétention *in vivo*. La diminution de l'accumulation pancréatique a aussi été observée dans d'autres études.[467] D'autres études ont montré leurs importances sur la stabilité. Par exemple, l'ajout d'un espaceur *p*ADA entre le DOTA et le peptide a permis un gain de stabilité.[468]

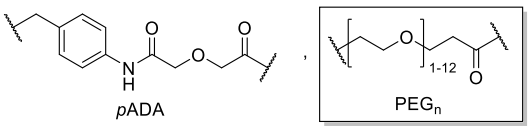


Schéma 81 : Autres espaceurs.[468,445]

4. Intérêt de la PEGylation des antagonistes de GRPR

En 2014, une étude des effets des mini-PEG_n (n = 2-6) a permis de démontrer un gain d'hydrophilie, de stabilité, d'accumulation tumorale et de pharmacocinétique.[469] De plus, une diminution de l'accumulation dans le foie, les intestins et le pancréas engendrant une meilleure imagerie. Pour toutes ces raisons, plusieurs dérivés de la bombésine ont ainsi été fonctionnalisé par un PEG_n (Tableau 25).

[467] Schroeder, R. P. J.; Weerden, W. M. van; Bangma, C.; Krenning, E. P.; Jong, M. de. *Methods* **2009**, *48* (2), 200–204.
[468] Heimbrook, D. C.; Saari, W. S.; Balishin, N. L.; Fisher, T. W.; Friedman, A.; Kiefer, D. M.; Rotberg, N. S.; Wallen, J. W.; Oliff, A. *J. Med. Chem.* **1991**, *34* (7), 2102–2107.
[469] Varasteh, Z.; Rosenström, U.; Velikyan, I.; Mitran, B.; Altai, M.; Honarvar, H.; Rosestedt, M.; Lindeberg, G.; Sörensen, J.; Larhed, M.; Tolmachev, V.; Orlova, A. *Molecules* **2014**, *19* (7), 10455–10472.

Entrée	PEG_n	Dérivés de bombésine	Date	Référence
1	2	BZH3	2005	Schuhmacher *et al*[437]
2	1-2	BBN	2008	Garrison *et al*[466]
3	4	AMBA	2010	Schroeder *et al*[467]
4	4	AR	2011	Abiraj *et al*[445]
5	6	RM26	2013	Xu *et al*[470]
6	3	BBN	2013	Inkster *et al*[471]
7	2	RM26	2013 2016	Varasteh *et al*[443] Mitran *et al*[462]
8	4	CB-TE2A-AR	2014	Wieser *et al*[459]
9	2,4,6,12	JMV594	2014	Jamous *et al*[472]
10	2,4	LE1 et LE2	2015	Gourni *et al*[473]
11	4	BBN	2016 2017	Valverde *et al*[474] Maina *et al*[475]
12	1	RM26	2018	Mansour *et al*[476]
13	3	RM26	2018	Cheng *et al*[477]
14	2,3,4	DB7, DB13 et DB14	2020	Kanellopoulos *et al*[478]
15	3	SP714	2020	Zhang *et al*[479]

Tableau 25 : Quelques exemples d'analogues de la bombésine fonctionnalisée par un PEG_n.

La grande majorité des antagonistes récents ont été fonctionnalisée par un PEG_n (n = 2 à 6). Notamment, un PEG_4 a été ajouté sur le CB-TE2A-AR06.[445] De même, l'analogue de la bombésine le plus souvent fonctionnalisé, le RM26 a été pegylé. En 2019, Mitran *et al* décrit l'influence de l'ajout d'un groupement PEG_n (n = 2,3,4 et 6) et de différents chélates pour l'antagonistes [^{177}Lu]Lu-DOTA-RM26.[462] Ces auteurs ont démontré un gain d'efficacité thérapeutique *in vivo* dans les xénogreffes du cancer de la prostate. Cependant, peu d'influence sur l'hydrophilie a été observée en fonction de la longueur de l'espaceur PEG_n.[469]

Jamous *et al* ont comparé quatre longueurs de PEG_n différents (n = 2, 4, 6 ou 12) afin de choisir le meilleur candidat pour des applications thérapeutiques et diagnostiques potentielles.[472] En effet, dans la majorité des cas (Tableau 25) un gain d'affinité et une meilleure absorbance tumorale est observable. Tandis que dans d'autres cas, les espaceurs PEG_n peuvent diminuer l'affinité de liaison de ces ligands.[480,481] Les quatre conjugués MJ1-4 ont montré une affinité raisonnable mais inférieure aux valeurs rapportées pour les antagonistes de la bombésine à base de statine.[472] L'affinité (valeurs IC_{50}) est améliorée de deux à trois fois lors de la métallation. Il y a une légère amélioration avec une longueur de chaine de 4 à 6, mais

[470] Xu, B.; Varasteh, Z.; Orlova, A.; Andersson, K.; Larhammar, D.; Björkelund, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *441* (4), 820–824.
[471] Inkster, J.; Lin, K.-S.; Ait-Mohand, S.; Gosselin, S.; Bénard, F.; Guérin, B.; Pourghiasian, M.; Ruth, T.; Schaffer, P.; Storr, T. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (13), 3920–3926.
[472] Jamous, M.; Tamma, M. L.; Gourni, E.; Waser, B.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R.; Mansi, R. *Nucl. Med. Biol.* **2014**, *41* (6), 464–470.
[473] Gourni, E.; Del Pozzo, L.; Kheirallah, E.; Smerling, C.; Waser, B.; Reubi, J.-C.; Paterson, B. M.; Donnelly, P. S.; Meyer, P. T.; Maecke, H. R. *Mol. Pharmaceutics* **2015**, *12* (8), 2781–2790.
[474] Valverde, I. E.; Vomstein, S.; Mindt, T. L. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (8), 3867–3877.
[475] Maina, T.; Kaloudi, A.; Valverde, I. E.; Mindt, T. L.; Nock, B. A. *Nucl. Med. Biol.* **2017**, *52* (1), 57–62.
[476] Mansour, N.; Paquette, M.; Ait-Mohand, S.; Dumulon-Perreault, V.; Guérin, B. *Nucl. Med. Biol.* **2018**, *56* (1), 31–38.
[477] Cheng, S.; Lang, L.; Wang, Z.; Jacobson, O.; Yung, B.; Zhu, G.; Gu, D.; Ma, Y.; Zhu, X.; Niu, G.; Chen, X. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29* (2), 410–419.
[478] Kanellopoulos, P.; Lymperis, E.; Kaloudi, A.; de Jong, M.; Krenning, E. P.; Nock, B. A.; Maina, T. *Molecules* **2020**, *25* (15), 3418–3431.
[479] Zhang, W.; Fan, W.; Ottemann, B. M.; Alshehri, S.; Garrison, J. C. *J. Nucl. Med.* **2020**, *61* (3), 443–450. https://doi.org/10.2967/jnumed.119.231282.
[480] Chen, X.; Hou, Y.; Tohme, M.; Park, R.; Khankaldyyan, V.; Gonzales-Gomez, I.; Bading, J. R.; Laug, W. E.; Conti, P. S. *J. Nucl. Med.* **2004**, *45* (10), 1776–1783.
[481] Rogers, B. E.; Della Manna, D.; Safavy, A. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2004**, *19* (1), 25–34.

diminue avec PEG_{12}. Un compromis dans la longueur des chaines PEG_n doit donc être trouvé. Accardo *et al* ont obtenu des résultats encourageant sur un analogue de la bombésine fonctionnalisé par un PEG_n de masse moléculaire égale à 2000 g/mol.[482]

Garrison *et al* a aussi montré que le PEG_2 permettait de diminuer l'accumulation dans le pancréas de la bombésine.[466] D'autres solutions ont aussi permise de diminuer cette accumulation pancréatique. En 2011, Faintuch *et al* ont utilisé une stratégie de pré-ciblage, impliquant la réaction entre le streptavidin (SA) et un dérivé de morpholine (B-MORF).[483] Cette stratégie appliquée avec le BBN[7-14] a permis d'éviter avec succès l'accumulation dans le pancréas et a favorisé l'élimination rénale. Leurs analyses HPLC ont permis d'estimer un rendement de 60% pour la réaction bioorthogonale utilisée, et leur essai *in vivo* a montré que le concept était viable. Les auteurs ont démontré qu'un espacer était nécessaire entre le TCO et l'analogue de bombésine. En 2018, Litau *et al* ont appliqué uniquement la réaction IEDDA Tz-TCO pour le marquage de BBN[7-14] au gallium-68 et au cuivre-64.[484] Ils ont observé que les composés ayant des espaceurs PEG_n régissent mieux en IEDDA Tz-TCO. En 2022, Handula *et al* ont utilisé la réaction IEDDA Tz-TCO pour marquer un dérivé de la bombésine, le NeoBOMB1, et ont comparé l'influence de deux espaceurs.[487] Les résultats ont montré là-encore une diminution de l'accumulation pancréatique au profit de l'élimination rénale avec de meilleurs résultats pour l'espaceur PEG_n. La réaction IEDDA Tz-TCO permet donc de résoudre en partie le problème d'accumulation pancréatique.

5. Cas particulier du NeoBOMB1

En 2016, l'équipe de Marion de Jong a développé, en collaboration avec l'équipe de Theodosia Maina et l'équipe de Richard P Baum, le NeoBOMB1 pour cibler le GRPR. Contrairement aux peptides précédents, cet antagoniste ne mime pas la bombésine en C-terminal, mais bloque cette position. La séquence fQWAVGH basée sur SB3 est fonctionnalisée par un 2,6-diméthylheptan-4-amine (noté DMH4A). En N-terminal, le chélate DOTA est espacé par un *p*ADA.

Nock *et al* ont marqué le NeoBOMB1 avec le gallium-68 et l'indium-111 pour l'imagerie et avec le lutétium-177 pour des applications thérapeutiques. Des essais précliniques ont montré de très bonne affinité de liaison pour le GRPR permettant une accumulation suffisante.[452,485]

Ces résultats ont permis d'envisager la première étude clinique (phase I) en imagerie. Pretze *et al* ont produit le NeoBOMB1 avec une qualité GMP pour l'injecter chez 3 patients (2 femmes et 1 hommes entre 51 et 77 ans).[486] Ces patients étaient atteints des métastases

[482] A.; Mannucci, S.; Nicolato, E.; Vurro, F.; Diaferia, C.; Bontempi, P.; Marzola, P.; Morelli, G. *Drug Deliv. and Transl. Res.* **2019**, 9 (1), 215–226.
[483] Faintuch, B. L.; Núñez, G. E. F.; Teodoro, R.; Moro, A. M.; Mengatti, J. *Clinics* **2011**, *66* (2), 327–336.
[484] Litau, S.; Seibold, U.; Wängler, B.; Schirrmacher, R.; Wängler, C. *ACS Omega* **2018**, *3* (10), 14039–14053.
[485] Dalm, S. U.; Bakker, I. L.; Blois, E. de; Doeswijk, G. N.; Konijnenberg, M. W.; Orlandi, F.; Barbato, D.; Tedesco, M.; Maina, T.; Nock, B. A.; Jong, M. de. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (2), 293–299.
[486] Pretze, M.; Reffert, L.; Diehl, S.; Schönberg, S. O.; Wängler, C.; Hohenberger, P.; Wängler, B. *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2021**, *6* (1), 22–35.

tumorales stromales gastro-intestinales progressant dans le foie. Ils ne répondaient pas à un traitement standard par inhibiteur de la tyrosine kinase. Sans préparation nécessaire des patients, les imageries par scintigraphies avant et après traitements interventionnels, et TEP/CT à 120 min post-injection ont permis de visualiser de manière adéquate les métastases abdominales. Ces informations supplémentaires ont permis de consolider le diagnostic pour poursuivre le traitement antitumoral.

Fort de ces résultats, le NeoBOMB1 a été racheté par Novartis permettant de dynamiser la recherche dont les essais cliniques. Le NeoBOMB1 devient alors NeoRAY pour les applications d'imagerie et NeoB pour les applications thérapeutiques. La suite des essais cliniques semble démontrer la stabilité métabolique du NeoBOMB1 bien meilleure que les autres antagonistes tels que RM2, bien que RM2 présente une meilleure vitesse d'accumulation tumorale. Ces résultats restent à nuancer au vu de la jeunesse de ce radiotraceur. En 2022, Guenther *et al* ont réalisé une étude comparative du [^{177}Lu]Lu-DOTA-NeoBOMB1 par rapport au RM2. Ces auteurs confirment que le [^{177}Lu]Lu-DOTA-NeoBOMB1 présente une stabilité métabolique plus élevée *in vivo* et montre une rétention accrue de la radioactivité dans le tissu tumoral.[465]

Grâce à ces résultats préliminaires encourageants avec le gallium-68, l'indium-111 et le lutétium-177, notre laboratoire a choisi le NeoBOMB1 pour cibler le GRPR.

6. Intérêt de la PEGylation du NeoBOMB1 pour la réaction IEDDA Tz-TCO

Toutefois, dès les premières études, le NeoBOMB1 a montré une accumulation importante dans le pancréas plus élevé que dans la tumeur.[452,485,487] Pour résoudre ce problème commun à d'autres dérivés de la bombésine, Handula *et al* ont utilisé la réaction IEDDA Tz-TCO pour marquer le NeoBOMB1.[487] Les résultats ont montré une diminution de l'accumulation pancréatique au profit de l'élimination rénale, mais diminuait son affinité de liaison par rapport au NeoBOMB1 de référence.[487]

L'hypothèse que notre laboratoire a émise est qu'un changement de conformation du peptide empêche la liaison au récepteur GRP. L'introduction d'un espaceur PEG_4 en N-terminal a permis de retrouver l'affinité de liaison du NeoBOMB1 de référence. L'espaceur PEG_4 est suffisamment souple pour ne pas imposer la conformation du peptide contrairement à un espaceur plus rigide tels que *p*ADA. Cette conformation doit masquer le TCO et le rendre inaccessible pour la IEDDA. L'introduction d'un espaceur de type PEG_n permet de résoudre les problèmes de cette approche. Nous avons émis l'hypothèse que l'ajout d'un espace suffisamment long pour le sortir de la zone du récepteur le rendrait plus accessible à l'IEDDA.

7. Présentation des travaux : objectifs

Notre objectif de recherche dans cette partie du projet est d'étudier l'influence de la longueur de la chaine PEG_n sur la réaction « click » de IEDDA entre une Tz et un TCO.

Dans la littérature, les dérivés de Bombésine ont déjà été fonctionnalisés par un PEG_n (cf. A.4).[471] Ils ont été obtenus soit par un couplage peptidique classique, soit par une réaction de couplage avec activation, soit une réaction de la chimie « click » ou soit une réaction utilisant des bactéries recombinantes.

Dans un premier temps, nous présenterons les résultats obtenus pour la synthèse de la séquence peptidique fQWAVGH fonctionnalisée par un PEG_n et un TCO. Les résultats seront vu selon deux approches par couplage peptide en synthèse peptidique en phase solide (SPPS) activé ou non. Ensuite, le couplage multi-PEG_n, puis le couplage par réaction de CuAAC seront détaillés. Dans un second temps, la réactivité des peptides sera testée avec des tétrazines commerciales. Dans un troisième temps, les peptides obtenus seront radiomarqués et évalués *in vitro* sur membranes.

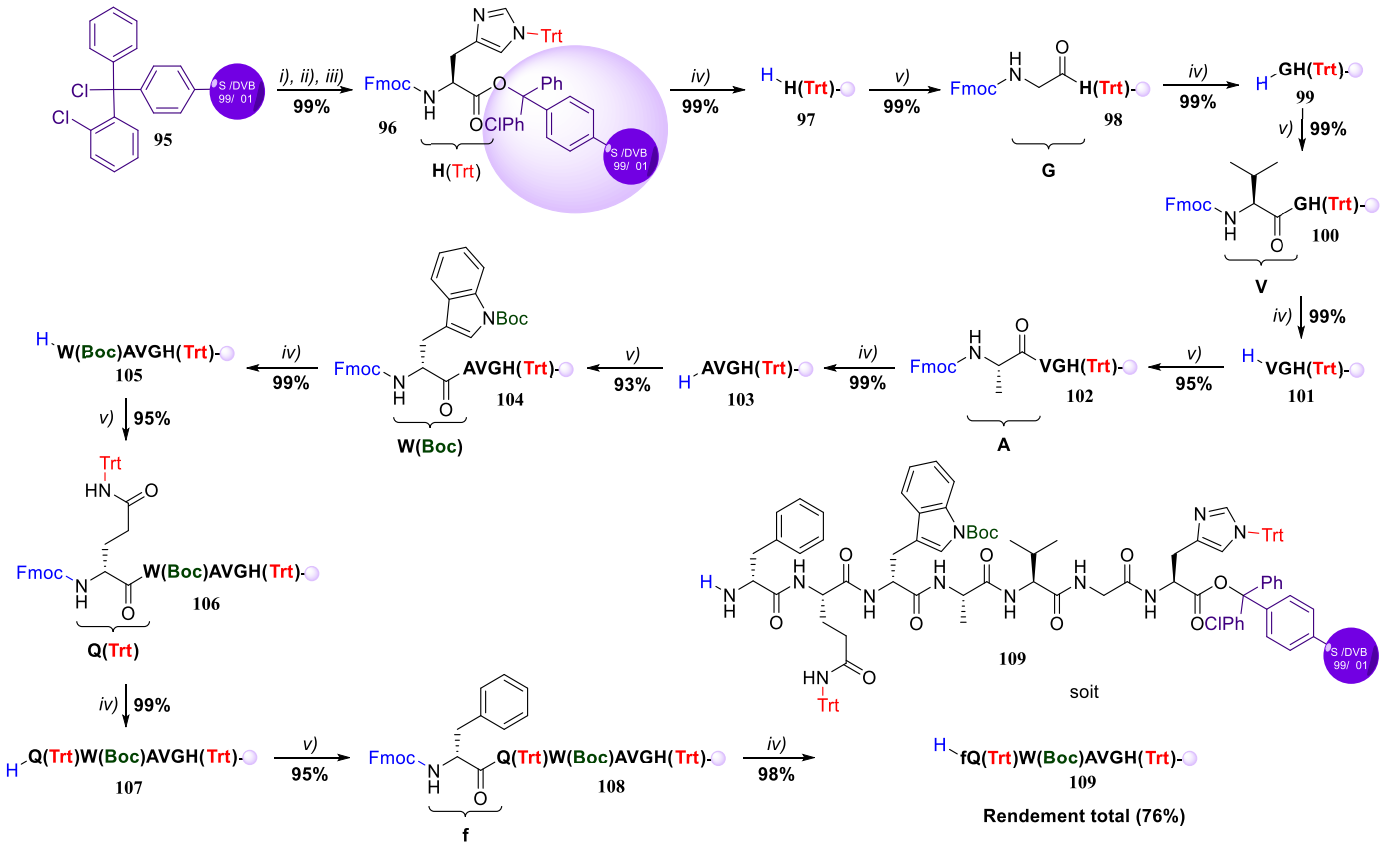
B. Synthèse de la séquence fQWAVGH-DMH4A

En 2018, Litau *et al* décrivent, pour la première fois à notre connaissance, la synthèse d'un analogue du peptide bombésine fonctionnalisé par une courte chaine PEG_4 et un TCO. Ce groupe obtient la séquence QWAVGH fonctionnalisé avec le PEG_4 par SPPS avec un rendement de 62%. Le rendement après ajout du TCO est de 72%. Le peptide TCO-$dPEG_4$-QWAVGH-LM est ainsi obtenu avec un rendement total de 45%.

Avant le début de mon travail sur cette partie de la thèse, ce projet faisait déjà l'objet d'études au sein du laboratoire basé sur ces résultats.[487] D'après les résultats des travaux réalisés par Handula *et al*, les peptides TCO-$dPEG_n$-fQWAVGH-DMH4A avec n = 4, 8 et 12 furent déjà obtenus avec succès avec respectivement des rendements de 16%, 13% et 2%. Les peptides avec n = 24 et 36 n'ont jamais été obtenus. Ces peptides comportent la séquence heptamèrique fQWAVGH **133** dont les positions N et C-terminales sont modifiées. Cette séquence **133** est synthétisée à partir de la séquence protégée fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **109** obtenue avec des rendements compris entre 4 et 47%. Les synthèses de tous ces peptides n'ont été réalisées qu'avec la stratégie classique de la protection Fmoc en SPPS.[488,489] Dans cette stratégie, les acides aminés protégés sont liés les uns aux autres en N-terminal par une alternance entre des étapes de couplage et de déprotection. Les chaînes latérales des acides aminés sont protégées par le trityle (Trt) et le *tert*-butoxycarbonyle (Boc) pour éviter les réactions secondaires. Les groupes protecteurs ne seront éliminés qu'avant l'introduction de TCO.[487]

Ce projet a commencé par reprendre ces travaux.[487] Tout d'abord, la séquence peptidique heptamèrique fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **109** a été reproduite dans les mêmes conditions avec un rendement sur 16 étapes de 49%. Sa synthèse optimisée, présentée dans le schéma 82, a permis de l'obtenir avec un meilleur rendement de 76% et une meilleure pureté.

[487] Handula, M.; Verhoeven, M.; Chen, K.-T.; Haeck, J.; de Jong, M.; Dalm, S. U.; Seimbille, Y. *Pharmaceutics* **2022**, *14* (1), 195–213.
[488] Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G. *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33* (3), 239–254.
[489] Behrendt, R.; White, P.; Offer, J. *J. Pept. Sci.* **2016**, *22* (1), 4–27.



Réactifs et conditions : *(i)* **Conditionnement de la résine** (Swelling) : DCM 20 °C, 1 h ; *(ii)* **Couplage du premier acide aminé** (Loading) : Fmoc-H(Trt)-OH, DIPEA, DCM, 20 °C, 4 h, pH8, **99%** ; *(iii)* **Protection des chlores libres** (Capping) : DIPEA/CH_3OH/DCM (v/v/v, 0.5/1.5/8.0 mL), 20 °C, 15 min, pH8-9, **99%** ; *(iv)* **Déprotection du Fmoc** (Fmoc deprotection) : 4-MePip/DMF (v/v, 2/8), 20 °C, 5 min (x3), pH8-9, **98-99%** ; *(v)* **Couplage** (Coupling) : Acide aminé, HBTU, OxymaPure, DIPEA, DMF, 20 °C, 2 h, pH8-9, **93-99%**.

*Schéma 82: Synthèse de la séquence peptidique fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **109** (suivant la notation 1 lettre des acides aminés).*

La synthèse peptidique de l'heptamère **109** sur support solide commence par le conditionnement (Schéma 82 *(i)*) de la résine de chlorure de 2-chlorotrityle (noté 2-Cl-Trt).[487] La résine sous forme de bille jaune clair est agitée dans le dichlorométhane (DCM) pendant 1 h. Aucune différence de valeur de chargement de la résine mesurée (Figure 29) n'a été observée pour les temps différents de 2 x 30 min, de 1 h, de 2 h ou de 2 h 30 min. Le DCM diffuse à l'intérieur de la matrice polymérique composée de l'alternance de styrène (S) et de 1% de divinylbenzène (DVB).[490] Le maillage polymérique s'écarte, et les billes de résines augmentent de taille.[491] Cette première étape de gonflement est essentielle pour accroitre la diffusion des réactifs au sein des sites actifs lors des prochaines étapes de la SPPS.[492] Il est connu dans la littérature que la nature de la matrice gélatineuse est un paramètre important définissant l'accessibilité des sites actifs à la surface des billes de résines.[493] Le meilleur gonflement est réalisé avec le DCM comme solvant.[491]

[490] Bonkowski, B.; Wieczorek, J.; Patel, M.; Craig, C.; Gravelin, A.; Boncher, T. *Mod. Chem. Appl.* **2013**, *1* (113), 1–4.
[491] Magtaan, J. K.; Devocelle, M.; Kelleher, F. *J. Pept. Sci.* **2020**, *26* (6), e3250–e3261.
[492] Santini, R.; Griffith, M. C.; Qi, M. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (49), 8951–8954.
[493] Barlos, K.; Chatzi, O.; Gatos, D.; Stavropoulos, G. *Int. J. Pept. Protein Res* **1991**, *37*, 513–520.

Le couplage (Schéma 82 *(ii)*) du premier acide aminé de la séquence peptidique aux sites actifs à la surface des billes de résines constitue la seconde étape.[494,495] Cette seconde étape fixe l'histidine **96** protégée par les groupements fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc) en N-terminal et trityle (Trt) en N-latéral. Ces groupements protecteurs évitent respectivement la polymérisation et la racémisation de l'acide aminé fixé. Cette fixation est réalisée dans les conditions classiques de la littérature et couramment utilisées au laboratoire.[487,496] Ainsi, l'histidine réagit pendant 1 h 30 dans le DCM en présence d'une base faible, la *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA). Cette étape a été optimisée par suivi de l'absorbance en spectrométrie UV-Visible de la réaction de clivage des groupements Fmoc (Figure 29).[495]

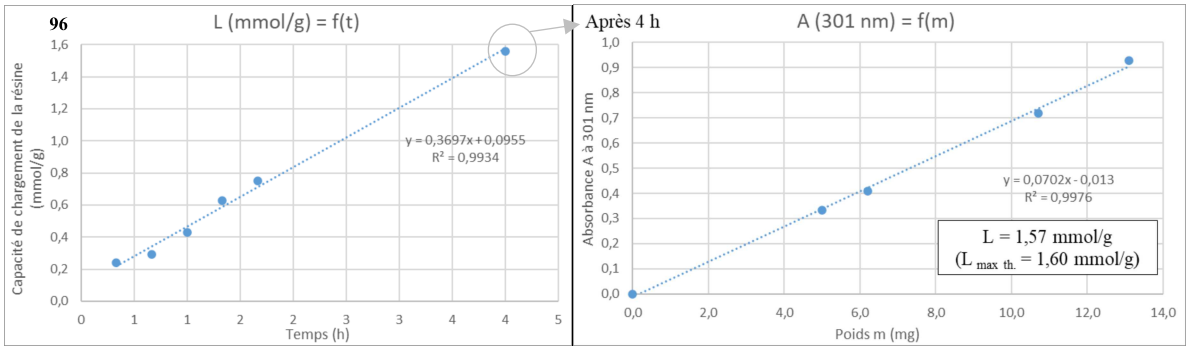


Figure 29 : Cinétique de chargement de la résiné 2-Cl-Trt par l'histidine (à gauche), exemple de régression linéaire de l'absorbance à 301 nm en fonction du poids du prélèvements de résine après 4 h de chargement (à droite).

Après la fixation du premier acide aminé, les sites actifs ne doivent plus réagir pour éviter la formation de chaines peptiques ayant des délétions d'acides aminés.[493] Pour désactiver les chlores actifs sur la résine 2-Cl-Trt, la troisième étape de protection (Schéma 82 *(iii)*) de la résine (ou coiffage) est nécessaire. D'après Barlos *et al*, le coiffage peut être réalisé rapidement et quantitativement en 10 min par l'addition du méthanol (CH_3OH), du 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE), de l'acide acétique (AcOH) ou de l'eau en présence d'un excès de DIPEA.[493] Le mélange DIPEA/CH_3OH/DCM (v/v/v, 0.5/1.5/8.0 mL) pendant 15 min couramment utilisé dans la littérature a été utilisé sans optimisation. Cette étape substitue les chlores par des groupes méthoxy issus du méthanol dans le DCM en présence de DIPEA comme base.[493] Des lavages (x3) par ce mélange peuvent améliorer l'élimination de l'acide aminé libre. Puis la résine est reconditionnée par le DCM et le DMF. En effet, le méthanol a tendance à contracter la matrice polymérique et diminuer la diffusion.[492]

Après avoir confirmé le chargement et la protection, la résine est prête pour l'introduction des autres acides aminés. La séquence peptidique **109** étant fixée à la résine en C-terminal, sa propagation est faite en N-terminal. La déprotection du Fmoc (Schéma 82 *(iv)*) de la résine **96** est réalisée par la 4-méthylpipéridine (4-MePip) à 20% (en volume, 12 equiv.) dans le DMF pendant 15 min pour former le peptide **97** déprotégé. La 4-MePip neutralise

[494] Eissler, S.; Kley, M.; Bächle, D.; Loidl, G.; Meier, T.; Samson, D. *J. Pept. Sci.* **2017**, *23* (10), 757–762.
[495] Al Musaimi, O.; Basso, A.; de la Torre, B. G.; Albericio, F. *ACS Comb. Sci.* **2019**, *21* (11), 717–721.
[496] Grun, J.; Revell, J. D.; Conza, M.; Wennemers, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (18), 6197–6201.

également les sous-produits hautement réactifs qui peuvent provoquer des réactions secondaires, comme le dibenzofulvène (DBF).[497]

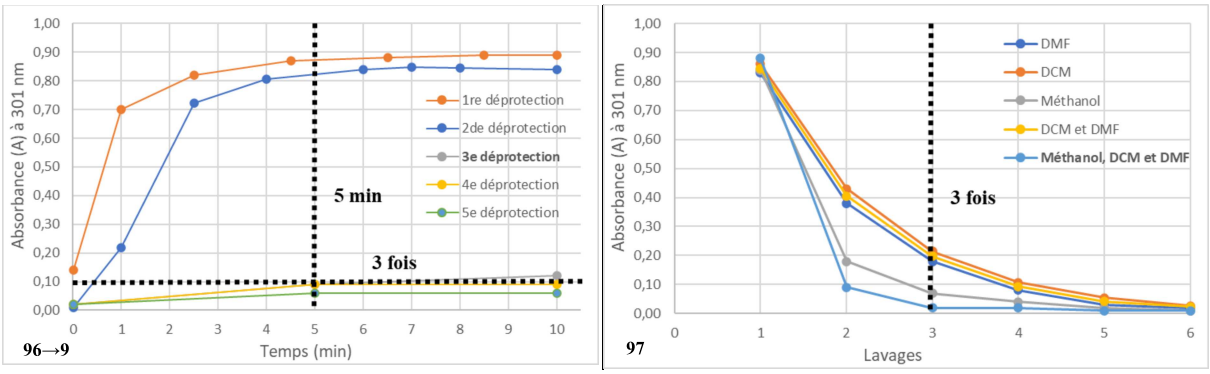


Figure 30 : Cinétique de déprotection Fmoc au 4-Mepip (à gauche) et optimisation des lavages (à droite).

D'après la figure 30, la déprotection Fmoc optimale de la résine **96** est atteinte après 3 fois 5 min.

D'après Barlos *et al*, la résine 2-Cl-Trt est stable durant les lavages au DMF, DCM, *N,N*-diméthylacétamide (DMA), 1,2-dichloroéthane (DCE), 2-propanol ou méthanol.[493] Après la déprotection, la résine est filtrée, puis lavée par le DMF (3 fois) pendant 1 à 5 min. L'optimisation des lavages a montré sur la figure 30 qu'un lavage par le méthanol (3 fois), puis le reconditionnement par DCM (3 fois) et DMF (3 fois) conduit à de meilleurs rendements et diminue les impuretés. Cette diminution d'impuretés n'a été possible quand ajoutant le lavage au méthanol (x3) et un reconditionnement (DCM x3, DMF x3) de la résine entre chaque couplage. En effet, l'utilisation de méthanol permet de diminuer le maillage de la résine et de contracter la résine.[491] Cet effet de contraction essore efficacement la résine des réactifs. Cet essorage élimine donc les réactifs et la possibilité de réaction parasite à chaque étape. De plus, une utilisation prolongée du solvant DMF lors des étapes de réaction diminue le maillage de la résine.[491] Un gonflement de la résine par 3 lavages au DCM permet d'éviter la diminution de la diffusion aux sites actifs de la résine en réajustant la taille du maillage au maximum. L'effet de contraction, puis de gonflement de la résine peut être rapide et provoquer un stress osmotique important.[498] Ce stress osmotique peut conduire à une rupture de la résine et à la perte du peptide dans les lavages. Ces lavages doivent donc être réalisés doucement et lentement. Un temps de gonflement suffisamment long peut éviter ce problème. Durant la synthèse de la séquence peptidique fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **109**, nous n'avons pas rencontré ce problème avec des temps de pause en lavage de 1 à 5 min et une agitation orbitale (par plaque désaxée) avec une vitesse lente autour des 100 rpm.

[497] García Castañeda, J. E.; Vergel Galeano, C. F.; Rivera Monroy, Z. J.; Rosas Pérez, J. E. *J. Mex. Chem. Soc.* **2017**, *58* (4), 386–392.
[498] Al Musaimi, O.; El-Faham, A.; Almarhoon, Z.; Basso, A.; de la Torre, B. G.; Albericio, F. *Polymers* **2019**, *11* (5), 874–887.

Après la déprotection de Fmoc, un groupement amine libre est disponible, et le couplage d'un deuxième acide aminé peut être couplé pour donner la résine **98**. Cet acide aminé protégé par un Fmoc en N-terminal (4 equiv par rapport à la résine) est introduit (Schéma 82 *(v)*) en présence de l'agent de couplage hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthylaminium (HBTU) à 4 equiv, de l'additif 2-cyano-2-(hydroxyimino)acétate d'éthyle (OxymaPure) à 4 equiv, de la base *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) à 8 equiv, solubilisé dans le DMF pendant 1 à 2 h.[499,487] L'agent de couplage sert à activer le groupe carboxylique de l'acide aminé à coupler, tandis que l'additif sert à éviter les racémisations des acides aminés et augmente l'efficacité des couplages.[500] D'après Barlos *et al*, l'1-hydroxybenzotriazole (HOBt) ou ses dérivés, peut entrainer la perte de peptide durant la synthèse par clivage de la résine.[493] Cet additif est souvent remplacé par l'OxymaPure.[501] L'utilisation de l'OxymaPure doit donc être privilégiée. La réaction de couplage peptidique a été suivie par les tests Kaiser et TNBS, ainsi que par le protocole de mesure du chargement de la résine par spectrométrie UV-Visible. Le meilleur rendement a été obtenu en augmentant la DIPEA à 10 équivalents et le temps de couplage à 2 h. Une nouvelle étape de lavage est alors nécessaire pour éliminer les agents de couplage et l'acide aminé n'ayant pas réagi. Ces réactifs ne peuvent pas réagir avec le 4-Mepip de l'étape de déprotection. De plus, la réaction de déprotection est réalisée en moins de 5 min. Ces deux facteurs limitent les possibilités de couplage parasite si un mauvais lavage est réalisé à cette étape. Un lavage moins stressant pour la résine (sans utiliser de méthanol) est donc réalisé à l'aide du DCM (x3), puis du DMF (x3). Durant cette étape de lavage, la résine **98** n'est que regonflée par le DCM, puis le solvant est juste échangé par le DMF sans essorage limitant les risques de rupture de la résine, mais cela limite l'élimination des réactifs aux cœurs du maillage polymérique.[491]

Les étapes de déprotection Fmoc (Schéma 82 *(iv)*), de lavages, de couplage (Schéma 82 *(v)*) d'acide aminé et de lavages ont été répétées (illustrées par le cycle du schéma 82). À chaque étape, elles sont contrôlées par les tests Kaiser et TNBS, ainsi que la spectrométrie UV/visible et spectrométrie de masse (LC-MS). Chaque étape de couplage a permis d'introduire séquentiellement la glycine (L-Gly ou G), la valine (L-Val ou V), l'alanine (L-Ala ou A), le tryptophane (L-Trp(Boc) ou W(Boc)), la glutamine (L-Gln(Trt) ou Q(Trt)) et la phénylalanine (D-Phe ou f). Tous ces acides aminés sont de configuration naturel L (noté en majuscule dans le schéma 82) sauf la phénylalanine (noté en minuscule dans le schéma 82).

Toutes ces étapes ont été suivies par spectrométrie UV-visible. Les rendements sont généralement très bons au début avec 99%, mais diminuent régulièrement avec l'augmentation de la longueur du peptide (Schéma 82). Ainsi les trois premiers acides aminés [H(Trt) **96**, G **98**, V **100**] ont été ajoutés avec des rendements de 99%. Le quatrième (A **102**), le sixième (Q(Trt) **106**) et le septième (f **108**) acides aminés ont été ajoutés avec un rendement de 95%. Enfin, le cinquième acide aminé [W(Boc) **104**)] a été ajouté avec un rendement de 93%. Ainsi, la

[499] Nock, B.; Kaloudi, A.; Lymperis, E.; Giarika, A.; Bergsma, H.; Mueller, D.; Krenning, E.; Jong, M. de; Maina, T.; Baum, R. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57* (2), 583–583.
[500] Manne, S. R.; Torre, B. G. de la; El-Faham, A.; Albericio, F. *Synthesis* **2020**, *52* (21), 3189–3210.
[501] Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15* (37), 9394–9403.

séquence peptidique **109** a été obtenue avec un rendement total de 76% (répétition n = 2), soit un gain de 1,6 fois comparé au rendement sans optimisation de 49%. En effet, les derniers acides aminés peuvent nécessiter de doubler le temps de réaction pour les étapes de couplages, et d'augmenter la quantité de base DIPEA à 10 équivalents. Si l'étape de couplage à un rendement inférieur à 90%, elle est refaite systématiquement pour s'assurer que le rendement maximal soit atteint. Bien que l'augmentation du rendement (x1,6) soit peu importante, la pureté du peptide **109** a été augmentée de manière non négligeable (d'après l'analyse LC-MS de la figure 31 après clivage).

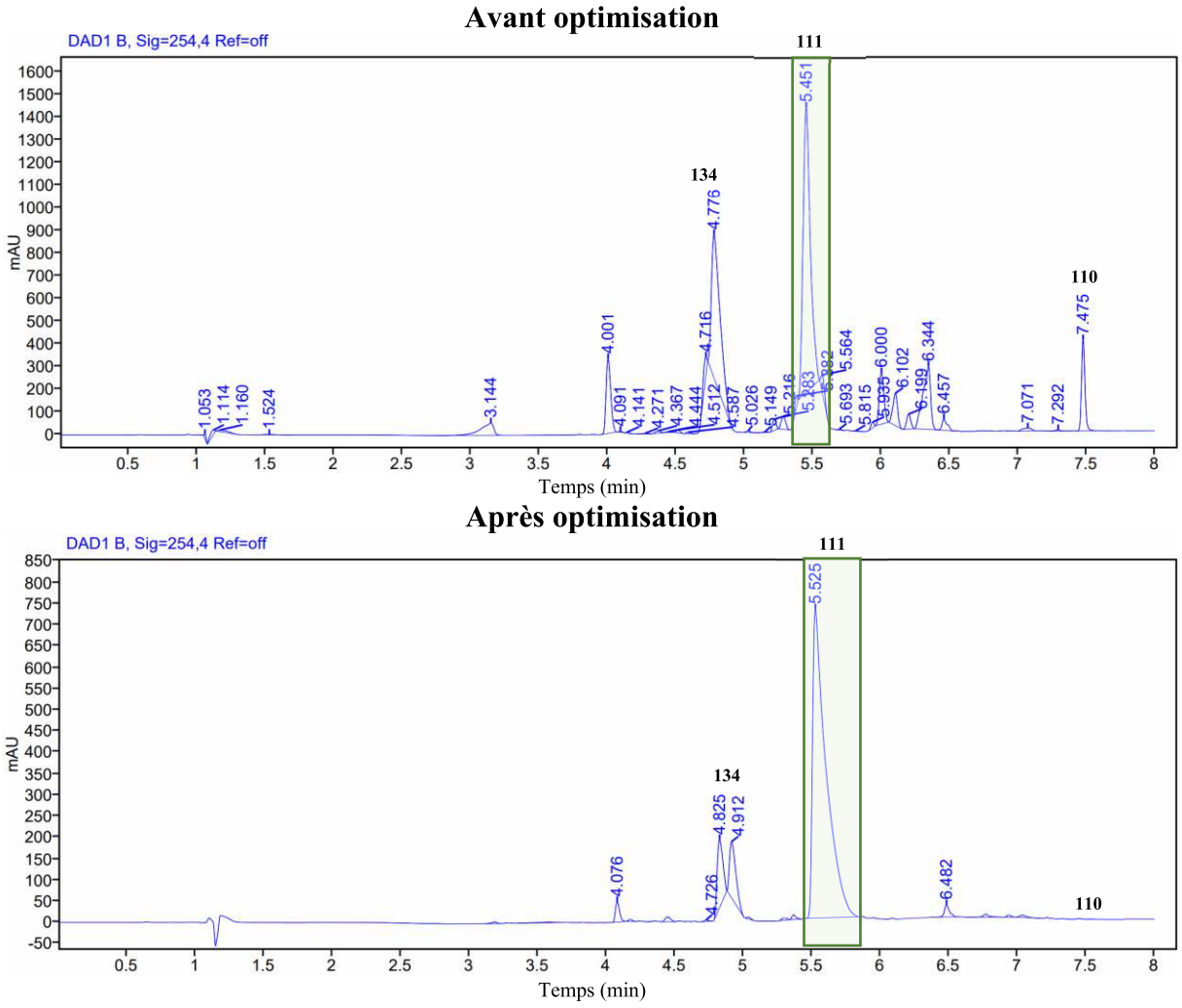


*Figure 31 : Comparaison des protocoles sur la pureté de la séquence peptidique fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **109** après clivage sans traitements.*

Un contrôle par LC-MS peut être réalisé après clivage du peptide **109** (Figure 32). Le mélange utilisé et son optimisation seront l'objet de la partie 1.2.2.

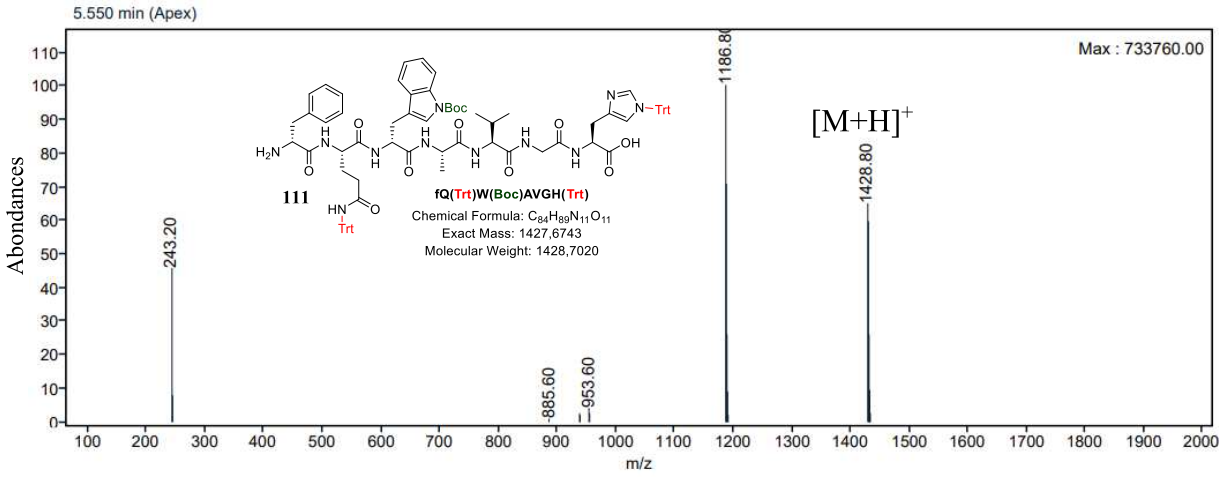


*Figure 32 : Analyse de masse ESI⁺ (LC-MS) de la séquence peptidique clivée fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **111**.*

La séquence peptidique fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **109** après lavage peut être directement utilisée pour accroître la séquence en N-terminal en SPPS ou subir 5 étapes supplémentaires [clivage, couplage en C-terminal, déprotection des groupes protecteurs Trt et Boc, traitements et/ou purification]. Ces étapes supplémentaires seront abordées dans la suite de ce chapitre.

C. Fonctionnalisation de la séquence peptidique fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) par PEG_n

1. Couplage directe du PEG_n sur le peptide fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) avec n = 8, 12, 24 et 36

Dans la littérature, à notre connaissance, seulement deux exemples de couplage direct en SPPS ont été décrits entre un dérivé de la bombésine et un PEG_n. En 2017, Simpson *et al* ont couplé en SPPS la [D-Phe^{6},β-Ala^{11},Phe^{13},Nle^{14}]bombésine(6-14) (noté pan-bombésine) avec le PEG_7-CO_2H en présence de HCTU (un dérivé de HBTU) et DIPEA dans le DMF pendant une nuit avec un rendement de 65%.[502] Leur produit est obtenu après clivage TFA/TIPS/H_2O (v/v/v, 95/2,5/2,5) avec un rendement de 6%. En 2021, Handula *et al* publient les résultats de notre laboratoire sur le couplage entre le peptide **109** et le Boc-NH-$dPEG_3$-CO_2H en présence de HBTU, d'OxymaPure et de DIPEA dans le DMF pendant 2 h. Leur produit est obtenu après clivage TFA/TIPS/H_2O (v/v/v, 95/2.5/2.5) avec un rendement de 3%.[487]

Suivant les travaux précédents du laboratoire, la suite de la synthèse des peptides **124**, **125**, **126** et **127** se poursuit par l'introduction du PEG_n de différentes longueurs (n = 8, 12, 24 ou 36). Les seules conditions de couplages de PEG_n qui ont été tentées était un couplage

[502] Simpson, E. J.; Gobbo, P.; Bononi, F. C.; Murrell, E.; Workentin, M. S.; Luyt, L. G. *J. Interdiscip. Nanomed.* **2017**, *2* (4), 174–187.

peptidique en SPPS entre le peptide **109** et le PEG_n (n = 4, 8 ou 12). Ce couplage a été réalisé en présence de HBTU, d'OxymaPure et de DIPEA dans le DMF suivant les mêmes concentrations et nombres d'équivalent que la synthèse de la séquence peptidique fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **109** précédemment décrite.[487] Ces conditions ont fait leurs preuves sur d'autres peptides pour obtenir des peptides fonctionnalisés par un TCO et un PEG_n.[503,504,505,506,507] Ces conditions ont donné respectivement des rendements de 13% (**112**), 3% (**113**), 0% (**114**) et 0% (**115**). Les peptides **124** et **125** (n = 8 et 12) ont déjà été obtenus. Le but de ces travaux est de réussir à obtenir les chaines de longueurs (n = 24 et 36).

1.1. En SPPS

1.1.1. Sans activation

L'introduction du PEG_n de différentes longueurs (n = 8, 12, 24 et 36) a d'abord été répétée suivant ces conditions. Les peptides porteurs d'un PEG_n **112** et **113** avec n = 8 et 12 ont été obtenus après couplage peptidique au HBTU (4 equiv.), OxymaPure (4 equiv.) et DIPEA (8 equiv.) dans le DMF pendant 2 h avec respectivement des rendements de 11% et 10%. Le suivi de la réaction par les tests Kaisers et TNBS ont donné respectivement des billes incolores et jaune claires typiques d'amines protégées. Le suivi spectrométrique UV-visible n'étant pas possible en raison de l'absence de Fmoc à déprotéger, la confirmation a été réalisée par l'analyse LC-MS après clivage de la résine par 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) à 20%. Les peptides **112** et **113** de n = 8 et 12 ont été observés en LC-MS. Le même protocole a été appliqué aux peptides **114** et **115** avec n = 24 et 36. Cependant, ces peptides **114** et **115** n'ont pas été observées. Ces analyses ont révélé la présence d'impuretés en grandes quantités. Ces résultats ont confirmé les résultats obtenus précédemment dans le laboratoire. Dans la littérature, la présence de couplage indésirables a déjà été mentionnée lors de couplage d'un PEG_n avec des résidus histidine (H).[520]

Entrée	Équivalents					Temps (h)	Rendement (%)			
	PEG_n	HBTU	OxymaPure	NHS	DIPEA		112	113	114	115
1	1	4	4	0	8	2	11	10	0	0
2	1	6	6	0	20	2	16	14	2	1
3	1	4	4	4	8	2	25	23	2	1
4	4	4	4	4	8	2	55	41	3	2
5	**4**	**8**	**33**	**8**	**75**	**10**	**99**	**99**	**5**	**4**

Tableau 26 : Réaction de couplage des PEG_n en SPPS avec différentes quantités d'agents de couplages.

[503] Co, C. M.; Izuagbe, S.; Zhou, J.; Zhou, N.; Sun, X.; Borrelli, J.; Tang, L. *Regen. Biomater.* **2021**, *8* (3), 1–11.
[504] Juen, L.; Gely, C.; Huet, E. WO2022018371A1, **2022**.
[505] Otaru, S.; Paulus, A.; Imlimthan, S.; Kuurne, I.; Virtanen, H.; Liljenbäck, H.; Tolvanen, T.; Auchynnikava, T.; Roivainen, A.; Helariutta, K.; Sarparanta, M.; Airaksinen, A. J. *Bioconjugate Chem.* **2022**, *33* (7), 1393–1404.
[506] Chang, T.-W.; Chu, H.-M.; Lin, C.-J.; Lin, C.-Y. US9994638B2, **2018**.
[507] Yang, Y. WO2022037665A1, **2022**.

Pour améliorer la réactivité des PEG_n, un changement du nombre d'équivalent des réactifs a d'abord été tenté. D'abord une augmentation de la quantité d'agent de couplage puis de base dans le mélange PEG_n/HBTU/OxymaPure/DIPEA (1/6/6/20) pour les peptides **112**, **113**, **114** et **115** avec n = 8, 12, 24 et 36 a conduit à des rendements de 16%, 14%, 2% et 1% (Tableau 26 entrée 1). L'augmentation de la quantité de réactifs a légèrement amélioré les rendements pour les peptides **112** et **113** et a permis la détection des peptides **114** et **115** (Tableau 26 entrée 2). D'après Jo *et al*, et Anderson *et al*, l'activation des PEG_n par NHS peut aider certains couplages difficiles.[508,509,510] En effet, le NHS réagit avec les acides carboxyliques pour former des esters dont le groupement NHS est bien meilleur groupement partant que celui de départ. Dans la littérature, les dérivés de bombésine ont déjà été fonctionnalisés par un PEG_n majoritairement en utilisant NHS.[511,512] L'ajout de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) a donc été testé one-pot pour un ratio PEG_n/HBTU/OxymaPure/NHS/DIPEA (1/4/4/4/8) donnant respectivement des rendements de 25%, 23%, 2% et 1% (Tableau 26 entrée 3). Ensuite, l'augmentation de la quantité de PEG_n et du temps de réaction à 10 h a permis d'améliorer les rendements à 99% pour former les deux PEG_n **112** et **113** de faibles longueurs (n = 8 et 12) (Tableau 26 entrée 5). La synthèse optimisée est décrite dans le schéma 83.

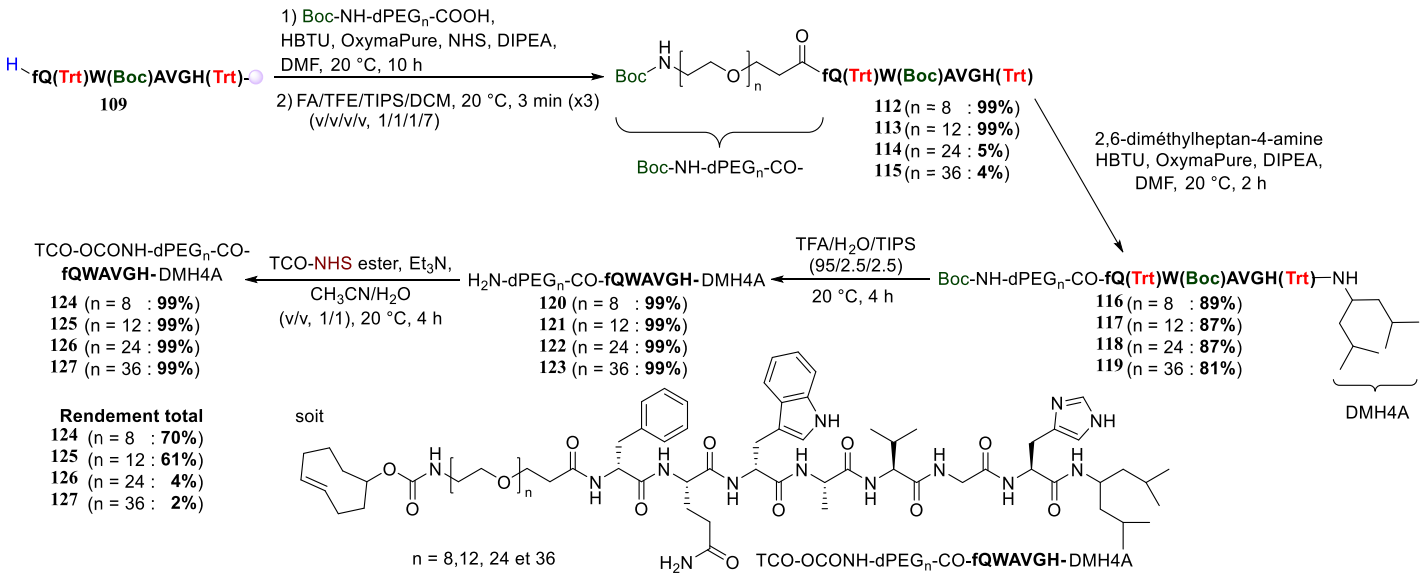


*Schéma 83 : Synthèse des peptides **124**, **125**, **126** et **127** par couplage peptidique en SPPS.*

[508] Jo, S.; Engel, P. S.; Mikos, A. G. *Polymer* **2000**, *41* (21), 7595–7604.
[509] Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (19), 3039–3039.
[510] Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (9), 1839–1842.
[511] Däpp, S.; Garayoa, E. G.; Maes, V.; Brans, L.; Tourwé, D. A.; Müller, C.; Schibli, R. *Nucl. Med. Biol.* **2011**, *38* (7), 997–1009.
[512] Yang, Y.; Neef, T.; Mittelholzer, C.; Garcia Garayoa, E.; Bläuenstein, P.; Schibli, R.; Aebi, U.; Burkhard, P. *J. Nanobiotechnology* **2013**, *11* (1), 36–46.

Cependant, ces conditions ne donnent que de faibles rendements (<5%) pour les peptides **114** et **115** pour n = 24 et 36. Le temps de réaction a été augmenté (Tableau 27).

Entrée	Temps (h)	Rendement (%) en 114
1	2	2
2	**10**	**5**
3	22	3
4	46	1

Tableau 27 : Réaction de couplage des PEG_n en SPPS à différents temps.

D'après le tableau 27, l'augmentation du temps à 22 h, puis 46 h a conduit respectivement à un rendement de 3% et 1% en peptide **114** (Tableau 27). Avec un temps plus long de réaction, les impuretés observées en LC-MS augmentent. Dans la littérature, beaucoup d'agents de couplages existent et peuvent être plus ou moins adaptés suivant les substrats et le produit attendu.[513,514,515,516] Nous avons choisi de tester les plus populaires (Schéma 84) pour améliorer la cinétique de la réaction tels que le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), l'hydrochlorure de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide (EDC.HCl), le *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC), l'hexafluorophosphate de 2-(7-aza-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium (HATU), le tétrafluoroborate de 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium (TBTU) ou le tétrafluoroborate de 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthylisouronium (TSTU) ; en présence d'additifs tels que l'OxymaPure, l'1-hydroxybenzotriazole (HOBt) ou le *N*-hydroxysuccinimide (NHS). Des rendements plafonnés toujours trop faibles entre 1 et 4% ont été obtenu pour le peptide **114** (résultats non présentés).

[513] Han, S.-Y.; Kim, Y.-A. *Tetrahedron* **2004**, *60* (11), 2447–2467.
[514] Hachmann, J.; Lebl, M. *Peptide Sci.* **2006**, *84* (3), 340–347.
[515] El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (11), 6557–6602.
[516] Al-Warhi, T. I.; Al-Hazimi, H. M. A.; El-Faham, A. *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, *16* (2), 97–116.

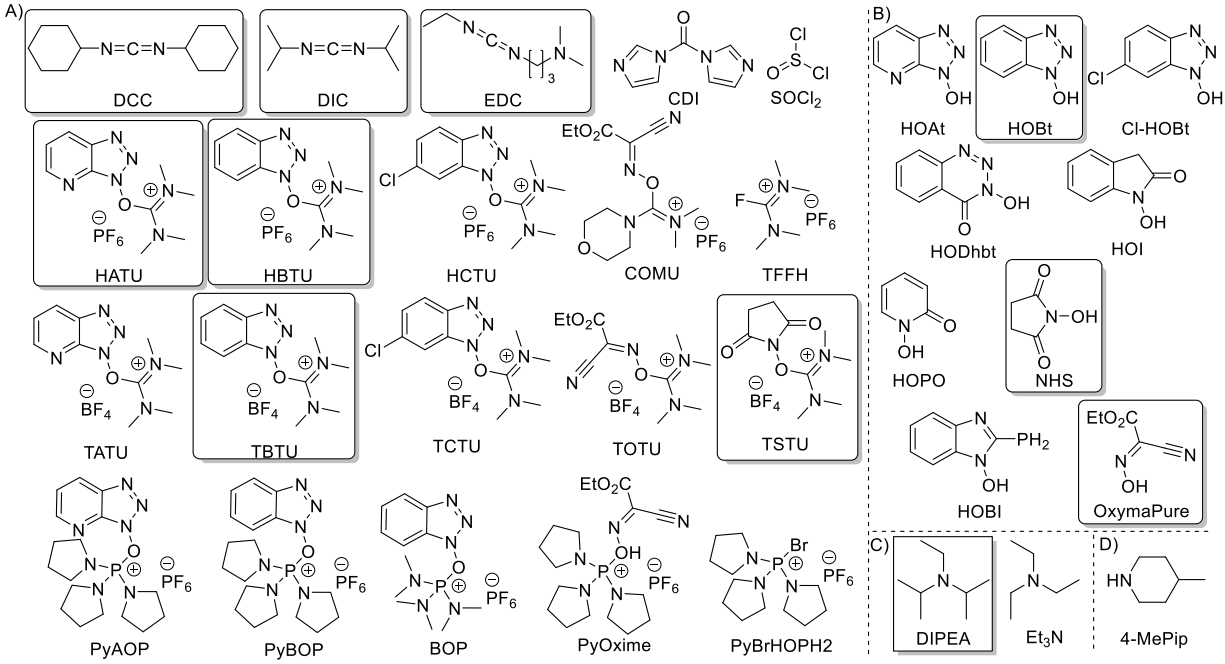


Schéma 84 : Principaux agents de couplage (A), additifs (B) et bases (C) utilisés pour la synthèse peptidique en phase solide (SPPS) après déprotection Fmoc des acides aminés par la 4-méthylpipéridine (D).[513,514,515,516]

Les peptides synthétisés sur résine **112**, **113**, **114** et **115** ont ensuite été clivés de la résine suivant le protocole développé dans les précédents travaux du laboratoire.[487] Le clivage a été réalisé en présence de HFIP à 20% dans le DMF pendant 1 h. Après précipitation et multiples lavages par Et_2O à-20 °C, les rendements précédents sur les deux étapes (couplage puis clivage) de 99%, 99%, 5% et 4% (Schéma 83) ont été déterminés pour les peptides **112**, **113**, **114** et **115.** Ces rendements sont influencés par cette étape de clivage, le nombre de lavages et la précipitation du produit. En effet, de multiples sous-produits correspondant à la perte d'un ou de plusieurs groupements protecteurs (Trt ou Boc) peuvent être observés lors du clivage.[493] De plus, nous avons observé que le peptide précipite moins avec l'augmentation de la longueur de la chaine PEG_n. Nous avons choisi d'optimiser ce clivage pour s'affranchir de ces problèmes. Cette optimisation a été d'abord réalisée sur le peptide **109** et fera l'objet spécifiquement de la partie « 1.2.2.Optimisation du cocktail de clivage » (page 204).

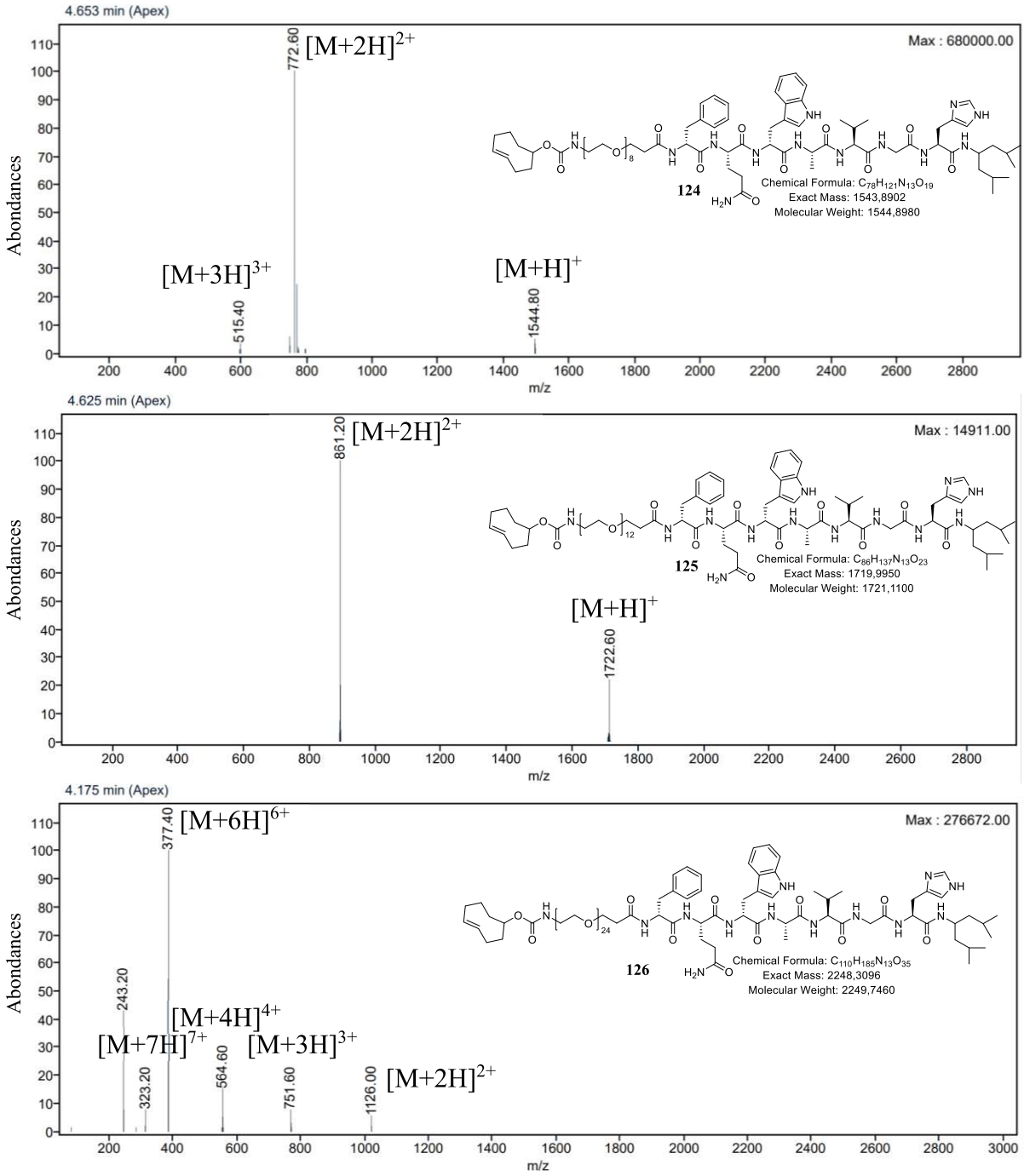
Les peptides porteurs d'un PEG_n **112**, **113**, **114** et **115** ont été ensuite fonctionnalisés en C-terminal par couplage peptidique en solution avec le 2,6-diméthylheptan-4-amine (noté DMH4A). Cette amidation avec le 2,6-diméthylheptan-4-amine permet de limiter la dégradation enzymatique du peptide en le rendant plus stable *in vitro* et *in vivo*.[499] Ce couplage a été fait dans les mêmes conditions que précédément.[487] Ainsi, ce couplage est refait sans optimisation en présence de HBTU, OxymaPure et DIPEA dans le DMF pendant 2 h avec un rendement de 89%, 87%, 87% et 81% en peptides **116**, **117**, **118** et **119**.

Les peptides fonctionnalisés par DMH4A **116**, **117**, **118** et **119** ont été ensuite totalement déprotégés par un mélange à base d'acide trifluoroacétique (TFA) couramment utilisé dans la

littérature.[487,488,489] Ainsi, le mélange TFA/TIPS/H_2O (v/v/v, 95/2.5/2.5) réagit pendant 4 h, les peptides **120**, **121**, **122** et **123** obtenus quantitativement ont été précipités avec de l'Et_2O froid, puis caractérisés en LC-MS après centrifugation. Dans ce mélange, les peptides obtenus ont leurs chaines latérales totalement déprotégés des groupements Trt et Boc. Pour éviter des réactions secondaires, le triisopropylsilyle (TIPS) est encore utilisé pour piéger les espèces réactives.[517] Les peptides **120**, **121**, **122** et **123** ont ensuite été purifiés par HPLC préparative avec un éluant H_2O/CH_3CN/FA 0,1%.[487] L'acide formique (FA), l'acide acétique (AcOH) ou l'acide trifluoroacétique (TFA) peuvent être utilisé pour l'élution des peptides **120**, **121**, **122** et **123**. L'absence d'acide ne permet pas l'élution de ces peptides tandis que l'ajout de base élue ces peptides sous forme d'une trainée le long de la ligne de base. La méthode de purification HPLC a été optimisée pour chaque peptide **120**, **121**, **122** et **123**. La purification par HPLC en phase inverse a donné de faibles rendements de l'ordre de 10-25%.

L'étape suivante correspond à l'introduction du *trans*-cyclooctène (TCO). Cependant, le TCO s'isomérise en présence d'acide en *cis*-cyclooctène (CCO), une espèce beaucoup moins réactive pour l'IEDDA avec les tétrazines.[518,519] Les peptides **120**, **121**, **122** et **123** ont été donc traités pour éliminer les traces d'acide restant de la déprotection de Trt et de Boc. Même si l'éluant a été éliminé par lyophilisation, la concentration d'acide restante (pH < 2) est encore trop importante pour le couplage du TCO. Un dépôt sur une cartouche C18 de type Water Sep-Pak® Vac 3cc, puis le lavage de la cartouche par de l'eau permet de neutraliser l'acide. Le lavage par une solution aqueuse contenant une base élue partiellement le peptide, et n'est donc pas recommandée. Le mélange CH_3CN/H_2O (v/v, 1/1) a alors permis d'éluer faiblement les peptides **120**, **121**, **122** et **123**. L'élution a été optimisée par l'utilisation de méthanol. Cette étape par Sep-Pak® reste limitante avec des pertes importantes de peptides **120**, **121**, **122** et **123** conduisant à de faibles rendements de l'ordre de 40%. D'autres techniques de purification (HPLC d'échange d'ion, d'exclusion stérique, dialyse, ultrafiltration ou filtration sur gel) pourraient être envisagées comme alternative.[520,521] Les peptides ont réagi dans les conditions précédemment développées au laboratoire.[487] Ainsi, la réaction avec le TCO activé par le NHS est faite quantitativement en présence de Et_3N dans un mélange de CH_3CN et de H_2O (v/v, 1/1) pendant 4 h. Les peptides **124**, **125**, **126** et **127** (n = 8, 12, 24 et 36) ont été analysés en LC-MS (Figure 33).

[517] Pearson, D. A.; Blanchette, M.; Baker, M. L.; Guindon, C. A. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30* (21), 2739–2742.
[518] Béquignat, J.-B.; Ty, N.; Rondon, A.; Taiariol, L.; Degoul, F.; Canitrot, D.; Quintana, M.; Navarro-Teulon, I.; Miot-Noirault, E.; Boucheix, C.; Chezal, J.-M.; Moreau, E. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *203* (1), 112574–112584.
[519] Darko, A.; Wallace, S.; Dmitrenko, O.; Machovina, M. M.; Mehl, R. A.; Chin, J. W.; Fox, J. M. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (10), 3770–3776.
[520] Morpurgo, M.; Veronese, F. M. *In Bioconjugation Protocols: Strategies and Methods*; Niemeyer, C. M., Ed.; *Methods mol. biol.*, Humana Press: Totowa, NJ, **2004**, 45–70.
[521] Mant, C. T.; Chen, Y.; Yan, Z.; Popa, T. V.; Kovacs, J. M.; Mills, J. B.; Tripet, B. P.; Hodges, R. S. *In Peptide Characterization and Application Protocols*; Fields, G. B., Ed.; *Methods mol. biol.*, Humana Press: Totowa, NJ, **2007**, 3–55.


4.653 min (Apex)
Max : 680000.00
772.60
[M+2H]2+
[M+3H]3+
515.40
[M+H]+
1544.80
Abondances
m/z
124
Chemical Formula: C78H121N13O19
Exact Mass: 1543,8902
Molecular Weight: 1544,8980
4.625 min (Apex)
Max : 14911.00
861.20
[M+2H]2+
[M+H]+
1722.60
125
Chemical Formula: C86H137N13O23
Exact Mass: 1719,9950
Molecular Weight: 1721,1100
4.175 min (Apex)
Max : 276672.00
377.40
[M+6H]6+
243.20
[M+4H]4+
[M+7H]7+
[M+3H]3+
323.20
564.60
751.60
1126.00
[M+2H]2+
126
Chemical Formula: C110H185N13O35
Exact Mass: 2248,3096
Molecular Weight: 2249,7460

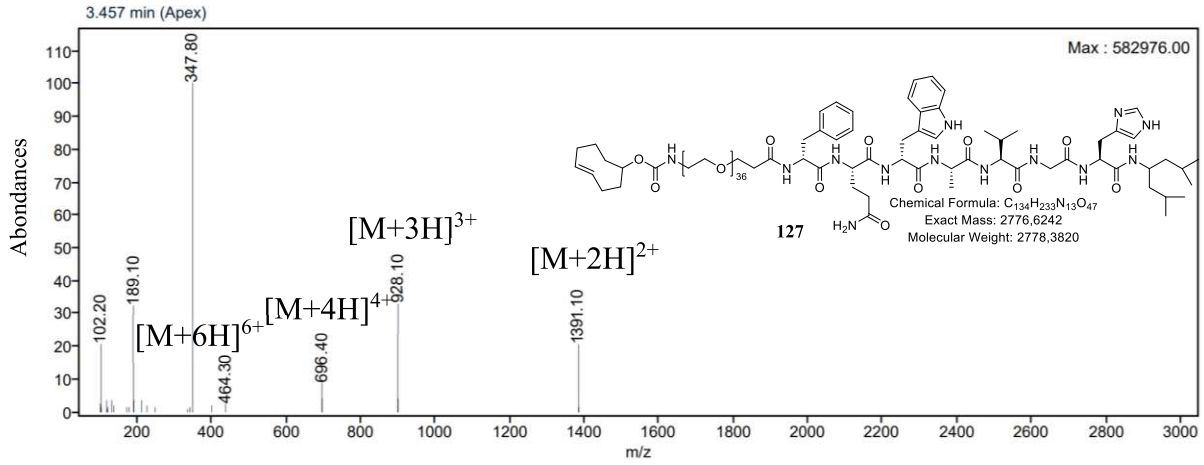


*Figure 33 : Analyses LC-MS (ESI+) des peptides **124**, **125**, **126** et **127** avec n = 8, 12, 2 et 36.*

Les peptides **124**, **125**, **126** et **127** ont été purifiés en HPLC préparative avec des pertes importantes sur colonne conduisant à des rendements de l'ordre de 1-5%. D'abord, le mélange d'injection a été optimisé selon un ratio CH_3CN/H_2O (v/v, 75/25) pour éviter la précipitation de ces peptides avant injection. Cependant plus la chaine PEG_n est longue, plus le temps avant que ces peptides précipitent par floconnation est court. Un ajout de 0,1% d'acide (FA, AcOH ou TFA) ou de base (DIPEA, Et_3N ou ammonium formique) au mélange d'injection et à l'éluant a permis de limiter ce problème. Seuls les éluants comportant de l'acide ont permis d'observer les produits attendus **124**, **125**, **126** et **127**. Cependant un pourcentage de 0,01% de TFA donne un pH de 3-4 suffisant pour isomériser le TCO en CCO. L'acide formique à 0,01% a donné un pH de 5-6 limitant au mieux l'isomérisation du TCO en CCO et donnant la meilleure élution avec des rendements de l'ordre de 10%.

En résumé, plusieurs problèmes importants sont présents dans la synthèses des peptides **124**, **125**, **126** et **127**. D'abord, les rendements de couplage des PEG_n sont bien trop faibles en SPPS (4-5%) pour les peptides **122** et **123**. Ensuite, les étapes de purifications ultérieures des peptides **120**, **121**, **122** et **123** ont des rendements bien trop faibles par Sep-Pak® (40-55%) et HPLC (10-25%). Les quantités obtenues de peptides **126** et **127** pour n = 24 et 36 correspondantes ont été bien trop faibles pour être utilisables pour la suite du projet.

1.1.2. Avec activation

Nous avons choisi de commencer par résoudre les problèmes des faibles rendements de couplages avec les PEG_n afin d'obtenir suffisamment de matière pour pouvoir améliorer les étapes de traitements et de purifications. Nous avons émis l'hypothèse que les PEG_n souffraient d'un manque de réactivité dans les synthèses SPPS. Pour améliorer cet aspect, l'une des stratégies est de diminuer la barrière d'activation de la réaction de couplage.

Dans la littérature, les dérivés de bombésine ont déjà été fonctionnalisés par un PEG_n. Certains ont nécessité une réaction de couplage avec une activation préalable du PEG_n utilisant NHS.[511,512] Ainsi, Däpp *et al* en 2011 décrivent l'utilisation de MeO-dPEG_n-NHS commerciale (n = 112, 226 et 453) dans le borate de sodium (Borax, $Na_2B_4O_7$) pour fonctionnaliser le Lys-BBN à 20 °C pendant 1 h avec des rendements respectivement de 85%, 74% et 46%. En 2013, Yang *et al* remplace le Borax de cette réaction en utilisant le MeO-dPEG_n-NHS (n = 22) dans le phosphate de sodium (Na_3PO_4) à pH 7,5 avec un rendement estimé de 30-50%.[512] Ces auteurs purifient leurs produits PEG_n-P6c-BBN par dialyse. L'étape de couplage avec le PEG_n ayant le plus faible rendement (n = 36) a donc été refaite après avoir préalablement activé le PEG_{36} avec trois bons groupements partants couramment utilisés pour cela (NHS, TFP et Cl) en SPPS.

a) Activation NHS

Lors de l'étape de couplage PEG_n précédemment décrite (Schéma 83 étape 1), un ajout de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) one-pot a conduit à un rendement de 4% (**115**).[508,509,510] Nous avons émis l'hypothèse que la formation de l'intermédiaire **129** généré *in situ* dans ces conditions n'avait pas le temps de se faire ce qui expliquerait la faible augmentation de rendement constatée. Pour résoudre ce problème, un PEG_n modèle, ici le PEG_{36}, a été choisi pour être pré-activé avant le couplage à la résine pour former l'intermédiaire **129**.

Plus d'une dizaine d'article ont déjà décrit la pré-activation de PEG_n de différentes longueurs par le NHS.[480,520,522,523,524,525,526,527,528,529] Parmi ces articles, seuls Chen *et al*[480] et Stasiuk *et al*[528] utilisent un PEG_n-NHS (M_w > 3000 g/mol) pendant un couplage peptidique SPPS. Nous avons donc adapté leurs protocoles en tenant compte des protocoles déjà présent pour les dérivés de bombésine.[511,512] Ainsi, l'étape d'activation de PEG_{36} avec le NHS et son couplage peptidique avec le peptide **109** après optimisation sont présentés dans le schéma 85.

[522] Chen, X.; Sievers, E.; Hou, Y.; Park, R.; Tohme, M.; Bart, R.; Bremner, R.; Bading, J. R.; Conti, P. S. *Neoplasia* **2005**, *7* (3), 271–279.
[523] Karathanasis, E.; Ayyagari, A. L.; Bhavane, R.; Bellamkonda, R. V.; Annapragada, A. V. *J. Control. Release* **2005**, *103* (1), 159–175.
[524] Tomlinson, I. D.; Warnerment, M. R.; Mason, J. N.; Vergne, M. J.; Hercules, D. M.; Blakely, R. D.; Rosenthal, S. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (20), 5656–5660.
[525] Almutairi, A.; Rossin, R.; Shokeen, M.; Hagooly, A.; Ananth, A.; Capoccia, B.; Guillaudeu, S.; Abendschein, D.; Anderson, C. J.; Welch, M. J.; Fréchet, J. M. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (3), 685–690.
[526] Wang, Y.; Wang, Y.; Xiang, J.; Yao, K. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (12), 3531–3538.
[527] Chan, D. P. Y.; Owen, S. C.; Shoichet, M. S. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24* (1), 105–113.
[528] Stasiuk, G. J.; Holloway, P. M.; Rivas, C.; Trigg, W.; Luthra, S. K.; Iveson, V. M.; Gavins, F. N. E.; Long, N. J. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (11), 4986–4993.
[529] Kuruvilla, S. P.; Tiruchinapally, G.; Kaushal, N.; ElSayed, M. E. H. *Int. J. Pharm.* **2018**, *545* (1), 27–36.

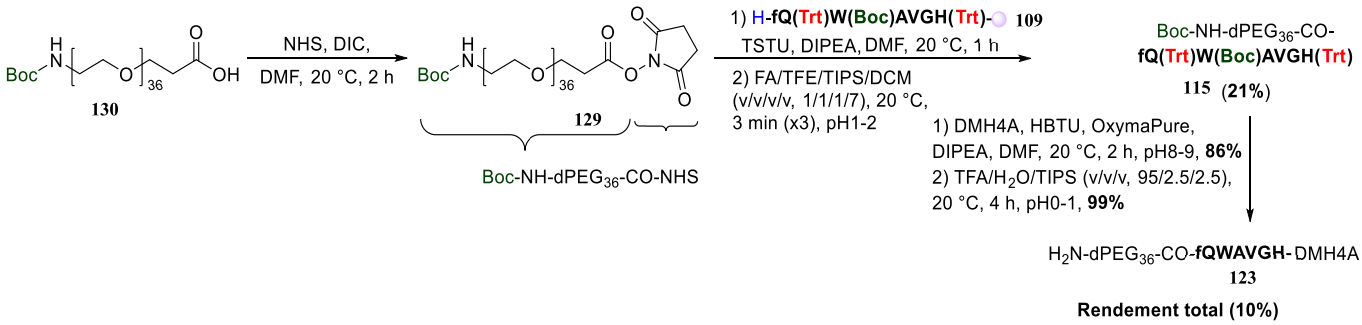


Schéma 85 : Pré-activation du PEG$_{36}$ par le NHS.

L'activation du PEG$_{36}$ est faite par le *N*-hydroxysuccinimide (NHS), en présence de l'agent de couplage *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC) dans le DMF pendant 2 h avec un rendement estimée par LC-MS de 98%. Le Boc-dPEG$_{36}$-NHS **129** a ensuite réagit dans le DMF pendant 2 h. Le produit **115** est clivé de la résine avec d'un mélange FA/TFE/TIPS/DCM pendant 3 min répété 3 fois. Le rendement obtenu après ces deux étapes est de 1% (Tableau 28 entrée 1). En 2015, Stasiuk *et al* ajoutent l'EDC.HCl durant leur couplage avec le PEG$_n$-NHS (n = 64) pour obtenir des rendements de 29%.[528] En 2018, Kuruvilla *et al* adapte ce protocole pour le PEG$_n$-NHS (n = 44) avec un rendement de 90%.[529] Ces résultats sont étonnants puisque l'acide carboxylique est déjà activé par le NHS et n'est plus disponible pour réagir avec l'agent de couplage. Suivant leurs protocoles, un rendement de 1% a été obtenu (Tableau 28 entrée 2). Bien que le protocole ne soit pas standard, nous avons choisi de poursuivre cette stratégie d'activation en utilisant le HBTU (4 equiv.), l'OxymaPure (4 equiv.) et le DIPEA (8 equiv.). Le rendement obtenu est de 13% (Tableau 28 entrée 3). Le couplage peptique a été aussi réalisé avec DCC/HOBt, HATU ou TSTU avec respectivement des rendements de 2%, 19% et 21% (Tableau 28). Le meilleur rendement de 21% est obtenu avec le TSTU (Tableau 28 entrée 5 reporté dans le schéma 85). Les étapes suivantes restent identiques et conduisent à un rendement total de 10% en peptide **123**.

Entrée	Agent de couplage	Rendement (%) en 115
1	-	1
2	EDC.HCl	1
3	DCC	2
4	HBTU	13
5	HATU	19
6	**TSTU**	**21**

Tableau 28 : Tests de différents agents de couplages pour le couplage de PEG$_{36}$ en SPPS activé par NHS.

Bien que le protocole ne soit pas standard, les résultats obtenus suggèrent que l'agent de couplage réagit bien avec le PEG$_n$-NHS déjà activé.

b) Activation TFP

Une des stratégies pour améliorer les rendements a été d'utiliser un autre réactif pour l'étape d'activation, le 2,3,5,6-tetrafluorophénol (TFP).[530] Le TFP a été utilisé dans les mêmes conditions que précédemment (Schéma 86).

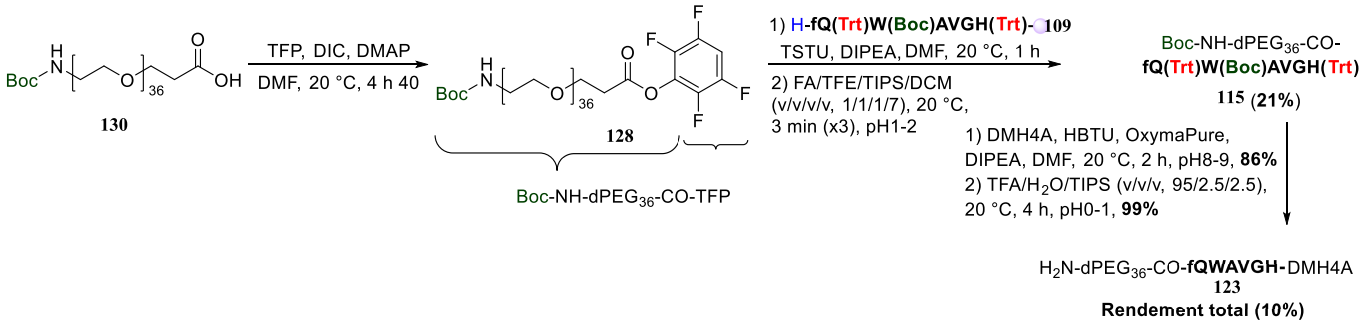


Schéma 86 : Pré-activation du PEG$_{36}$ par le TFP.

L'activation du PEG$_{36}$ est faite avec le 2,3,5,6-tétrafluorophénol (TFP), en présence de l'agent de couplage *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC) et de la base 4-(*N,N*-diméthylaminopyridine) (DMAP) dans le DMF pendant 4 h 40 avec un rendement estimée par LC-MS de 98% (Schéma 86). Le Boc-dPEG$_{36}$-TFP **128** a été engagé dans la réaction de couplage avec le peptide **109** dans le DMF pendant 2 h. Le produit **115** est clivé de la résine en présence d'un mélange FA/TFE/TIPS/DCM pendant 3 min répété 3 fois. Le rendement obtenu après ces deux étapes est de 2% en peptide **115**. Suivant la même approche que pour l'activation au NHS, la réaction est refaite avec le HBTU (4 equiv.), l'OxymaPure (4 equiv.) et le DIPEA (8 equiv.) avec un rendement de 11% en peptide **115**. Comme précédemment, le couplage peptique a aussi été réalisé avec HATU ou TSTU, et a conduit au peptide **115** avec respectivement des rendements de 14% et 21% (Tableau 29). Le meilleur rendement de 21% est obtenu pour TSTU (Tableau 29 entrée 3). Les étapes suivantes restent identiques et conduisent à un rendement total de 10% en peptide **123**.

Entrée	Agent de couplage	Rendement (%) en 115
1	-	2
2	HBTU	11
3	HATU	14
4	**TSTU**	**21**

Tableau 29: Tests de différents agents de couplages pour le couplage de PEG$_{36}$ en SPPS activé par TFP.

[530] Nilsson, R.; Sandberg, B.; Wilbur, S. WO2007080114A2, **2007**.

c) Activation $SOCl_2$

Une autre stratégie pour l'activation de ce couplage a été d'utiliser le chlorure de thionyle ($SOCl_2$).[531] Le $SOCl_2$ a été utilisé dans les mêmes conditions que précédemment (Schéma 87).

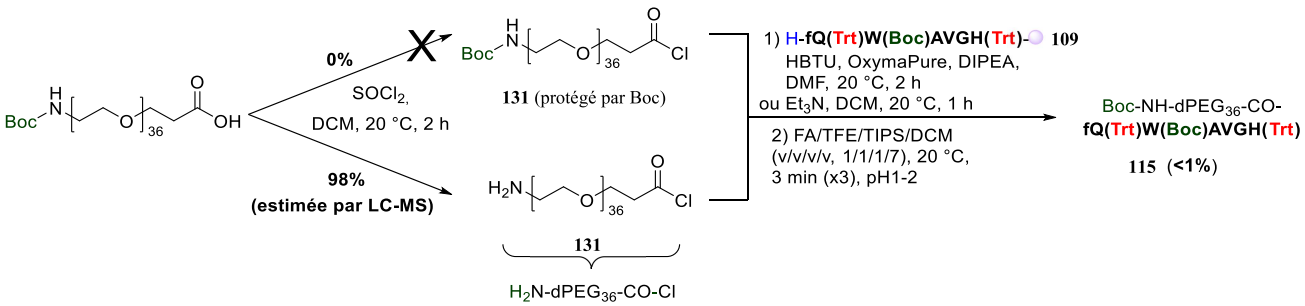


Schéma 87 : Pré-activation du PEG_{36} par le $SOCl_2$.

Cette étape d'activation du PEG_{36} a été faite avec le $SOCl_2$ dans le DCM pendant 2 h avec un rendement estimée par LC-MS de 98% en produit déprotégé **131**. Le peptide protégé n'a pas été observé en LC-MS. Le H-dPEG$_n$-Cl **131** a ensuite réagi dans le DMF pendant 2 h. Le produit **115** est clivé de la résine en présence d'un mélange FA/TFE/TIPS/DCM pendant 3 min répété 3 fois. Le peptide **115** n'a pas été détecté en LC-MS après ces deux étapes ni le produit déprotégé d'un Boc. Suivant le protocole de Bhatt *et al*, le H-dPEG$_n$-Cl **131** n'a pas réagi avec la triéthylamine (Et_3N) dans le DCM à 20 °C pendant 1 h avec un rendement négligeable (<1%). Seules des traces de produit **115** ont pu être détectées. Ce couplage peptidique a aussi été tenté avec le HBTU (4 equiv.), l'OxymaPure (4 equiv.) et le DIPEA (8 equiv.) sans détecter le produit **115**. Ce protocole a été refait one-pot et avec différentes bases tels que DIPEA, Et_3N, pyridine ou 4-méthylpiperidine. Dans tous les cas, le peptide **115** a été détecté sous formes de traces (<1%). Les analyses LC-MS ont montré que le Boc-dPEG$_n$ en présence de $SOCl_2$ est majoritairement déprotégé **132** (perte du Boc sans chloration). En effet, le $SOCl_2$ forme un acide fort le HCl comme sous-produit de réaction lors de l'activation du PEG_{36}.[532] Cette acidité est incompatible avec la protection Boc. Au vu des résultats, la synthèse du peptide **123** n'a pas été poursuivi.

[531] Bhatt, R.; Conrad, M. J.; Bencheikh, A.; Xiong, Y. WO2004027388A2, **2004**.
[532] Prabhu, G.; Basavaprabhu; Narendra, N.; Vishwanatha, T. M.; Sureshbabu, V. V. *Tetrahedron* **2015**, *71* (19), 2785–2832.

1.1.3. Conclusion

Dans cette partie, le couplage direct du PEG_{36} a été examiné en SPPS avec ou sans activation (NHS, TFP ou $SOCl_2$). Les résultats sont regroupés dans le tableau 30.

Entrée	Stratégie	Rendement (%) en 115
1	SPPS	4
2	**SPPS NHS**	**21**
3	**SPPS TFP**	**21**
4	SPPS $SOCl_2$	<1

Tableau 30 : Comparaison des couplages directes de PEG_{36} en SPPS avec ou sans activation.

Les stratégies qui permettent d'obtenir les meilleurs rendements pour la synthèse du peptide **115** sont le de couplage en SPPS avec activation du PEG_{36} par le NHS ou le TFP en 2 étapes (Tableau 30 entrées 2 et 3). Ces PEG_n souffrent d'un manque de réactivité dans les synthèses SPPS. Malgré nos essais, ces rendements restent bien trop faibles pour pouvoir poursuivre le projet.

1.2. En solution

1.2.1. Apport du couplage en solution

Puisque les PEG_n donnent de faibles rendements en SPPS même lorsqu'ils sont pré-activés avant le couplage, nous avons supposé que le problème venait de la synthèse SPPS elle-même. En effet, dans la littérature, les PEG_n de tailles importantes réagissent généralement en solution.[496,520] Dans le cas des dérivés de bombésine, la majorité des PEGylation décrits ont été faite en solution.[511,512] Des études computationnelles récentes ont montré que l'ajout d'un ou de trois PEG_{11} sur un peptide fixé à une surface formant un réseau bidimensionnel implique que les interactions de liaison hydrogène entre les azotes des acides aminés du peptide et les oxygènes de l'éthylène glycol conduiraient à l'agrégation des chaînes PEG_n.[533] Une telle agrégation signifierait que seule une petite fraction du peptide attaché à la surface serait accessible et que le peptide se répartirait dans la couche PEG. L'accessibilité dépend donc non seulement du degré auquel le peptide peut adopter une conformation appropriée mais également de l'étendue de l'agrégation et de l'étendue de la partition des peptides dans le PEG. Cela implique que plus le PEG_n réagit avec les peptides à la surface de la résine, moins le peptide est accessible pour réagir impliquant une baisse de la réactivité au cours du temps. Tous les peptides ne pourront ainsi pas réagir, ce qui limitera le rendement de couplage. Cet effet est d'autant plus marqué que la chaine PEG_n est longue.

[533] Singh, S. P.; Schwartz, M. P.; Lee, J. Y.; Fairbanks, B. D.; Anseth, K. S. *Biomater. Sci.* **2014**, *2* (7), 1024–1034.

D'autres études expérimentales sur les PEG_n à chaîne courte indiquent qu'elles forment des hélices, à la fois en solution et attachée à la surface.[533,534,535] De plus, les PEG_n (n = 24 ou 36) plus longs ont une plus grande probabilité de former cette conformation hélicoïdale pour favoriser les liaisons hydrogènes. Cette conformation hélicoïdale accroit le volume occupé par les PEG_n qui ne facilitent pas l'accès à certains sites actifs sur la résine. De plus, d'autres études expérimentales ont montré une diminution de la diffusion dans les résines lorsque la longueur des chaines de PEG_n augmente.[536,537] Ainsi pour augmenter la probabilité de rencontre des molécules en améliorant leur diffusion dans le milieu, la stratégie de couplage avec les PEG_n sera refaite en solution à partir de la séquence peptidique fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **111** ce qui implique de repenser une grande partie de la synthèse des peptides **124**, **125**, **126** et **127**.

Pour commencer, le peptide **109** doit d'abord être détaché de la résine avec un mélange compatible pour l'approche en solution. Le produit devra être suffisamment pur et suffisamment stable dans ces nouvelles conditions pour ne pas complexifier d'avantage le couplage difficile avec les PEG_n. Dans un premier temps, l'optimisation du clivage sera présentée suivant ces trois aspects (efficacement du clivage, pureté et stabilité) puis nous présenterons nos résultats sur le couplage des PEG_n.

1.2.2. Optimisation du cocktail de clivage

La stratégie de couplage en solution commence par le clivage du peptide **109** de la résine. Dans la littérature, plusieurs mélanges de clivage ont été développés.[488,489] Les deux mélanges les plus couramment utilisé sont à base d'acide trifluoroacétique (TFA) ou d'hexafluoropropan-2-ol (HFIP). Le clivage et la déprotection du peptide **109** en une étape avec le cocktail TFA/TIPS/H_2O (95,0/2,5/2,5) pour former le peptide **133** ont déjà été testés dans notre laboratoire.[487] Puisque des réactions de couplages seront ensuite réalisées, l'utilisation du peptide fQWAVGH **133** n'est pas souhaitable. Sans protection, l'histidine (H) et le tryptophane (W) peuvent subir des réactions indésirables de couplage plaçant le PEG_n au mauvais endroit. L'utilisation efficace de HFIP à 20% dans le DMF avec des rendements entre 80 et 95% a aussi été décrit.[487] Dans la littérature, ce clivage conduit généralement aux peptides sans déprotection des groupements protecteurs des chaines latérales.[488,489] Cette réaction de clivage a d'abord été répétée dans les mêmes conditions (Schéma 88).

[534] Wahab, S. A.; Matsuura, H. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3* (21), 4689–4695.
[535] Singelenberg, F. A. J.; Lutz, E. T. G.; van der Maas, J. H.; Jalsovszky, G. *J. Mol. Struct.* **1991**, *245* (3), 173–182.
[536] Albright, J. G.; Paduano, L.; Sartorio, R.; Vergara, A.; Vitagliano, V. *J. Chem. Eng. Data* **2001**, *46* (5), 1283–1291.
[537] Holyst, R.; Bielejewska, A.; Szymański, J.; Wilk, A.; Patkowski, A.; Gapiński, J.; Żywociński, A.; Kalwarczyk, T.; Kalwarczyk, E.; Tabaka, M.; Ziębacz, N.; Wieczorek, S. A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11* (40), 9025–9032.

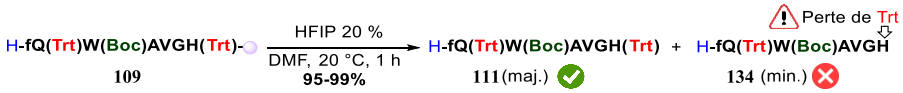


*Schéma 88 : Clivage de la séquence peptidique fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **109** par HFIP à 20%.*

La réaction de clivage est faite dans un mélange de HFIP à 20% dans le DMF à 20 °C pendant 1 h avec des rendements compris entre 95 et 99%. Elle conduit à un mélange de peptides **111** et **134** plus ou moins protégés. Bien qu'efficace pour détacher le peptide de la résine, tous ces mélanges de réactifs de clivage conduisent à un mélange de peptides. Comme nous l'avons vu précédemment sur la figure 31, la synthèse optimisée du peptide **109** conduit en général au produit sans aucun sous-produit résultant de séquences peptidiques incorrectes (délétion ou addition d'acide aminé). Le produit **109** est obtenu suffisamment pur pour s'affranchir d'une étape de purification ce qui fait l'intérêt de la SPPS. Cependant des sous-produits apparaissent dans le cas particulier de la réaction de clivage de la séquence peptidique fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **109**. Certains de ces sous-produits correspondent à la déprotection partielle des chaines latérales du peptide **111**. Ainsi, le peptide **134** issus de la déprotection de la chaine latérale de l'histidine est majoritairement observé. Ces observations ont déjà été rapportées par Barlos *et al* en 1991 pour d'autres peptides contenant l'histidine (H) et le tryptophane (W).[493] Les deux principaux produits sont donc le peptide **111** et **134** en proportion variables généralement compris entre 35 et 82% de peptides attendus **111**. Cette variabilité s'explique par une variation de la concentration en HFIP lors des étapes de traitements qui nécessitent l'élimination du DMF pour pouvoir précipiter le peptide dans l'Et_2O.

La réaction a d'abord été répétée sans traitement avec un rendement de 82% (Tableau 31 entrée 6). Différents pourcentages de HFIP ont été ensuite testés de 1% à 80% dans le DMF pendant 1 h (Tableau 31) pour reproduire la variation possible de concentration d'HFIP lors des traitements et optimiser le clivage.

Entrée	HFIP (%)	Rendement (%) en 111
1	1	16
2	5	33
3	10	38
4	15	69
5	17	77
6	20	82
7	25	52
8	50	41
9	80	4
10	100	1

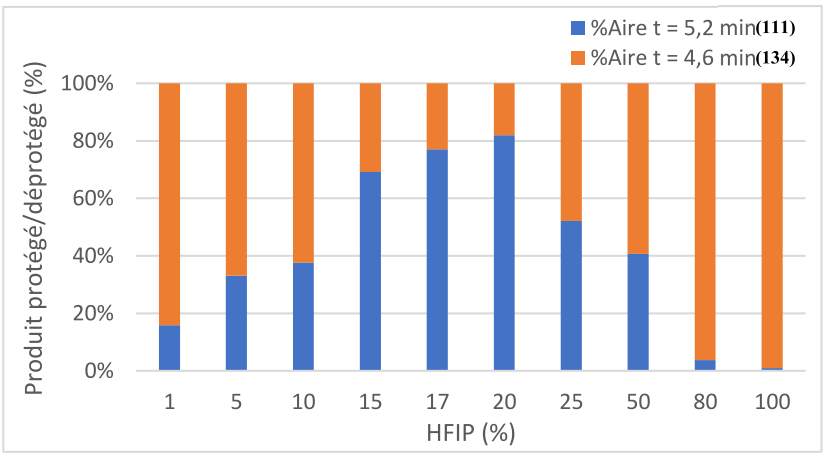


*Tableau 31 : Influence du pourcentage d'HFIP sur le clivage de la séquence peptidique fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **109**.*

Dès 20%, la totalité de la séquence peptidique fQ(Trt)W(Boc)AVGH **134** est clivée de la résine après au moins 30 min comme le préconise la littérature.[488,489] Bien qu'efficace pour détacher le peptide de la résine tous ces mélanges de réactifs de clivages conduisent bien à un mélange de peptides correspondant à la perte ou non d'un groupement trityle (Trt). Une augmentation du temps conduit à une augmentation de la proportion de peptide **134**.

Dans la littérature, ces problèmes de déprotection partielle de la chaine latérale de l'histidine lors du clivage de la résine sont connus. Deux stratégies sont souvent proposées pour y répondre. D'une part, le changement de groupement protecteur. Par exemple, Barlos *et al* a recommandent l'utilisation de His(Clt) à la place de His(Trt) pour l'introduction de l'histidine.[493] D'autre part, un changement du mélange de clivage est aussi préconisé par de nombreuses revues ou de fournisseurs.[488,489] Nous avons choisi de rester avec l'His(Trt) pour des raisons de coût et d'approvisionnement, et d'optimiser le mélange de clivage pour éviter ce problème (Tableau 32 et Schéma 89).

Entrée	Clivage	Rendement (%) en 111
1	TFA/TIPS/H_2O (95,0/2,5/2,5)	0
2	HFIP/DMF (20/80)	35-82
3	HFIP/TIPS/DMF (15/15/70)	78
4	HFIP/TIPS/DCM (15/15/70)	80
5	AcOH/TFE/DCM (1/1/9)	25
6	FA/TFE/DCM (10/10/80)	88
7	**FA/TFE/TIPS/DCM (10/10/10/70)**	**90**

*Tableau 32 : Tests de différents mélanges de clivage pour le peptide **109**.*

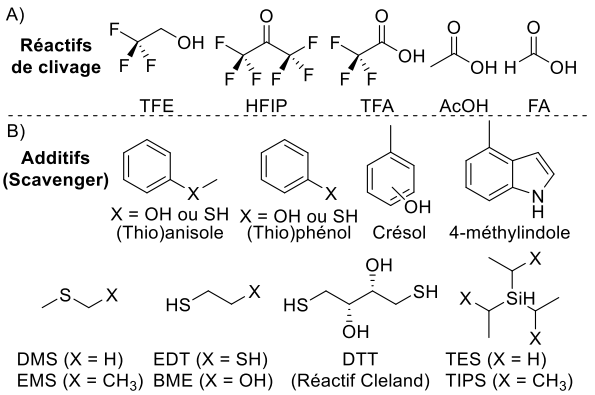


Schéma 89 : Principaux réactifs (A) et additifs (B) de clivages pour la résine 2-Cl-Trt. [488,489]

Puisqu'un pourcentage de peptide **134**, dont les chaines latérales sont déprotégées, est toujours présent dans le milieu réactionnel et que nous ne souhaitons pas faire de purification à cette étape, nous avons choisi d'ajouter le triisopropylsilyle (TIPS) à la solution de clivage pour éliminer les réactions secondaires de ce peptide **134**. Le TIPS est couramment utilisé pour piéger les cations formés tels que le cation trityle et éviter les réactions secondaires comme la réduction du noyau indole du tryptophane (W).[517] Le mélange HFIP/TIPS/DCM (v/v/v, 15/15/70) a donné le moins de pics de sous-produits en LC-MS pour un rendement de 80% (Tableau 32 entrée 4). Le DCM, plus facilement éliminable que le DMF, a été utilisé sans impacter le clivage (Tableau 32 entrée 4). Enfin, nous avons choisi de tester d'autres mélanges d'acides avec ou sans additifs (thioanisole, phénol, *m*-crésol, EDT ou TIPS) dans le DCM à

différentes concentrations en volume (%). Ces mélanges couramment décrits dans la littérature (Tableau 32 et Schéma 89) sont : TFA (1-20%), HFIP (1-80%), TFE (20-50%) ou AcOH (20-50%).[488,489] Les analyses LC-MS révèlent une perte du trityle porté par l'histidine avec tous ces acides. D'après Barlos *et al*, les peptides contenant des acides aminés dont les chaines latérales sont protégées par le groupement protecteur Trt sont les mieux clivés de la résine 2-Cl-Trt par le mélange AcOH/TFE/DCM (1/1/9).[493] L'ajout de TFE permettrait d'accélérer l'efficacité du clivage. Ces auteurs ont montré que l'utilisation de méthanol à la place de TFE réduit fortement la cinétique du clivage, et que l'absence de TFE conduit à des clivages incomplets. De plus, Povey *et al* ont montré que le TFE améliore la précipitation dans les solvants organiques et la solubilisation dans l'eau des peptides.[538] D'autre part, Yamada *et al* reporte que l'acide formique racémise moins les peptides déprotégés que l'acide acétique ou propionique.[539] Parmi tous les acides testés, seul l'acide formique (FA) permet de conserver la séquence peptidique fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **111** totalement protégée par les Trt et Boc. L'ajout de TFE en très faible quantité permet le meilleur compromis entre la cinétique et l'efficacité du clivage tout en limitant la perte des groupements protecteurs des chaines latérales. Ces observations sont en accord avec ceux de Barlos *et al*.[493] Toutefois, le mélange FA/TFE/DCM ne permet pas d'éviter totalement la formation du sous-produit **134** avec un rendement de 1-2% dans ces conditions (Tableau 32 entrée 6). Avec les étapes de traitements, la formation du sous-produit **134** n'excède pas 12%. L'ajout de TIPS pour limiter l'apparition de sous-produits reste donc nécessaire. Après optimisation, le meilleur mélange permettant de cliver quantitativement le peptide reste le FA/TFE/TIPS/DCM (v/v/v/v, 10/10/10/70) pendant 3 fois 3 min avec la formation du sous-produit **134** n'excédant pas 9% (Schéma 90) (Tableau 32 entrée 7). L'ajout de DIPEA pour neutraliser l'acide favorise la formation de sous-produits indésirables. FA, TFE et DCM sont donc éliminés sous flux d'azote en veillant à ne pas concentrer l'acide (<50%) par ajout de DCM par portion. Avant que le séchage ne soit complet, le peptide est précipité dans l'Et_2O à -20 °C. La séquence peptidique **111** protégée est alors obtenue avec un rendement de 90% (Schéma 90).

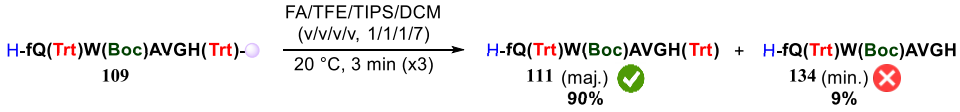


*Schéma 90 : Clivage optimisé de la séquence fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **111** par FA/TFE/TIPS/DCM (10/10/10/70).*

La séquence peptidique fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **111** ou son équivalent totalement déprotégé fQWAVGH **133** peuvent être purifié par HPLC préparative en phase inverse. Malheureusement, cette purification entraine de faibles rendements (15-21%), en raison de perte importante sur la colonne. Seul un ajout de 0,1% d'acide (FA, AcOH ou TFA) ou de base

[538] Povey, J. F.; Smales, C. M.; Hassard, S. J.; Howard, M. J. *J. Struct. Biol.* **2007**, *157* (2), 329–338.
[539] Yamada, S.; Hongo, C.; Yoshioka, R.; Chibata, I. *J. Org. Chem.* **1983**, *48* (6), 843–846.

(DIPEA, Et_3N ou ammonium formique) en HPLC a permis de mieux définir les pics. En particulier, l'acide formique à 0,1% a donné la meilleure élution avec de faibles rendements (25-34%). Une purification SPE sur une cartouche C18 ou tC18 n'a pas non plus permis d'améliorer sa purification. De plus, le peptide protégé est soluble dans le DCM, le DMF et le DMSO, mais il est peu soluble dans le CH_3CN, le CH_3OH, l'isopropanol et l'eau. Nous avons tenté en raison de sa solubilité dans les solvants organiques de le purifier par chromatographie sur gel de silice sans succès. Aucune autre technique de purification n'étant disponible au laboratoire, nous avons fait abstraction de ce problème en partant d'une quantité plus importante de peptide.

En résumé, cette synthèse peptidique a été optimisée avec succès pour limiter la formation de sous-produits et réduire les impuretés plutôt que d'utiliser des étapes de purifications longues et à faibles rendements. Cependant des problèmes de purifications sont observés que ce soit pour le peptide protégé fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **111** ou déprotégé fQWAVGH **133**.

1.2.3. Couplage en solution des PEG_{24} et PEG_{36}

Maintenant que le peptide **109** est en solution suffisamment pur et stable pour être couplé avec les PEG_n, son couplage en solution a pu être appliqué à la synthèse des peptides **124**, **125**, **126** et **127**. Les prochaines étapes de cette stratégie de synthèse en solution sont présentées dans le schéma 91.

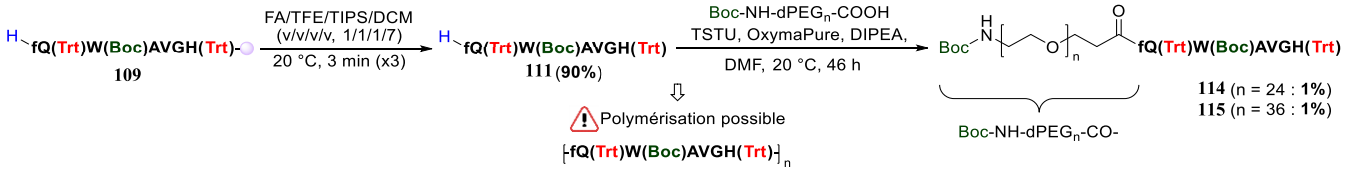


Schéma 91 : Stratégie 1 de couplage en solution.

La séquence peptidique fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **109** sur la résine a été clivée dans les conditions optimisées. Le mélange de FA/TFE/TIPS/DCM (v/v/v/v, 10/10/10/70) pendant 3 fois 3 min permet de collecte le peptide protégé **111** avec un rendement de 90%. Le couplage peptidique en solution est refait dans les mêmes conditions que ceux précédemment utilisés en SPPS. Le couplage peptidique entre la séquence peptidique clivée fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **111** et le Boc-NH-$dPEG_n$-CO_2H a été fait en présence de l'agent de couplage HBTU, de l'additif OxymaPure et de la base DIPEA solubilisé dans DMF pendant 2 h avec des rendements de 1% pour les peptides **114** et **115**. Au vu de ces faibles rendements, ces conditions ont été optimisées. Grun *et al* a utilisé pour son couplage en solution de PEG_{16} (M_w = 750 g/mol), les agents de couplages tels que le EDC/HOBt, le HATU ou le TBTU.[496] Ainsi, nous avons choisi de les utiliser aussi pour notre couplage. Cependant, les réactifs HATU/OxymaPure, EDC/HOBt ou TBTU/OxymaPure n'ont pas amélioré le rendement (<1%) pour les peptides **114** et **115**. Les

conditions présentant le moins de sous-produits ont été obtenues pour le TSTU avec l'OxymaPure et le DIPEA avec des rendements de 1% pour former les peptides **114** et **115**. Ces rendements étant bien trop faibles, cette voie de synthèse n'a pas été poursuivie.

Malheureusement, la stratégie de couplage en solution conservant le même ordre que la stratégie en SPPS conduit à la séquence peptidique clivé **111** déprotégée à la fois en N et C terminal après le clivage de la résine (Schéma 91). Lors du couplage suivant, la séquence peptidique **111** peut réagir sur elle-même (tête-à-queue) et donc se polymériser en présence d'agent de couplage. Cela explique le faible rendement observé lors de l'étape suivante du couplage des PEG_n. De même, lors du couplage de 2,6-diméthylheptan-4-amine, le peptide **111** qui n'aurait pas réagi avec le PEG_n peut aussi se polymériser, s'agréger et piéger en son sein le produit **116**, **117**, **118** ou **119**. Pour améliorer le rendement, les étapes de cette stratégie sont inversées, et le Fmoc doit être conservé avant le clivage du peptide (Schéma 92).

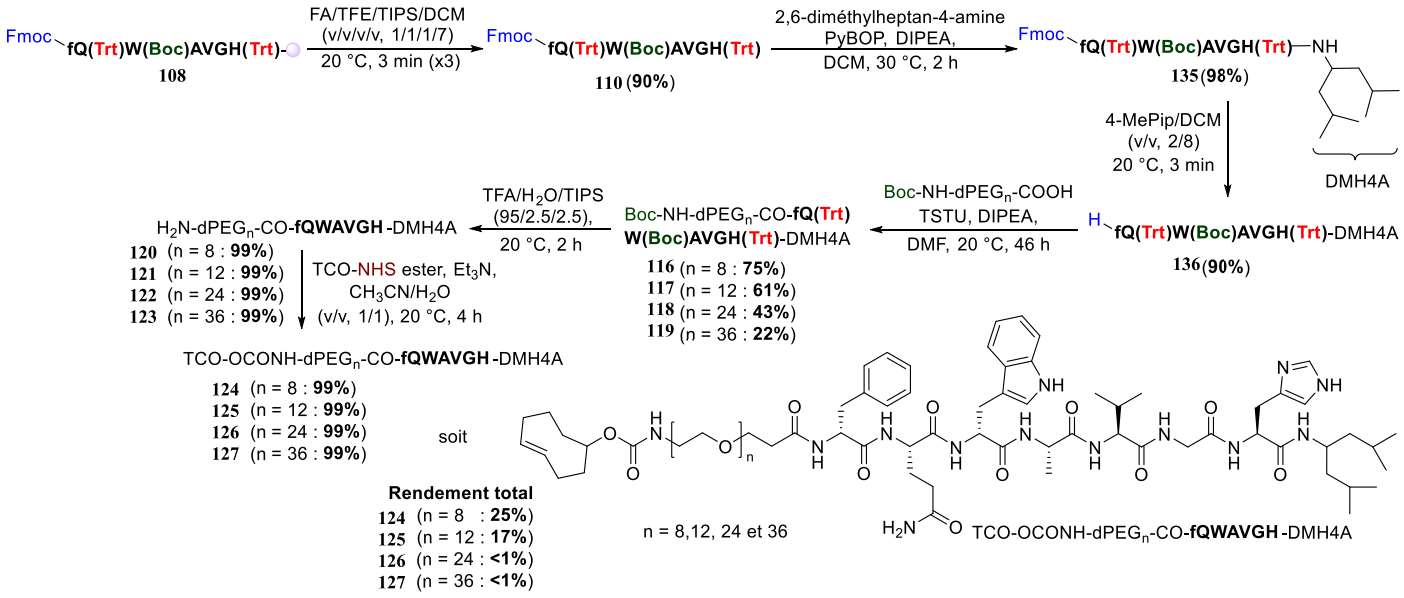


Schéma 92 : Stratégie 2 de couplage optimisé en solution.

Pour commencer, le peptide protégé par un Fmoc **108** a été clivé dans les conditions précédemment optimisées pour le peptide **109**. Le mélange de FA/TFE/TIPS/DCM (v/v/v/v, 1/1/1/7) pendant 3 fois 3 min permet de collecter le peptide protégé **110** avec un rendement de 90%. Le couplage peptidique entre le peptide protégé par un Fmoc **110** et le 2,6-diméthylheptan-4-amine est fait dans les mêmes conditions que précédemment. Ainsi, le couplage en présence de l'agent de couplage HBTU, de l'additif OxymaPure et de la base DIPEA dans DMF pendant 2 h a donné seulement 33% de peptide **135** (Tableau 33). La fonctionnalisation en C-terminal donnant de faible rendement, les principaux agents de couplages de la littérature ont été testés.[488,489,496] Le changement d'agent de couplage de HBTU par EDC.HCl, DCC/HOBt, DIC, HATU, TSTU, TBTU ou PyBOP a permis d'obtenir respectivement les rendements de <1%, <1%, 3%, 7%, 21%, 30% et 79% (Tableau 33). Le

meilleur rendement de 98% en peptide **135** est obtenu à 30 °C au lieu de 20 °C avec le PyBOP solubilisé dans le DCM pendant 2 h.

Entrée	Agent de couplage	Rendement (%) en 135
1	EDC.HCl	<1
2	DCC/HOBt	<1
3	DIC	3
4	HATU	7
5	TSTU	21
6	TBTU	30
7	HBTU	33
8	**PyBOP**	**79**

*Tableau 33 : Influence des agents de couplage en C-terminal pour le peptide **135**.*

Le peptide **135** ou son équivalent déprotégé du Fmoc **136** peuvent être purifié par HPLC préparative en phase inverse.[487,540] Malheureusement, cette purification entraine de faibles rendements (15-21%), en raison de perte importante sur la colonne. Un ajout de 0,1% d'acide (FA, AcOH ou TFA) ou de base (DIPEA, Et_3N ou ammonium formique) a été testé. L'acide formique à 0,1% a donné la meilleure élution. À cette étape, le peptide **135** est entièrement protégé (Fmoc, Trt et Boc) ce qui le rend peu soluble dans l'eau et plus soluble dans les milieux organiques. En effet, ce peptide protégé **135** est soluble dans le DCM, le DMF et le DMSO, mais il est peu soluble dans le CH_3CN, le CH_3OH, l'isopropanol et l'eau. Une purification sur gel de silice a été développée avec un éluant $CHCl_3/CH_3CN/CH_3OH$ (v/v/v, 140/60/2 mL). Les rendements sont moyens de 52%. Les analyses LC-MS révèlent que l'acidité du gel de silice (pH 4-6) peut déprotéger une partie des groupements protecteurs trityle de l'histidine. Un conditionnement de la silice par une base (DIPEA) à 1% et à 0,1% dans l'éluant permet d'éviter la perte de Trt cependant une perte de Fmoc peut être observée conduisant à des rendements de seulement 81%. Cette perte de Fmoc n'est pas un problème mais un avantage puisqu'elle constitue l'objectif de l'étape suivante de cette synthèse.

L'étape suivante consiste à déprotéger le Fmoc en N-terminal pour former le peptide **136**. Pour cela, le peptide protégé par un Fmoc **135** réagit avec Et_2NH (10 equiv.) à 20% dans le DCM ou le 4-Mepip (10 equiv.) à 20% dans le DCM pendant 3 min pour former le peptide **136** avec respectivement un rendement de 84% et de 90%. Les sous-produits à cette étape n'ont pas ou peu d'influence sur l'étape suivant. L'étape suivante a donc été réalisée directement après traitements (précipitation et lavage par Et_2O à -20 °C) sans purifications intermédiaires.

Le Boc-NH-dPEG$_n$-CO_2H réagit avec le peptide **136** en présence de TSTU, d'OxymaPure et de DIPEA dans le DMF pendant 46 h. Des rendements de 75% en peptide **116**, 61% en peptide **117**, 43% en peptide **118** et 22% en peptide **119** ont été obtenus. Les peptides

[540] Conlon, J. M. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (1), 191–197.

116, **117**, **118** et **119** ont été déprotégés quantitativement par le mélange TFA/H_2O/TIPS (v/v/v, 95/2,5/2,5) en peptides **120**, **121**, **122** et **123**, puis l'acide a été éliminé par dépôt sur une cartouche C18 de type Water Sep-Pak® Vac 3cc, lavage à l'eau (x10) et élué par le méthanol avec un rendement de 37%.

Finalement, le TCO-NHS a réagi avec les peptides **122** et **123** en présence de Et_3N dans CH_3CN/H_2O (v/v, 1/1). Un rendement quantitatif est obtenu avec Et_3N pendant 4 h. Malheureusement, les rendements totaux sont très faibles 25% en peptide **124**, 17% en peptide **125**, <1% en peptide **126** et <1% en peptide **127**. La majorité du produit **126** et **127** a été perdue lors de la purification HPLC préparative. Les peptides **124**, **125**, **126** et **127** étant assez lipophiles, les pics trainent sur la colonne. Pour essayer de résoudre ce problème, l'ajout de 1% de Kolliphor a été utilisé sans amélioration des rendements.[487] Les peptides **124**, **125**, **126** et **127** collectés ont été analysés par LC-MS (Figure 33) avec une pureté de 98% ou supérieure.

1.3. Conclusion

Dans cette partie, le couplage direct de PEG_n a été vu en SPPS avec ou sans activation (NHS, TFP ou $SOCl_2$) ainsi qu'en solution. Les résultats sont regroupés dans le tableau 34.

Entrée	Stratégie	Rendement (%) sur deux étapes				Rendement total (%)			
		116	**117**	**118**	**119**	**124**	**125**	**126**	**127**
1	**SPPS**	**88**	**86**	4	3	**70**	**61**	**4**	**2**
2	SPPS NHS	-	-	-	18	-	-	-	<10
3	SPPS TFP	-	-	-	18	-	-	-	<10
4	SPPS $SOCl_2$	-	-	-	<1	-	-	-	<1
5	Solution 1	-	-	1	1	-	-	-	<1
6	Solution 2	75	61	**43**	**22**	25	17	<1	<1

Tableau 34 : Comparaison des couplages directes de PEG_n en SPPS et en solution.

D'après le tableau 34, la stratégie qui permet d'obtenir le meilleur rendement total pour la synthèse des peptides **124**, **125**, **126** et **127** est la stratégie de couplage en SPPS (Tableau 34 entrée 1) bien que le meilleur rendement de couplage introduisant le PEG_n soit obtenu pour la stratégie en solution (Tableau 34 entrée 6). En SPPS, les peptides sont lavés à chaque étape pour éliminer les réactifs. Les peptides clivés précipitent alors plus facilement. Nous observons une meilleure pureté pour la première stratégie ce qui facilitent les analyses, l'identification du produit, ses traitements et sa purification. Cependant, la stratégie SPPS ne permet pas un bon couplage des longues chaines de PEG_n (n = 24 ou 36). La dernière stratégie (Tableau 34 entrée 6) permet un couplage modéré mais le peptide est perdu dans les étapes de traitements et de purification en raison de sa solubilité.

2. Couplage multiple de PEG_n

Sachant que pour les courtes chaines de PEG_n (n = 8 ou 12) de bons rendements et une bonne pureté sont observés en SPPS, la répétition du couplage d'une chaine de PEG_n court peut permettre d'obtenir des PEG_n de longueur équivalente.[533,541,542,543] Yoo *et al* a utilisé le double couplage du PEG_2 sur un peptide en N-terminal en présence de HATU et de DIPEA pour obtenir un analogue de PEG_4-peptide avec un rendement de 65%.[541] De même, Diaferia *et al* a utilisé le couplage du PEG_6 entre deux et quatre fois sur un motif D-phénylalanine (f) en N-terminal en présence de PyBOP, HOBt et DIPEA pour obtenir des analogues du PEG_{12}, du PEG_{18} et du PEG_{24}.[542] Deak *et al* font de même sur une protéine avec un double couplage de PEG_8 avec HBTU pour obtenir un analogue de PEG_{16}.[543] Ces trois groupes utilisent uniquement des PEG_n préalablement protégés par un groupement Fmoc. D'après ces études, il serait plus facile d'introduire des courtes chaines PEG_n plusieurs fois que d'introduire directement une longue chaine PEG_n. Nous avons donc choisi de tester cette stratégie.

Cette stratégie a été développée à partir de couplages multiples (n = 1, 2 ou 3) de Fmoc-$dPEG_{12}$-CO_2H commercial, illustrée dans le schéma 93. Un double couplage permet d'obtenir un équivalent de PEG_{24} et un triple couplage permet d'obtenir un équivalent de PEG_{36}. Suivant les mêmes étapes et les mêmes conditions utilisées précédemment dans le couplage PEG_n optimisées en SPPS de la partie « 1.1.1 » (page 192) ainsi que celles de Deak *et al*, le multi-couplage PEG_n est présenté dans le schéma 93.[543]

[541] Yoo, B.; Ma, K.; Zhang, L.; Burns, A.; Sequeira, S.; Mellinghoff, I.; Brennan, C.; Wiesner, U.; Bradbury, M. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (22), 7119–7130.
[542] Diaferia, C.; Sibillano, T.; Altamura, D.; Roviello, V.; Vitagliano, L.; Giannini, C.; Morelli, G.; Accardo, A. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23* (56), 14039–14048.
[543] Deak, P. E.; Kim, B.; Abdul Qayum, A.; Shin, J.; Vitalpur, G.; Kloepfer, K. M.; Turner, M. J.; Smith, N.; Shreffler, W. G.; Kiziltepe, T.; Kaplan, M. H.; Bilgicer, B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116* (18), 8966–8974.

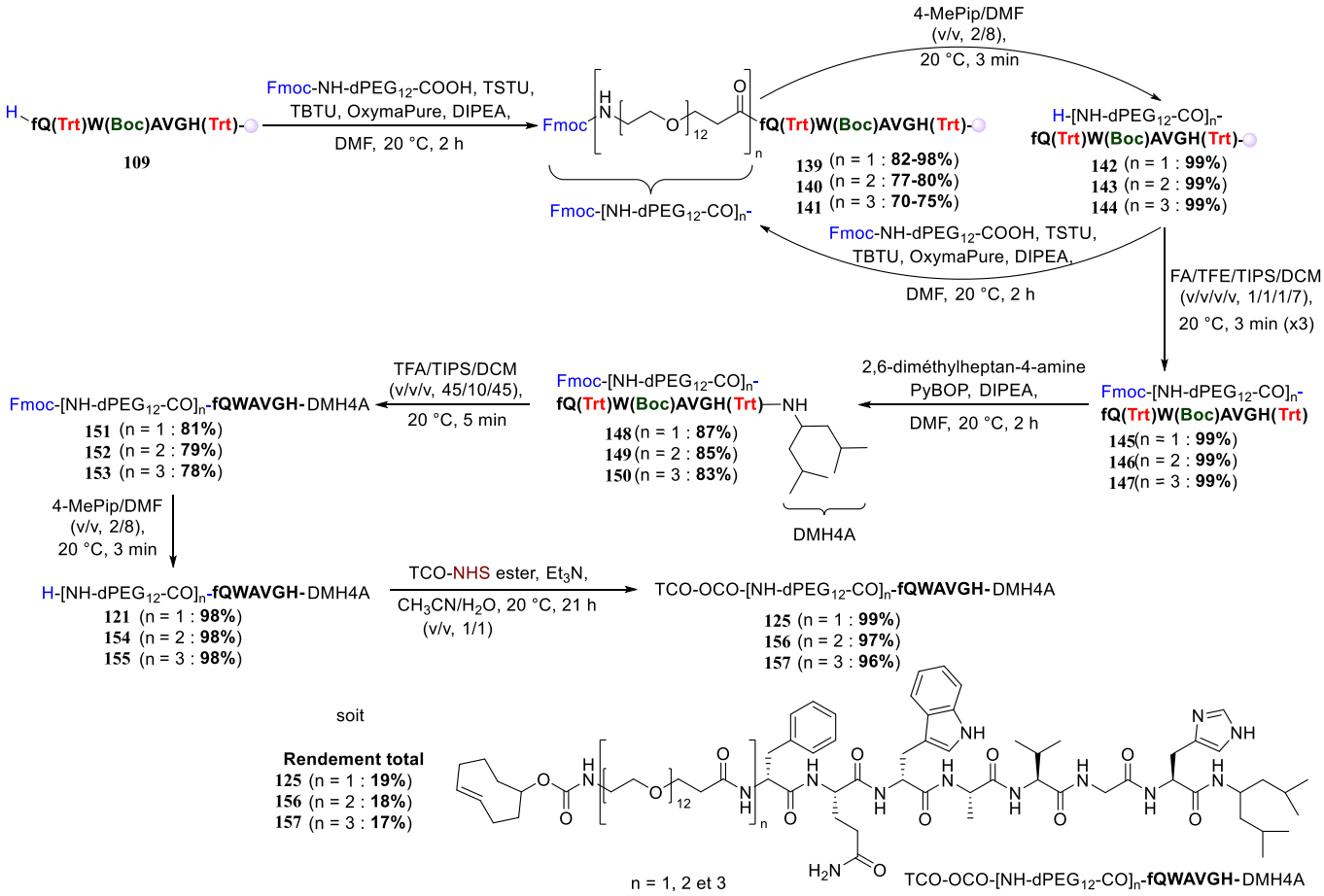


*Schéma 93 : Synthèse des peptides **125**, **156** et **157** avec n = 1, 2 ou 3.*

Cette stratégie a d'abord commencé par le couplage entre le peptide **109** et le Fmoc-NH-dPEG$_{12}$-CO$_2$H. Selon le protocole adapté de Deak *et al*,[543] ce couplage a été fait en présence de HBTU, OxymaPure et DIPEA dans le DMF dans la proportion 4/4/8 (en équivalents) pendant 2 h avec un rendement de 73% en peptide **139** (Tableau 35 entrée 1). Le peptide **139** est déprotégé du Fmoc par une solution de 4-MePip à 20% dans le DMF pendant 3 min. Après lavage, ces étapes (déprotection, lavage, couplage et lavage) ont été répétées pour introduire un second Fmoc-NH-dPEG$_{12}$-CO$_2$H pour former le peptide **140**, puis un troisième pour former le peptide **141** avec respectivement un rendement de 54% en peptide **140** et 32% en peptide **141** (Tableau 35 entrée 1). Pour améliorer ces rendements, l'agent de couplage HBTU a été remplacé par TBTU avec un rendement de 76% (Tableau 35 entrée 2). Puisque l'activation par le NHS a donné de meilleur rendement dans la synthèse SPPS de la partie précédente, nous avons ajouté l'agent de couplage TSTU donnant un rendement de 70% (Tableau 35 entrée 3). Un mélange de TBTU/TSTU en présence d'OxymaPure, de DIPEA dans un ratio 1/3/3/5 (en équivalents) dans le DMF pendant 2 h a ainsi augmenté les rendements à 82% en peptide **139** lors du premier couplage, puis à 77% en peptide **140** pour le second et à 70% en peptide **141** pour le troisième (Tableau 35 entrée 4). Ce protocole, illustré dans le schéma 93, a été répété deux fois avec des rendements comparables. Ces résultats confirment la tendance observée dans

la stratégie précédente, à savoir plus la chaine PEG_n est longue et plus les rendements diminuent. Cette tendance a déjà été confirmée par Singh *et al* qui ont montré que plus les chaines PEG_n sont longues plus elles forment de liaisons hydrogènes et ont tendance à s'agréger ce qui rend moins accessibles les sites actifs.[533] Cette agrégation augmente la viscosité du milieu, diminue la diffusion et donc la cinétique du couplage.[537] Cependant, cela n'a pas empêché cette stratégie d'avoir de bons rendements (70-82%) pour les couplages PEG_n contrairement aux stratégies précédentes. Les peptides fonctionnalisés par les multiples PEG_{12} **139**, **140** et **141** obtenues sont des analogues des peptides **113**, **114** et **115** précédemment synthétisés pour n = 12, 24 et 36. Comme dans la stratégie de la partie « 1.1.En SPPS » (page 192), les peptides obtenus **139**, **140** et **141** sont clivés, fonctionnalisés en C-terminal, déprotégés, neutralisés et enfin fonctionnalisés en N-terminal par le TCO. Ces étapes sont rappelées dans le schéma 93.

Entrée	Agent de couplage	Rendement (%)		
		139	**140**	**141**
1	HBTU	73	54	32
2	TBTU	76	-	-
3	TSTU	70	-	-
4	**TBTU/TSTU**	**82**	**77**	**70**

Tableau 35 : Multiple couplage de PEG_{12} en SPPS.

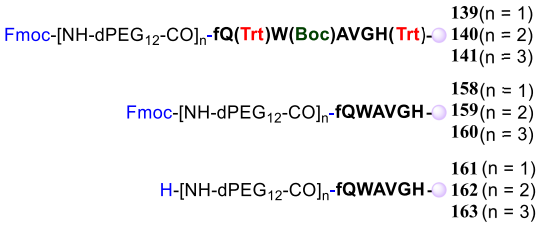


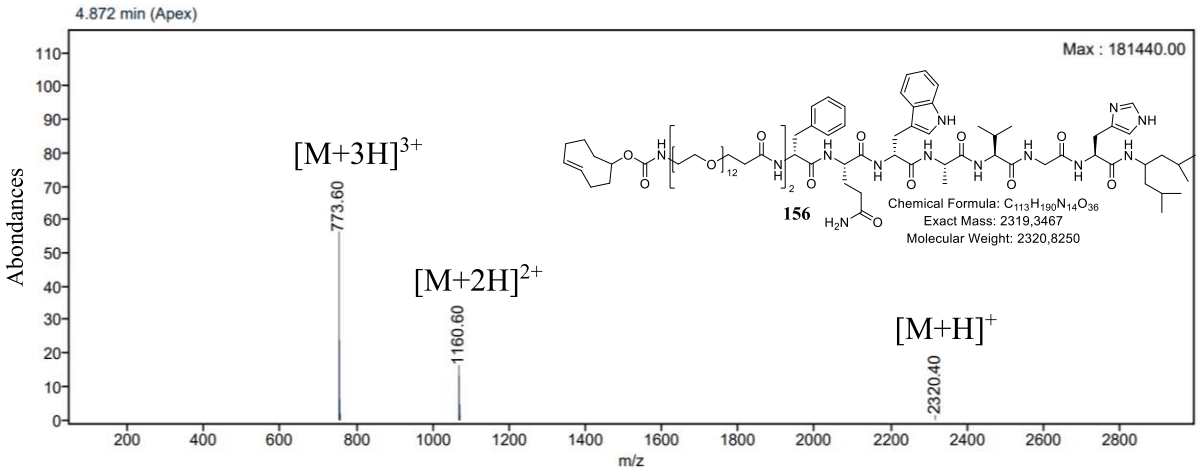
*Schéma 94 : Peptide **139**, **140** et **141** protégé et déprotégé partiellement ou totalement.*

Entrée	Déprotection	Rendement (%)		
		151	**152**	**153**
1	TFA/TIPS/H_2O (95/2.5/2.5)	20	13	7
2	TFA/TFE/TIPS/DCM (7/1/1/1)	85	76	70
3	**TFA/TIPS/DCM (45/10/45)**	**81**	**79**	**78**

Tableau 36 : Multiple couplage de PEG_{12} en SPPS.

Ainsi les peptides **139**, **140** et **141** sont d'abord clivés quantitativement par un mélange d'acide formique (FA), de 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE) et de triisopropylsilyle (TIPS) solubilisés dans le DCM pendant 3 fois 3 min. Leurs analyses LC-MS a été réalisées sous la forme déprotégée du Trt et du Boc **158**, **159** et **160**, et sous la forme totalement déprotégée (Trt, Boc et Fmoc) **161**, **162** et **163**. Les peptides **145**, **146** et **147** clivés après précipitation et lavage par Et_2O à -20 °C, sont ensuite couplés avec le 2,6-diméthylheptan-4-amine en présence de l'agent de couplage PyBOP et de la base DIPEA (4/4/8 equiv.) dans DMF pendant 2 h. Le rendement est de 83-87%. Les peptides obtenus **148**, **149** et **150** sont déprotégés des groupements Trt et Boc par un mélange TFA/TIPS/H_2O (v/v/v, 95/2.5/2.5) pour former les

peptides **151**, **152** et **153**. Cependant, ce mélange a conduit à une perte de produit avec des rendements de 20% en peptide **151**, 13% en peptide **152** et 7% en peptide **153** seulement, et l'apparition de sous-produits. Un mélange plus doux avec TFA/TFE/TIPS/DCM (v/v/v/v, 7/1/1/1) a permis d'obtenir des rendements de 85% en peptide **151**, 76% en peptide **152** et 70% en peptide **153** tout en limitant la dégradation. TIPS joue encore le rôle de piège pour les espèces réactives et limitent les réactions tandis que TFE améliore la cinétique.[517,538] En effet, les chromatogrammes en LC-MS présentent moins de pics avec ce nouveau mélange. Ce nouveau mélange bien que plus doux a nécessité des temps de déprotection plus long. Un mélange TFA/TIPS/DCM (v/v/v, 45/10/45) plus concentré a présenté une meilleure cinétique en 5 min avec des rendements de 81% en peptide **151**, 79% en peptide **152** et 78% en peptide **153**. Les peptides **151**, **152** et **153** sont encore précipités et séchés par l'Et_2O froid avant d'être déposés sur une cartouche C18 de type Water Sep-Pak® Vac 3cc. Des lavages à l'eau ont permis d'éliminer l'acidité et le méthanol a élué les peptides **151**, **152** et **153**. Les peptides **151**, **152** et **153** sont déprotégés du Fmoc par le 4-Mepip à 20% dans le DMF avant et après la déprotection des Trt et de Boc. Les meilleurs rendements de 98% en peptide **121**, 98% en peptide **154** et 98% en peptide **155** ont été obtenus pour l'étape de déprotection Fmoc (3 x 3 min) après les déprotection de Trt et de Boc. De même, des rendements de 63% en peptide **121**, 59% en peptide **154** et 55% en peptide **155** ont été obtenus avec la diéthylamine. Finalement, le couplage des peptides **121**, **154** et **155** avec le TCO-NHS a donné en présence de Et_3N à pH 8 dans un mélange CH_3CN/H_2O (v/v, 1/1) pendant 21 h des rendements respectivement de 19% en peptide **125**, 18% en peptide **154** et 17% en peptide **155**. Enfin, les peptides **125**, **156** et **157** ont été purifiés dans les conditions optimisées de HPLC des peptides **126** et **127** précédemment décrites. Les analyses LC-MS présentés dans la figure 33 et la figure 34 ont permis de confirmer et caractériser chaque produit de chaque étape, dont les produits finaux **125**, **156** et **157** obtenus avec une pureté de 98%.



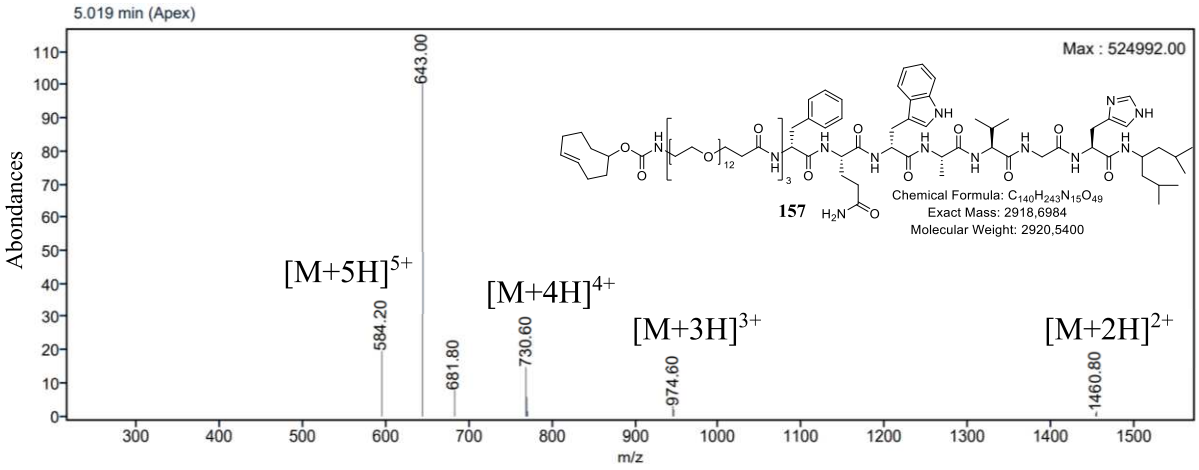


*Figure 34: Analyses LC-MS des peptides **156** et **157**.*

En résumé, le multiple couplage de PEG_{12} en SPPS permet d'obtenir de bons rendements de couplage et d'accéder aux longues chaines de PEG_n équivalent à n = 24 et 36. Le couplage de Boc-NH-dPEG_{12}-CO_2H ou de Fmoc-NH-dPEG_{12}-CO_2H a respectivement donné des rendements de 86% en peptide **117** et 82% en peptide **145** (Tableau 37). Ainsi les rendements totaux sont les meilleurs que nous ayons obtenus jusqu'à présent avec respectivement 19% en peptide **125**, 18% en peptide **156** et 17% en peptide **157**.

Entrée	Stratégie	Rendement (%)				Rendement total (%)			
		116	**117**	**118**	**119**	**124**	**125**	**126**	**127**
1	SPPS	**88**	86	4	3	70	**61**	4	2
2	Solution 2	75	61	43	22	25	17	<1	<1
3	Multi-PEG	-	**82**	**77**	**70**	-	19	**18**	**17**

Tableau 37 : Comparaison des couplages directes et multiples de PEG_n en SPPS et en solution.

Malheureusement, les peptides **125**, **156** et **157** restent en quantité insuffisante pour la suite du projet après les différentes étapes de traitements, neutralisations et purifications. Sachant que les PEG_n coûtent cher commercialement, leur quantité disponible est restreinte. Cependant, nous en perdons énormément durant les purifications. Pour éviter ces pertes et les coûts élevés, il serait préférable de l'introduire au dernier moment juste avant ou avec le TCO et de s'affranchir de l'étape de purification.

3. Couplage du PEG_n par CuAAC

Une nouvelle stratégie a été donc développée en partant des substrats les plus accessibles et les plus facilement purifiables : soit du peptide Fmoc-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **108** ou soit du peptide fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A **136**. En effet, le peptide **136** a été obtenu avec de bons rendements (77% sur 4 étapes à partir du peptide **108**) après purification en phase normale dans la partie « 1.2.3 » (page 208). Tout d'abord, les peptides **108** ou **136** doivent être fonctionnalisés puis les dérivés obtenus sont directement déprotégés, neutralisés et purifiés. Ensuite, le PEG_n et le TCO sont introduits sur ce dérivé du peptide **108** ou **136**. Cette réaction doit être une réaction spécifique, orthogonale, quantitative et facilement purifiable par simple filtration.

Nous avons donc choisi, l'une des réactions « click » les plus utilisées de la littérature, la cycloaddition de Huisgen entre un alcyne et un azide catalysé au cuivre (CuAAC) en raison de la disponibilité commerciale des réactifs aminés H_2N-dPEG_n de chaine longue (n = 24 ou 36). Les peptides, les protéines et les anticorps ont déjà été fonctionnalisés par des chaines PEG_n plus ou moins longues via la CuAAC en respectant ces critères.[507,544,545,546,547] Des applications biologies de PEGylation de peptide par CuAAC ont déjà donné des résultats très encourageants.[548,549,550] Suivant cette littérature, les peptides sont autant fonctionnalisés par des azides,[544,547,551] que des alcynes.[507,545,546] En général, la CuAAC est catalysée par $CuSO_4$ réduit par l'acide ascorbique sous sa forme acide ou basique dans *t*BuOH/H_2O en présence ou non d'un ligand THPTA ou TBTA.

D'autre part, dans la littérature, les N_3-dPEG_n-CO-NHS (n = 5, 12, 24 ou 36) ont déjà été couplés avec des peptides.[545,546,551,552,553,554,555,556] Plus particulièrement, un dérivé de la bombésine BBN[7-14] a déjà été fonctionnalisé avec un PEG_4 impliquant une CuAAC en SPPS par Valverde *et al* en 2013.[557] Ces auteurs commencent par substituer l'amine d'un acide aminé (His ou Val) par un azoture d'imidazole-1-sulfonyle en présence de K_2CO_3, $CuSO_4$, CH_3OH, 20 °C pendant 18 h avec un rendement de 38%. Ensuite, l'azido acide aminé est introduit en SPPS en présence de TBTU/HOBt ou HATU/DIPEA dans le DMF à 20 °C pendant 1 h. La CuAAC entre un amino-alcyne et un azidopeptide catalysé par $[Cu(CH_3CN)_4]PF_6$ avec TBTA et DIPEA est réalisée dans le DMF à 20 °C pendant 1 nuit. Ensuite le PEG_4, puis le DOTA sont

[544] Dirks, A. (Ton) J.; Cornelissen, J. J. L. M.; Nolte, R. J. M. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20* (6), 1129–1138.
[545] Nairn, N. W.; Shanebeck, K. D.; Wang, A.; Graddis, T. J.; VanBrunt, M. P.; Thornton, K. C.; Grabstein, K. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23* (10), 2087–2097.
[546] Nairn, N. W.; Bariola, P. A.; Graddis, T. J.; VanBrunt, M. P.; Wang, A.; Li, G.; Grabstein, K. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26* (10), 2070–2075.
[547] Tully, M.; Wedepohl, S.; Kutifa, D.; Weise, C.; Licha, K.; Schirner, M.; Haag, R. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2021**, *164* (1), 105–113.
[548] Inoue, N.; Onoda, A.; Hayashi, T. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30* (9), 2427–2434.
[549] Xiao, Q.; Ashton, D. S.; Jones, Z. B.; Thompson, K. P.; Price, J. L. *RSC Chem. Biol.* **2020**, *1* (4), 273–280.
[550] Zhou, R.; Zhang, M.; He, J.; Liu, J.; Sun, X.; Ni, P. *ACS Omega* **2022**, *7* (24), 21325–21336.
[551] Thoreau, F.; Vanwonterghem, L.; Henry, M.; Coll, J.-L.; Boturyn, D. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (22), 4101–4107.
[552] Majewski, M. W.; Gandhi, D. M.; Rosas, R.; Kodali, R.; Arnold, L. A.; Dockendorff, C. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10* (1), 121–126.
[553] Keen, N.; Mcdonnell, K.; Park, P.; Upadhyaya, P. WO2019193328A1, **2019**.
[554] Chen, L.; Lani, R.; Mcdonnell, K.; Mudd, G.; Park, P.; Upadhyaya, P. WO2019162682A1, **2019**.
[555] Sakamuri, S.; Bradshaw, C. W.; Eltepu, L.; Meade, B. R.; Lam, S. WO2018035380A1, **2018**.
[556] Keen, N.; Mudd, G.; Brandish, P.; Gaynor, K.; Chen, L.; Dufort, F.; Leitheiser, C.; Mcdonnell, K.; Repash, L.; Uhlenbroich, S. WO2022148975A1, **2022**.
[557] Valverde, I. E.; Huxol, E.; Mindt, T. L. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **2014**, *57* (4), 275–278.

ajoutés après déprotection par 20% de 2-MePip dans les conditions SPPS précédentes. Leur produit est déprotégé et clivé par TFA/H_2O/PhOH/TIPS.

En 2017, Mion *et al* effectue une CuAAC en solution pour introduire un PEG_2. BBN[7-14] réagit avec l'acide 5-azidopentanoïque, TBTU et DIPEA pour former le N_3-BBN[7-14]. Le N_3-BBN[7-14] est couplé pour introduire une alcyne-dPEG_2-porphyrine en présence de $CuSO_4$ et l'ascorbate de sodium dans *t*BuOH/H_2O avec des rendements de 70% pour chacun de ces deux étapes.[558] La même année, Simpson *et al* ont décrit la synthèse de N_3-dPEG_7-[D-Phe^6,β-Ala^{11},Phe^{13},Nle^{14}]bombésine(6-14) (noté pan-bombésine) en présence de HCTU (un dérivé de HBTU) et DIPEA dans le DMF pendant une nuit avec un rendement de 65%.[502] Un autre exemple de cette réaction est décrit la même année avec différents peptides avec un rendement de 86%.[559] Cette réaction est issue d'une chimie bien plus large servant à coupler des peptides entre eux avec un espaceur fonctionnalisé par un PEG_n plus ou moins long.[560] Cette stratégie reste la plus utilisée dans la cyclisation intra et inter moléculaire de peptides difficiles.[561,562,563]

En 2010, Jolck *et al* décrivent la CuAAC en SPPS entre un alcyne peptide et un N_3-dPEG_n-OMe (n = 7, 22 et 44) catalysée avec CuI, l'ascorbique de sodium et la pipéridine dans le DMF ou le DCM entre 1 et 72 h puis le clivage par un mélange TFA/TIPS/H_2O (v/v/v, 95/2.5/2.5) avec un rendement de 85%.[564] En 2019, Keen *et al*, et Chen *et al* décrivent la CuAAC entre un alcyne peptide et un N_3-dPEG_n-NH-Boc (n = 5, 10 et 23) catalysée par $CuSO_4$ et l'ascorbique avec des rendements très variables en fonction du peptide (2-55%).[553,554] La même année, Majeski *et al* reprennent la même réaction sur un peptide différent avec n = 5, 7, 9 et 22 catalysée en solution avec le $CuSO_4$, l'ascorbate de sodium et le TBTA avec des rendements respectivement de 39%, 83%, 67% et 61%.[552] En 2021, Tully *et al* font réagir le peptide Ex-prop et un N_3-dPEG_n-OMe (n = 226, 443 et 907) en présence du $CuSO_4$, de l'ascorbate de sodium, du THPTA dans le PBS (10 mM, pH 7,4) à 20 °C pendant 16 h avec des rendements de respectivement 32%, 68% et 46%.[547] La même année, Mousa *et al* décrivent la CuAAC entre une petite molécule et un N_3-dPEG_{35}-NH-Boc avec le $CuSO_4$, l'ascorbate de sodium et le TBTA avec un rendement de 6%.[565]

Nous avons donc choisi de fonctionnaliser le peptide **109** par un groupement azide ou alcyne. Suivant cette stratégie de PEGylation par CuAAC, le peptide fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A **136** a d'abord été fonctionnalisé par un groupement azide ou alcyne puis déprotégé, neutralisé et purifié avant de réagir avec des azido-dPEG_n ou alcyne-dPEG_n commerciaux. Dans cette partie, cette stratégie sera vue suivant la synthèse peptidique en phase solide (SPPS) et en solution.

[558] Mion, G.; Mari, C.; Da Ros, T.; Rubbiani, R.; Gasser, G.; Gianferrara, T. *ChemistrySelect* **2017**, *2* (1), 190–200.
[559] Hayashi, G.; Kamo, N.; Okamoto, A. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (43), 5918–5921.
[560] Wood, T. M.; Slingerland, C. J.; Martin, N. I. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (15), 10890–10899.
[561] Punna, S.; Kuzelka, J.; Wang, Q.; Finn, M. G. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2005**, *44* (15), 2215–2220.
[562] Jagasia, R.; Holub, J. M.; Bollinger, M.; Kirshenbaum, K.; Finn, M. G. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (8), 2964–2974.
[563] Fumagalli, G.; Carbajo, R. J.; Nissink, J. W. M.; Tart, J.; Dou, R.; Thomas, A. P.; Spring, D. R. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (23), 17287–17303.
[564] Jølck, R. I.; Berg, R. H.; Andresen, T. L. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21* (5), 807–810.
[565] Mousa, S. a; Hay, B. A. WO2021221836A1, **2021**.

3.1. En SPPS

Puisque la SPPS a donné les meilleurs rendements totaux et la meilleure pureté jusqu'à présent, nous avons choisi de commencer par fonctionnaliser le peptide **109** en phase solide (SPPS) puis de continuer par la CuAAC en SPPS ou en solution.

3.1.1. Synthèse d'azido-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A et d'alcyne-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A

Tout d'abord, cette stratégie basée sur la CuAAC commence par la synthèse de la séquence peptidique fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **109** sur résine (déprotégé du Fmoc) comme nous l'avons précédemment vu. Le peptide **109** a ensuite été fonctionnalisé soit par l'acide 2-azidoacétique,[313,566,567,568] l'acide 5-azidopentanoïque[569,570,571,572] ou l'acide 5-hexynoïque dans les mêmes conditions comme illustré dans le schéma 95.[569,573,574,575]

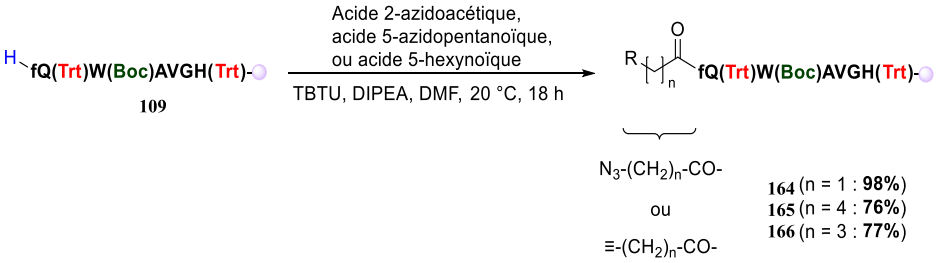


*Schéma 95 : Synthèse des peptides **164**, **165** et **166** fixés sur la résine 2-Cl-Trt et fonctionnalisés par des azotures ou un alcyne.*

Le peptide fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) fixé sur résine **109** a d'abord été couplé avec l'acide 2-azidoacétique. Le peptide réagit en présence de HBTU (4 equiv.), OxymaPure (4 equiv.) et DIPEA (8 equiv.) solubilisé dans le DMF pour conduire au peptide **164** avec un faible rendement de 34%. En adaptant le protocole de Mion *et al*,[558] la réaction a été optimisée par l'utilisation de TBTU (4 equiv.) et de DIPEA (18 equiv.) dans le DMF pendant 18 h. Le rendement est passé à 98% en peptide **164**. Ce protocole optimisé a été ensuite appliqué à l'acide 5-azidopentanoïque et l'acide 5-hexynoïque avec des rendements de 76% en peptide **165** et 77% en peptide **166** respectivement. Des lavages au méthanol (x3) permettent d'éliminer

[566] Dehigaspitiya, D. C.; Anglin, B. L.; Smith, K. R.; Weber, C. S.; Lynch, R. M.; Mash, E. A. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (47), 11507–11517.
[567] Oude Blenke, E.; Sleszynska, M.; Evers, M. J. W.; Storm, G.; Martin, N. I.; Mastrobattista, E. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28* (2), 574–582.
[568] Lundquist; Pelletier, J. C. *Org. Lett.* **2001**, *3* (5), 781–783.
[569] Wängler, C.; Maschauer, S.; Prante, O.; Schäfer, M.; Schirrmacher, R.; Bartenstein, P.; Eisenhut, M.; Wängler, B. *Chem. Eur. J. Chem. Bio.* **2010**, *11* (15), 2168–2181.
[570] Pechar, M.; Pola, R.; Laga, R.; Ulbrich, K.; Bednárová, L.; Maloň, P.; Sieglová, I.; Král, V.; Fábry, M.; Vaněk, O. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (10), 3645–3655.
[571] Smolensky, E. D.; Marjańska, M.; Pierre, V. C. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (26), 8039–8046.
[572] Feldborg, L. N.; Jølck, R. I.; Andresen, T. L. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23* (12), 2444–2450.
[573] Barkey, N. M.; Tafreshi, N. K.; Josan, J. S.; De Silva, C. R.; Sill, K. N.; Hruby, V. J.; Gillies, R. J.; Morse, D. L.; Vagner, J. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (23), 8078–8084.
[574] Kulkarni, P.; Haldar, M. K.; Katti, P.; Dawes, C.; You, S.; Choi, Y.; Mallik, S. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (8), 1830–1838.
[575] Lu, L.; Zhao, X.; Fu, T.; Li, K.; He, Y.; Luo, Z.; Dai, L.; Zeng, R.; Cai, K. *Biomaterials* **2020**, *230*, 119666–119681.

la majorité des réactifs des peptides **164**, **165** et **166** fixés sur la résine. La résine a été reconditionnée par le DCM (x3), puis le DMF (x3) pour être prête pour la prochaine étape.

3.1.2. CuAAC d'azido-dPEG$_n$-amine

Pour commencer, nous avons repris les conditions de Jolck *et al* à notre connaissance sont les seuls à coupler des PEG$_n$ de masses importantes (M_w = 350, 1000 et 2000) à un peptide par CuAAC en SPPS.[564] La CuAAC a été réalisée à partir du peptide **166** fonctionnalisé par un alcyne, fixé sur la résine 2-Cl-Trt et préconditionné dans le DMF. Le 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine a été couplé avec l'iodure de cuivre (CuI), l'ascorbique de sodium et le pipéridine (Pip) dans le DMF pendant 16 h puis clivé par un mélange TFA/TIPS/H_2O (v/v/v, 95/2.5/2.5). Le peptide **180** a été obtenu avec un rendement de 2% (Tableau 38 entrée 1). Ce protocole a été ensuite adapté avec les conditions les plus répandues de la littérature de CuAAC des peptides avec des PEG$_n$, c'est-à-dire le sulfate de cuivre(II) penta-hydraté ($CuSO_4$) préalablement réduit par le L-ascorbate de sodium (L-Asc. Na.) dans un mélange *t*BuOH/H_2O (v/v, 2/1). L'étape de clivage est aussi adaptée à notre stratégie en utilisant un mélange FA/TFE/TIPS/DCM (v/v/v/v, 1/1/1/7). Ces conditions n'ont pas permis de détecter le produit **172** par LC-MS (Tableau 38 entrée 2). Puisque les alcools sont connus pour rétrécir la taille du maillage de la résine,[491] la réaction a été refaite dans un mélange de DMF/H_2O (v/v, 2/1) ou DMF/THF (v/v, 1/1) à 20 °C pendant 16 h avec un rendement de respectivement 5% et 58% (Tableau 38 entrée 3-4). Cette CuAAC adaptée pour la SPPS est présentée dans le schéma 96.

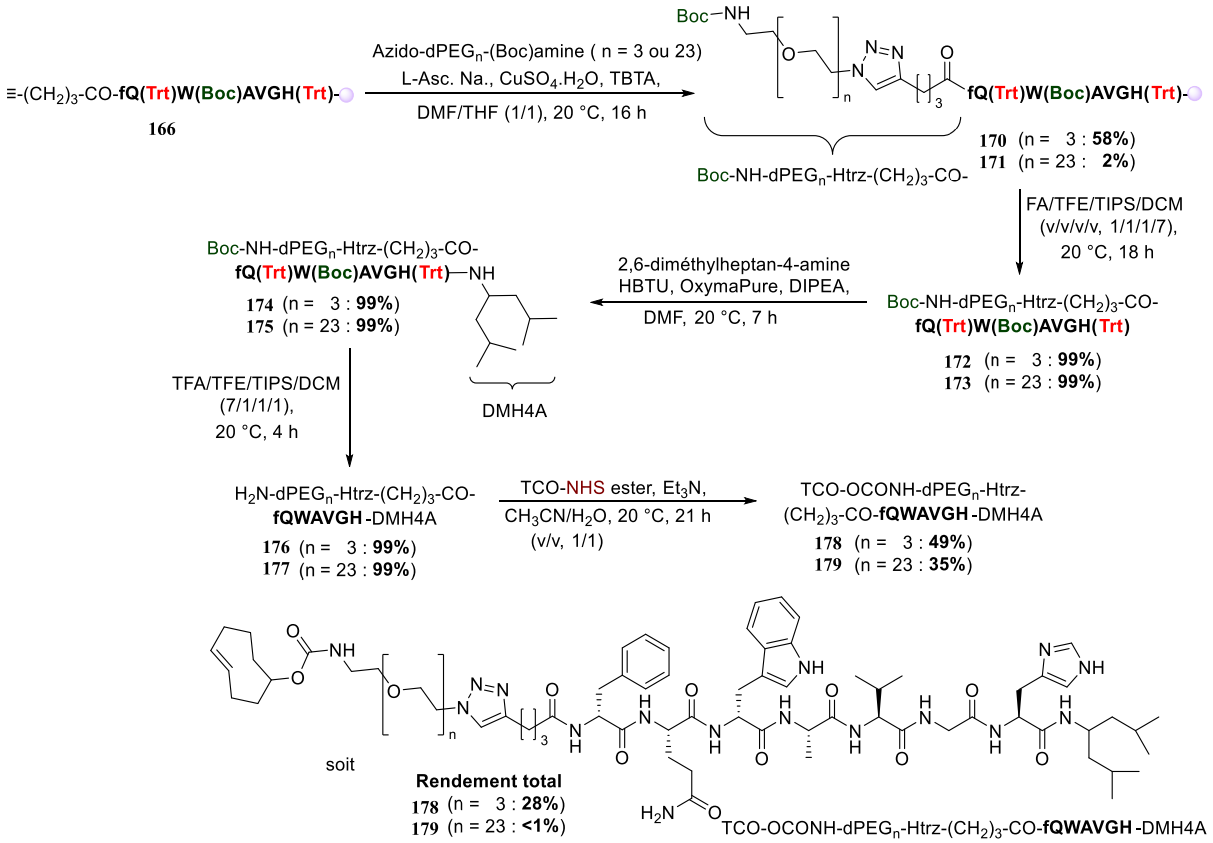


*Schéma 96 : Synthèse des peptides **178** et **179** par CuAAC en SPPS.*

Entrée	Cuivre	Solvants	Rendement (%) en 170
1	CuI	Pip/DMF (v/v, 1/4)	2
2	**$CuSO_4$**	*t*BuOH/H_2O (v/v, 2/1)	0
3		DMF/H_2O (v/v, 2/1)	5
4		**DMF/THF (v/v, 1/1)**	**58**

*Tableau 38 : Influence du cuivre et du solvant sur la synthèse du peptide **170**.*

D'après les analyses LC-MS après totale déprotection, un pic majoritaire de peptide **169** est observé. Un deuxième pic est observé correspondant au peptide **180**. Les meilleurs rendements ont été obtenus avec le $CuSO_4$, L-Asc Na, TBTA en proportion 1/0.04/0.06/0.08 (en équivalents) dans le DMF/THF (v/v, 1/1) pendant 16 h avec des rendements de 58% pour le peptide **170** et 2% pour le peptide **171** correspondants aux azido-dPEG$_n$-amines protégé par Boc avec respectivement n= 3 et 23 (Tableau 38 entrée 4). Ensuite, nous avons comparé la PEG$_n$-amine protégée par un Boc ou non. Nous n'avons pas constaté de différences avec le

peptide **170** obtenu avec un rendement de 58%. De même, l'utilisation du peptide **169** sans groupement protecteur Boc a permis d'obtenir un rendement comparable de 56%.

Comme pour les autres peptides fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) fonctionnalisés par un PEG_n, ces peptides ont été clivés, fonctionnalisés en C-terminal, déprotégés, neutralisés, fonctionnalisés en N-terminal par un TCO et purifiés comme présenté dans le schéma 96. Le clivage a été quantitatif dans le mélange FA/TFE/TIPS/DCM (v/v/v/v, 1/1/1/7) pour les peptides **172** et **173**. Le couplage en C-terminal de 2,6-diméthylheptan-4-amine en présence de l'agent de couplage HBTU, de l'additif OxymaPure et de la base DIPEA dans DMF pendant 7 h est aussi quantitatif. Ensuite, les peptides **174** et **175** ont été déprotégés quantitativement par un mélange TFA/TFE/TIPS/DCM (v/v/v/v, 7/1/1/1) pour former les peptides **176** et **177**. Après traitements et neutralisation, le couplage avec le TCO-NHS a donné en présence de Et_3N dans un mélange CH_3CN/H_2O (v/v, 1/1) les peptides **178** et **179** avec des rendements de 49% et 35% respectivement. Les peptides **178** et **179** ont été obtenus par CuAAC en SPPS avec des rendements totaux de 28% et <1% respectivement. Une perte importante en HPLC préparative dans les conditions précédemment optimisées a réduit fortement le rendement de la dernière étape de synthèse. Les produits finaux **178** et **179** ont été caractérisés en LC-MS avec une pureté supérieure à 98% et sont présentés dans la figure 35.

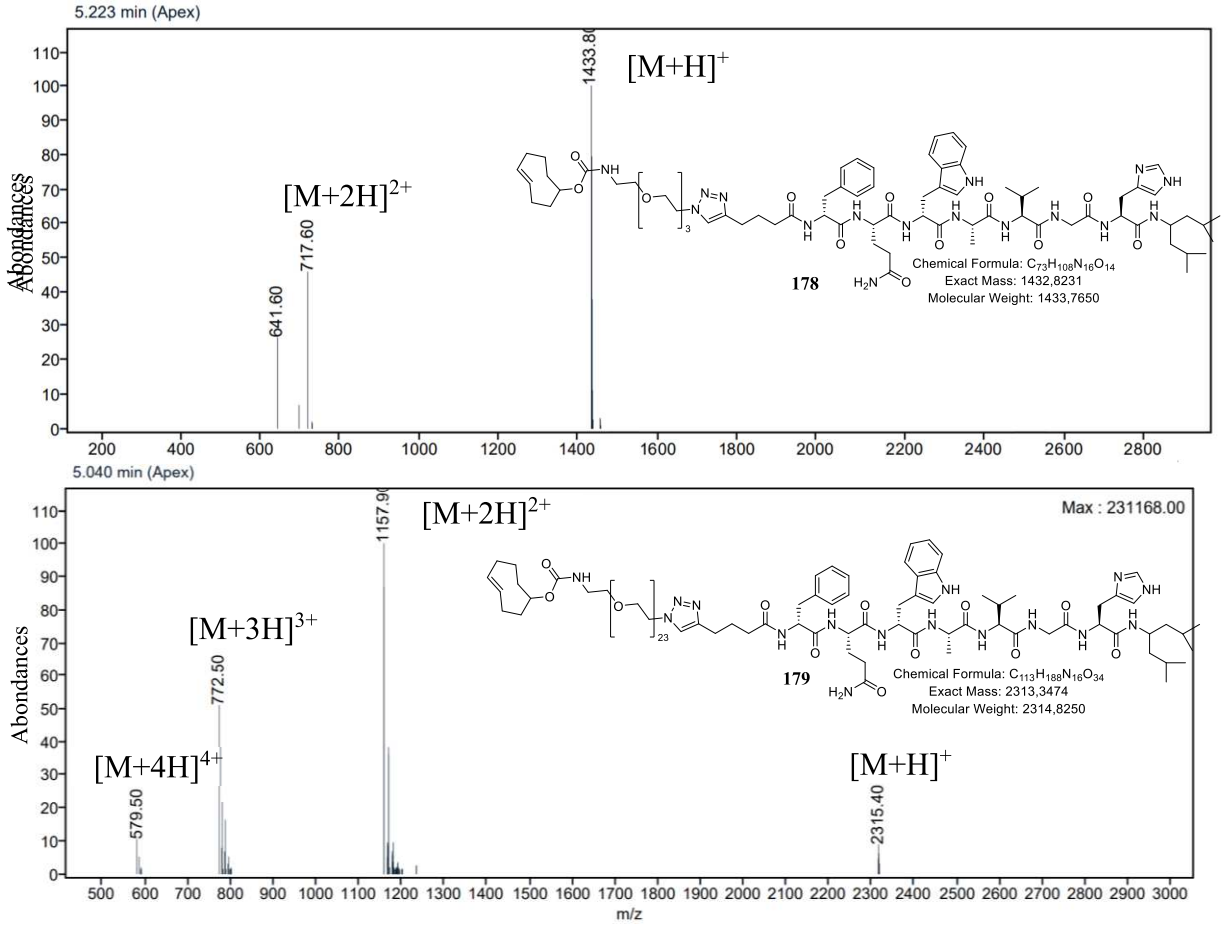


*Figure 35 : Analyses LC-MS des peptides **178** et **179** obtenus par CuAAC en SPPS à partir du peptide **166**.*

3.2. En solution

Les rendements de couplage en SPPS étant encore trop faibles, surtout pour les longues chaines PEG_n. Nous avons réalisé la CuAAC en solution. En effet, la majorité des publications sur la CuAAC pour la PEGylation de peptide se fait en solution,[576] surtout dans le cas des dérivés de la bombésine.[502,558,559] Nous valoriserons donc dans un premier temps les peptides **164**, **165** et **166** précédemment obtenus avec de bons rendements (77-98%) par une CuAAC en solution. Dans un deuxième temps, nous comparons cette stratégie à celle totalement en solution.

3.2.1. Synthèse d'azido-fQWAVGH-DMH4A et d'alcyne-fQWAVGH-DMH4A

Comme précédemment, les synthèses ont commencé par la synthèse d'azido-peptides **164** et **165**, et d'alcyne-peptides **166**. Ensuite, deux stratégies similaires ont été employées. Elles ne différèrent que par l'ordre de l'enchainement des étapes de couplages entre le N-terminal et le C-terminal.

a) Stratégie 1

La première stratégie conserve le couplage en SPPS de la partie N-terminal du peptide par l'acide 2-azidoacétique, l'acide 5-azidopentanoïque ou l'acide 5-hexynoïque. En effet, nous avons obtenu précédemment de bons rendements pour ces peptides **164**, **165** et **166**. La synthèse se poursuit par leur clivage, leur fonctionnalisation en C-terminal et leur déprotection avant la CuAAC avec les PEG_n. Cette stratégie a l'avantage d'introduire le PEG_n le plus tard possible. La première étape de cette stratégie est d'obtenir les peptides fonctionnalisés par des alcynes ou des azides en solution. Dans un deuxième temps, ces peptides réagiront avec leur partenaire PEG_n par CuAAC en solution. La première partie de cette stratégie est détaillée dans le schéma 97.

[576] Hussein, W. M.; Toth, I. *In Peptide Conjugation: Methods and Protocols*; Hussein, W. M., Stephenson, R. J., Toth, I., Eds.; *Methods mol. biol.*; Springer US: New York, NY, **2021**; 57–64.

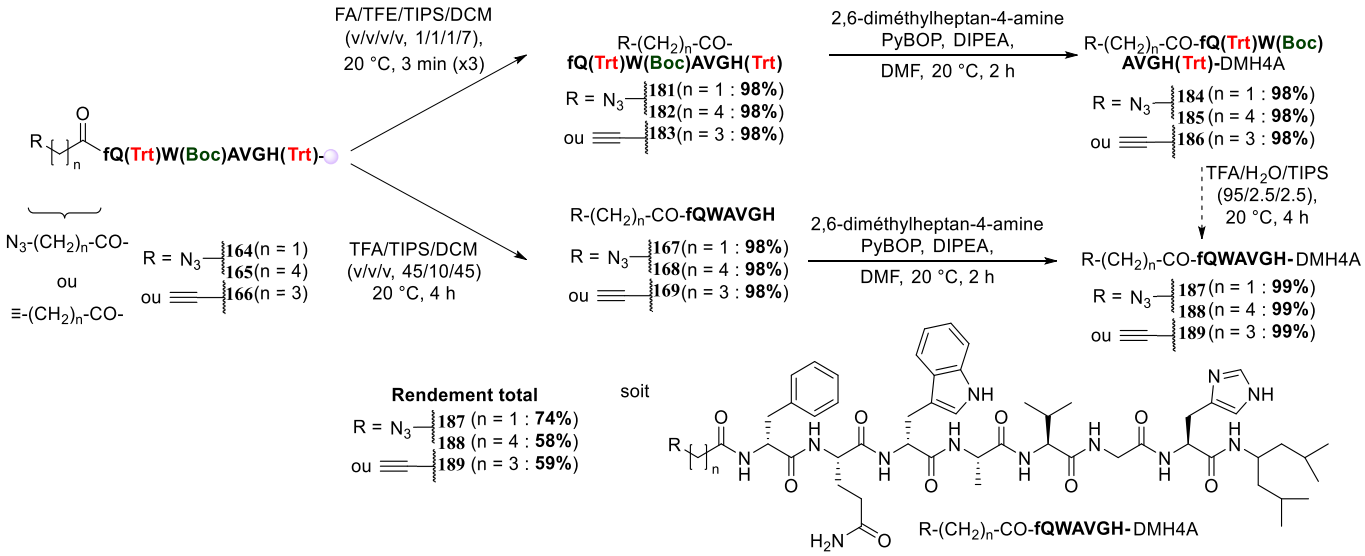


*Schéma 97 : Synthèse des peptides **187**, **188** et **189** suivant la stratégie 1.*

Pour commencer, les peptides **164**, **165** et **166** sont clivés suivant deux protocoles. Ce clivage avec le FA/TFE/TIPS/DCM (v/v/v/v, 1/1/1/7) conserve la protection et est quasiment quantitatif (98%) pour former les peptides **181**, **182** et **183**. D'autre part, les peptides **164**, **165** et **166** sont clivés et déprotégés par le mélange TFA/TIPS/DCM (v/v/v, 45/10/45) pendant 4 h donnant respectivement et quantitativement les peptides déprotégés **167**, **168** et **169**.

Cependant des pertes importantes de peptides **181**, **182** et **183** sont observées lors des étapes de traitements et de purifications. En effet, les peptides **181**, **182** et **183** sont plus solubles dans les solvants organiques que les peptides précédemment synthétisés. Ces peptides **181**, **182** et **183** précipitent moins dans l'Et_2O froid. L'élimination de traces de solvant DMF ou DCM utilisé dans l'étape précédente de clivage est donc essentielle. Ces peptides **181**, **182** et **183** ont été séchés plus longtemps sous vide et les étapes de traitements ont systématiquement été contrôlées par LC-MS.

Après les traitements post-clivages, les peptides protégés **181**, **182** et **183** ou déprotégés **167**, **168** et **169** ont été fonctionnalisés en C-terminal avec le 2,6-diméthylheptan-4-amine. Leur couplage peptidique a été fait en solution en présence de l'agent de couplage PyBOP et de la base DIPEA (4/4/20 equiv.) dans DMF pendant 2 h avec des rendements quasiment quantitatifs de 98% pour chacun de ces peptides.

Ces peptides **184**, **185**, **186**, **187**, **188** et **189** sont ensuite isolés. D'une part, l'absence de groupements protecteurs Fmoc sur la séquence permet une stabilité en milieu basique accrue. D'autre part, l'utilisation d'acide reste à proscrire pour éviter la perte des groupements protecteurs Trt et Boc. De plus, les groupements Trt et Boc rendent le peptide peu soluble dans l'eau. Un traitement, par extraction liquide-liquide, a été développé en utilisant de l'acétate d'éthyle pour l'extraction et une solution aqueuse de bicarbonate de sodium ($NaHCO_{3\ (sat,\ aq)}$) pour les lavages. La solution de $NaHCO_3$ permet de maintenir le pH basique pour éviter la déprotection des chaines latérales, ainsi que de diminuer la solubilité du peptide dans l'eau. Ces

propriétés (solubilité et stabilité) permettent aux azido-peptides **184** et **185**, et alcyne-peptides **186** d'être aussi purifiés sans déprotection ce qui n'était pas possible dans les stratégies précédentes. Une purification HPLC semi-préparative ou préparative n'est pas recommandée avec la faible solubilité dans l'eau des peptides **184**, **185** et **186** protégés. La seule possibilité a été l'utilisation de gel de silice avec des éluants organiques. Sachant que la silice est naturellement acide par les groupements silanols (pH). Sears *et al* ont mesurés par titration acido-basique le pH des silanols du gel de silice estimée entre pH 4 et 9.[577,578,579] En général, le gel de silice a un pH entre 4 et 6. Ce pH acide peut déprotéger les groupements protecteurs Trt et Boc. Les peptides **184**, **185** et **186** perdent le groupement protecteur Trt de l'histidine conduisant à des rendements de seulement 51% pour un éluant $CHCl_3/CH_3OH$ (96/04). Le gel de silice doit donc être basifié avec 1% de DIPEA dans le chloroforme. Une purification intermédiaire sur gel de silice basifié a été réalisée. Les peptides **184**, **185** et **186** ont été élués par un mélange $CHCl_3/CH_3OH$/DIPEA (96/04/0,1) avec des rendements de 89%. Un pourcentage plus élevé de base empêche une bonne séparation entre le produit et les impuretés.

En bilan, les peptides **184**, **185**, **186**, **187**, **188** et **189** ont été obtenus avec des rendements totaux de 43%, 35%, 34%, 74%, 58% et 59% à partir des peptides **164**, **165** et **166**. Les produits **187**, **188** et **189** ont été caractérisés par LC-MS. Les résultats sont présentés en figure 36.

[577] Sears, G. W. *Anal. Chem.* **1956**, *28* (12), 1981–1983.
[578] Kellum, G. E.; Hahn, J. R. *Anal. Chem.* **1968**, *40* (6), 952–956.
[579] Kobayashi, H. *J. Colloid Interface Sci.* **1993**, *156* (2), 294–298.

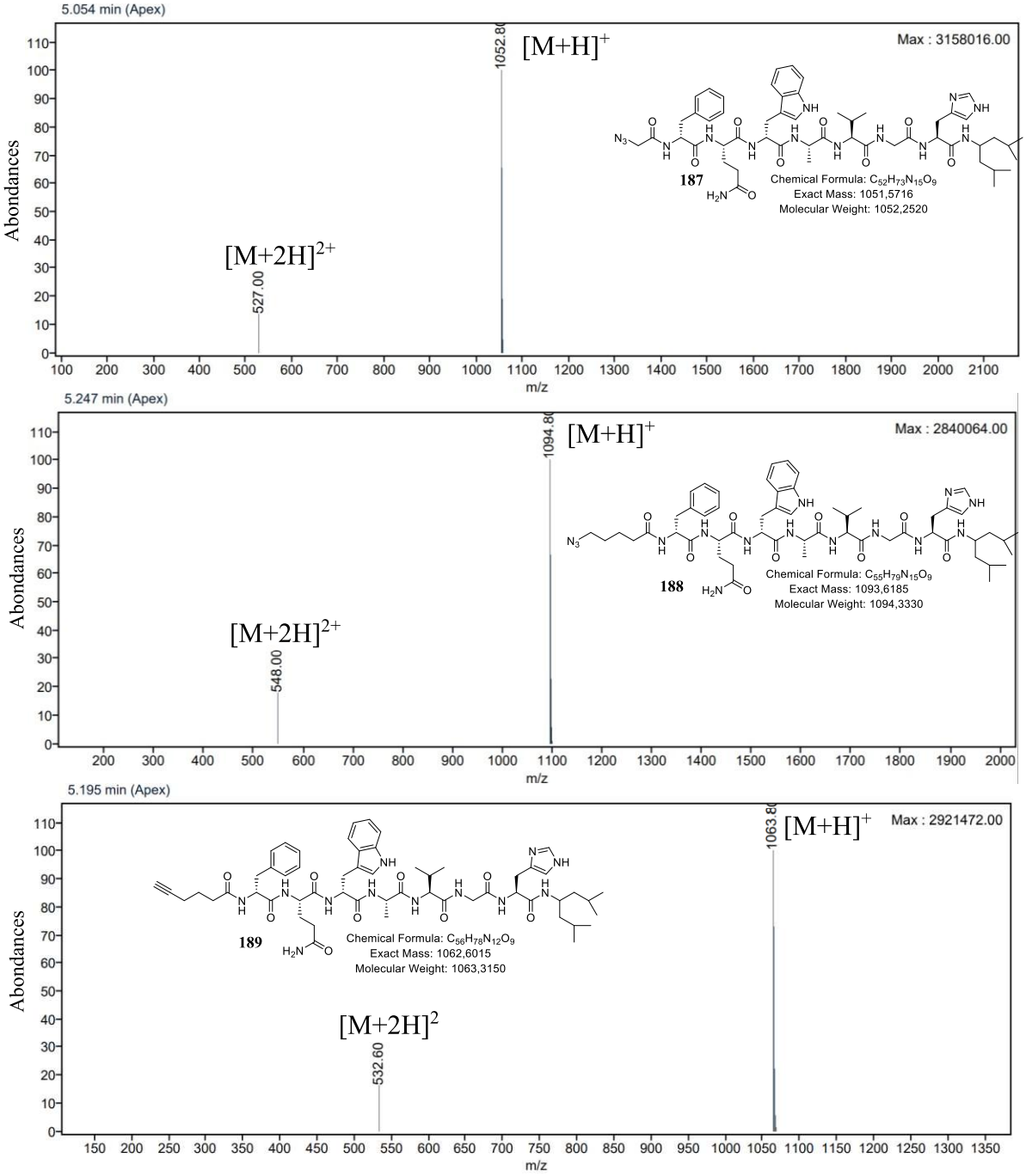


*Figure 36 : Analyses LC-MS des peptides **187**, **188** et **189**.*

b) Stratégie 2

La seconde stratégie repose sur le couplage en solution du peptide **136** avec l'acide 2-azidoacétique, l'acide 5-azidopentanoïque ou l'acide 5-hexynoïque, puis leur PEGylation via CuAAC. Cette stratégie est détaillée dans le schéma 98.

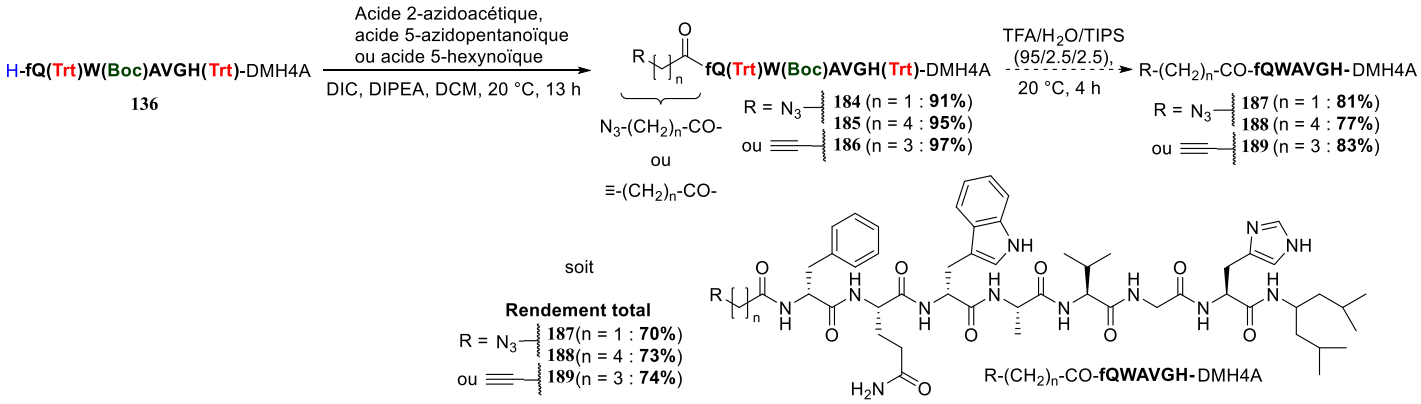


*Schéma 98 : Synthèse des peptides **184**, **185** et **186** suivant la stratégie 2.*

Le peptide **136** a été d'abord couplé avec l'acide 5-azidopentanoïque dans le DMF pendant 1 h en présence de DIPEA (8 equiv.) et de différents agents de couplages (4 equiv.) tels que DCC, EDC.HCl, DIC, HBTU, HATU, TBTU, TSTU, PyBOP ou $SOCl_2$. Les rendements en peptide **185** ont été respectivement de 18%, 16%, 24%, 10%, 7%, 68%, 45%, 20% et 1% comme reportés dans le tableau 39.

Entrée	Agent de couplage	Rendements (%)
1	$SOCl_2$	1
2	HATU	7
3	HBTU	10
4	EDC.HCl	16
5	DCC	18
6	PyBOP	20
7	DIC	24
8	TSTU	45
9	**TBTU**	**68**

Tableau 39 : Influence de l'agent de couplage sur la réactivité et la pureté en solution.

Les meilleures conversions ont été obtenues avec TBTU (Tableau 39 entrée 9). Cependant, le plus d'impuretés a été observé avec HATU, HBTU, PyBOP et TBTU (Tableau 39 entrée 2, 3, 6 et 9). Le TSTU conduit à la fraction d'un sous-produit non identifié à 43% (Tableau 39 entrée 8). Le meilleur compromis entre la pureté et la réactivité a été trouvé pour DIC avec un rendement de 24% (Tableau 39 entrée 7). La réaction est refaite avec DIC (4

equiv.) et DIPEA (32 equiv.) dans le DCM pendant 13 h avec un rendement de 95% en peptide **185**. Ce protocole optimisé a été ensuite appliqué à l'acide 2-azidoacétique et l'acide 5-hexynoïque avec des rendements respectivement de 91% en peptide **185** et 97% en peptide **186**.

Le traitement des peptides **184**, **185** et **186** par extraction liquide-liquide développé précédemment a ensuite été appliqué avec l'acétate d'éthyle pour l'extraction et une solution aqueuse de bicarbonate de sodium ($NaHCO_{3\ (sat,\ aq)}$) pour les lavages. Une purification sur gel de silice avec des éluants organiques $CHCl_3$/CH_3OH/DIPEA (96/04/0,1) a donné des rendements entre 81% et 89%. Les peptides **184**, **185** et **186** ont aussi été déprotégés des groupements Trt et Boc par un mélange TFA/TIPS/H_2O (v/v/v, 95/2.5/2.5) avec des rendements de 81% (**187**), 77% (**188**) et 83% (**189**). La prochaine étape a été tentée à la fois sur peptide protégé fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **184**, **185** et **186**, et déprotégé fQWAVGH **187**, **188** et **189** pour comparaison (symbolisé par une flèche en pointillé dans le schéma 98).

c) Conclusion

Entrée	Stratégie	Rendement total (%)					
		184	**185**	**186**	**187**	**188**	**189**
1	Stratégie 1	94	73	74	74	58	59
2	**Stratégie 2**	**91**	**95**	**97**	**70**	**73**	**74**

*Tableau 40 : Comparaison des deux stratégies de synthèse en solution des peptides **187**, **188** et **189**.*

En comparant les stratégies 1 et 2 de synthèse des peptides **187**, **188** et **189** (Tableau 40), la stratégie 2 conduit à des meilleurs rendements. En effet, dans cette stratégie, les étapes de clivage et de fonctionnalisation en C-terminal ont été faites en amont et ne sont pas inclus dans cette stratégie comparée à la stratégie 1. Elle nécessite donc qu'une étape pour différencier les composés tandis que la stratégie 1 nécessite 3 étapes. Cette stratégie 2 sera la seule retenue pour la suite de ce projet.

3.2.2. CuAAC d'azido-dPEG$_n$-amine

Une fois le peptide porteur d'un alcyne **186** obtenu, ce peptide a été couplé avec le 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine et le Boc-NH-dPEG$_{23}$-N$_3$ suivant la réaction de CuAAC présentée dans le schéma 99.

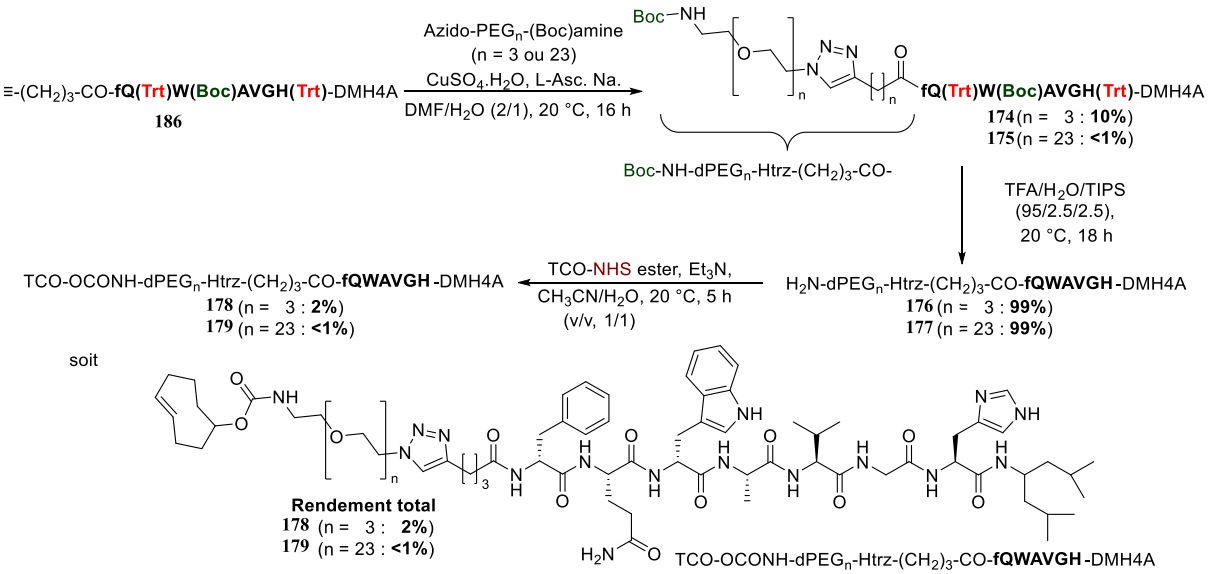


*Schéma 99 : CuAAC en solution entre l'alcyne-peptide **186** et le 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine.*

Entrée	Cuivre	Solvants	Rendement (%) en 174	Rendement (%) en 175
1	$CuSO_4$	DMF/H_2O (v/v, 2/1)	10	<1%
2		*t*BuOH/H_2O (v/v, 2/1)	22	-
3		DMF/THF (v/v, 1/1)	43	-
4	**CuI**	DMF/H_2O (v/v, 2/1)	21	-
5		DMF/THF (v/v, 1/1)	58	-
6		**Acétone/H_2O (v/v, 1/5)**	**99**	**98**

*Tableau 41 : Influence du cuivre et du solvant sur la synthèse du peptide **174**.*

La CuAAC est faite en présence de sulfate de cuivre(II) penta-hydraté (2 M) et du L-ascorbate de sodium (6 M) dans un mélange de DMF/H_2O (v/v, 2/1). Cette cycloaddition a formé les peptides **174** et **175** avec des rendements respectivement de 10% et <1% (Tableau 41 entrée 1). La réaction a été refaite en remplaçant le $CuSO_4$ par le CuI, en présence d'un ligand TBTA dans un mélange DMF/H_2O (v/v, 2/1) pendant 24 h. Le CuI a conduit à un rendement

de 21% (Tableau 41 entrée 4). Cette réaction a été reprise dans les mêmes conditions dans le DMF/THF (v/v, 1/1) avec un rendement de 58% (Tableau 41 entrée 5). Les meilleurs rendements ont été obtenus avec le CuI, le Na L-Asc et le TBTA en proportion 1/0.04/0.06/0.08 équivalent dans un mélange acétone/H_2O (v/v, 1/5) pendant 4 h avec des rendements de 99% en peptide **174** et 98% en peptide **175** (Tableau 41 entrée 6). Ensuite, l'utilisation d'un PEG-amine protégé a été comparée à un PEG-amine non protégé aucun changement du rendement n'a été observé. Enfin, l'utilisation du peptide déprotégé **189** à la place du peptide protégé **186** a donné des rendements légèrement plus faibles de 82% en peptide **174** et 87% en peptide **175**. La réaction optimisée est présentée dans le schéma 100.

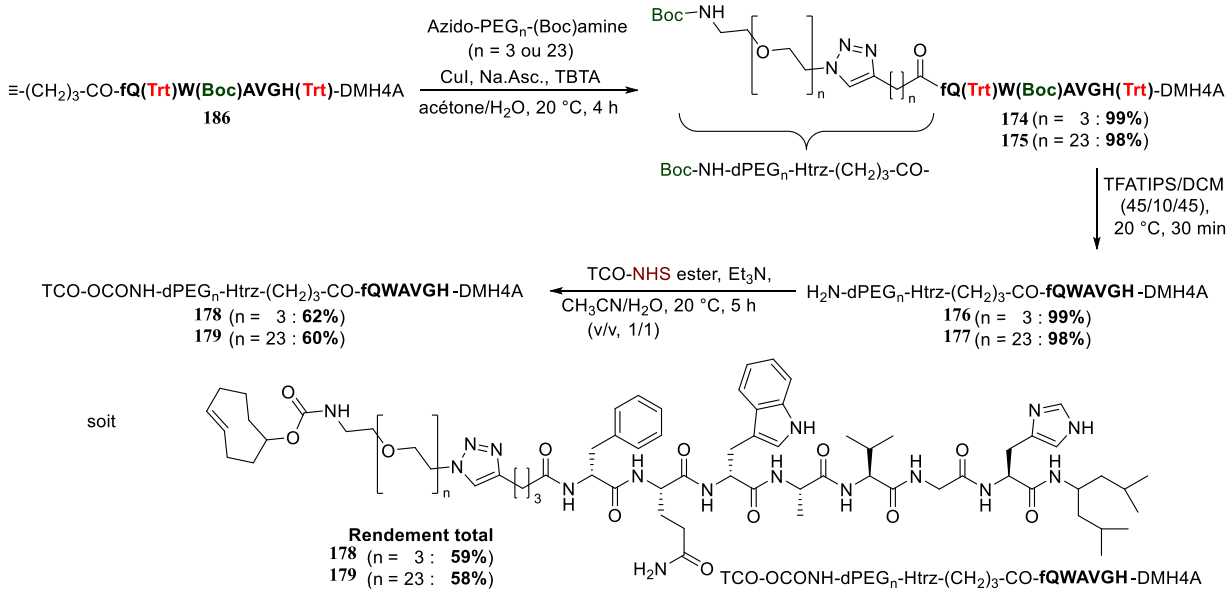


*Schéma 100 : CuAAC en solution entre l'alcyne-peptide **186** et le 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine.*

Sachant qu'une amine déprotégée et une cétone peuvent conduire à une imine, une analyse LC-MS du brut permettant de suivre la cinétique de la réaction a été effectuée. Aucune formation d'imines n'a été observée.

Comme pour les autres peptides fonctionnalisés par un PEG_n, ces peptides **174** et **175** dérivés de la séquence fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) sont déprotégés, neutralisés, fonctionnalisés en N-terminal par un TCO et purifiés comme présenté dans le schéma 100. Les peptides **174** et **175** ont été déprotégés par un mélange TFA/TIPS/DCM (v/v/v, 45/10/45) pendant au moins 30 min avec un rendement de 99% en peptide **176** et 98% en peptide **177**. Cependant un temps prolongé peut conduire à l'apparition de sous-produits. Après traitements et neutralisation de l'acidité, le couplage avec le TCO-NHS a donné des rendements de 62% pour le peptide **178** et 60% pour le peptide **179** en présence de Et_3N dans un mélange CH_3CN/H_2O (v/v, 1/1). Une perte de peptide en HPLC préparative dans les conditions précédemment optimisées a réduit le rendement de la dernière étape de synthèse à 59% **179** en peptide **178** et 58% en peptide **179**.

Les produits finaux **178** et **179** ont été caractérisés en LC-MS et sont présentés dans la figure 35. Ils présentent une pureté de 98% ou supérieur.

3.2.3. Conclusion

En comparant les résultats obtenus avec la CuAAC en SPPS et en solution (Tableau 42), la CuAAC en solution a donné les meilleurs rendements. Les rendements totaux sont aussi améliorés en solution. Ces résultats ne sont pas surprenants puisque la majorité de la littérature sur la PEGylation par CuAAC se fait déjà en solution. Ils confirment la tendance observée pour la réaction de couplage peptidique, en solution de meilleurs rendements ont été obtenus mais avec une moins bonne pureté.

Entrée	Stratégie	Rendement (%) sur 3 étapes		Rendement total (%)	
		174	175	178	179
1	SPPS	57	2	49	35
2	Solution	99	98	59	58

Tableau 42 : Comparaison de la CuAAC en SPPS et en solution.

3.3. Conclusion

En conclusion, la séquence peptidique fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) **108** a été fonctionnalisée suivant trois grandes stratégies de couplages (couplage peptidique, multi-couplage peptidique ou CuAAC). Parmi ces trois stratégies, la CuAAC a permis d'obtenir les peptides **178** et **179** avec le meilleur rendement total et donc la plus grande quantité produite. De plus, cette stratégie est applicable pour n'importe quelle longueur de PEG_n et reste très modulables pour synthétiser de nouveaux peptides **125**, **126**, **127**, **156**, **157**, **178** et **179** fonctionnalisés par des PEG_n. Chacune de ces stratégies a été réalisée en SPPS et en solution donnant de meilleurs résultats en solution et une meilleure pureté en SPPS. La SPPS reste la méthode la plus simple techniquement pour obtenir ces peptides, bien qu'elle ne soit adaptée qu'aux chaines PEG_n courtes (n = 8 et 12). La stratégie en solution reste plus adaptée pour les chaines PEG_n plus longues n = 24 et 36, bien que difficile à mettre en place en raison du Trt de l'histidine très labile. Chacune des étapes de chaque stratégie a été optimisée pour déterminer l'étape la plus limitante de ces synthèses peptidiques. Trois étapes clés ont permis d'améliorer leurs obtentions :

- le couplage peptidique avec l'agent de couplage TBTU, en présence d'additifs OxymaPure et d'un large excès de base DIPEA,
- le clivage avec le mélange FA/TFE/TIPS/DCM (v/v/v/v, 1/1/1/7) plus doux,
- la déprotection de Trt et Boc avec le mélange TFA/TFE/TIPS/DCM (v/v/v/v, 7/1/1/1).

Peu de changements ont été apportés aux autres étapes. Malheureusement, les rendements totaux de ces peptides **125**, **126**, **127**, **156**, **157**, **178** et **179** sont encore faibles en raison d'une perte très importante lors de la purification par HPLC préparative. Ces peptides **125**, **126**, **127**, **156**, **157**, **178** et **179** restent peu solubles dans l'eau et dans les solvants organiques, conduisant à leurs précipitations ou des larges pics peu intenses en HPLC. L'augmentation de la longueur de la chaine PEG_n augmente la solubilité dans l'eau et la polarité des molécules. L'utilisation de Kolliphor a augmenté la quantité de peptide collectée au détriment de la pureté du peptide. De même, l'ajout d'un faible pourcentage d'acide l'a également augmenté au détriment de l'isomérisation partielle du TCO en CCO.

D. Application IEDDA

Les peptides porteurs d'un TCO **125**, **126**, **127**, **156**, **157**, **178** et **179**, ont été engagés dans les réactions IEDDA avec des tétrazines commerciales. L'ensemble de ces peptides a au moins été testé une fois en IEDDA avec une cinétique inférieure à 5 min. Seuls les résultats des peptides fonctionnalisés par le PEG_n et le TCO les plus facilement disponibles en grandes quantités seront présentés dans la suite de ce manuscrit. Malheureusement, seuls les peptides porteurs d'un TCO **178** et **179** issus de la CuAAC ont été obtenus en assez grandes quantités pour des essais d'optimisation et de caractérisation avec une famille de tétrazines modèles. Nous ne présenterons donc que les résultats issus des peptides **178** et **179**. Cette partie présentera les résultats obtenus pour ces IEDDA, puis leurs radiochimies et les essais sur membranes en vue d'une application en pré-ciblage.

Litau *et al* ainsi que Handula *et al* ont déjà décrit le protocole de la IEDDA entre un analogue de la bombésine fonctionnalisé par un TCO-$dPEG_4$ et des tétrazine fonctionnalisée par un chélate DOTA.[487] Le TCO-$dPEG_4$-peptide et des DOTA-tétrazines réagissent dans un mélange CH_3CN/H_2O (v/v, 1/1) à 37 °C pendant 10 min et 1 h. Litau *et al* obtiennent respectivement les rendements de 67% et 94% tandis que Handula *et al* obtiennent 63% et 93%. D'autres conditions sont aussi couramment utilisées avec des DOTA-tétrazines telles que des mélanges CH_3CN/PBS (v/v, 1/1) à 37 °C pendant 15 min.[580,581] Ces deux conditions sont classiques dans la littérature.[582,583,584,585]

La réaction IEDDA a été d'abord testée et optimisée entre les peptides porteurs d'un TCO **178** et **179**, et quatre tétrazines commerciales. Ces tétrazines commerciales sont la 3,6-dichloro-1,2,4,5-tétrazine, l'hydrochlorure de (4-(1-2,4,5-tétrazin-3-yl)phényl)méthanamine, l'ester méthyltétrazine-NHS et la 2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl 5-[4-(1,2,4,5-tétrazin-3-

[580] 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.
[581] Evans, H. L.; Nguyen, Q.-D.; Carroll, L. S.; Kaliszczak, M.; Twyman, F. J.; Spivey, A. C.; Aboagye, E. O. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (67), 9557–9560.
[582] Bilton, H. A.; Ahmad, Z.; Janzen, N.; Czorny, S.; Valliant, J. F. *J. Vis. Exp.* **2017**, *120* (1), e55188–e55195.
[583] Läppchen, T.; Rossin, R.; van Mourik, T. R.; Gruntz, G.; Hoeben, F. J. M.; Versteegen, R. M.; Janssen, H. M.; Lub, J.; Robillard, M. S. *Nucl. Med. Biol.* **2017**, *55* (1), 19–26.
[584] Vu, T. T.; Gulfam, M.; Jo, S.-H.; Park, S.-H.; Lim, K. T. *Carbohydr. Polym.* **2022**, *278* (1), 118964–118977.
[585] Ali, I.; Gulfam, M.; Jo, S.-H.; Seo, J.-W.; Rizwan, A.; Park, S.-H.; Lim, K. T. *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *219* (1), 109–120.

yl)benzylamino]-5-oxopentanoate. Chaque tétrazine a réagi avec les peptides **178** et **179** (n = 3 ou 23) en proportion équimolaire à une même concentration de C = 10^{-3} M. Après 3 min à 37 °C, la réaction IEDDA est quantitative (99%) dans un mélange CH_3CN/PBS (v/v, 1/1). Le PBS est un tampon permettant de fixer le pH à 7,4 similaires au pH sanguin rencontré *in vivo*.[586] Les produits obtenus à partir des peptides **178** et **179** sont les peptides **199** et **200**. Les résultats pour les peptides **199** et **200** sont présentés dans le schéma 101.

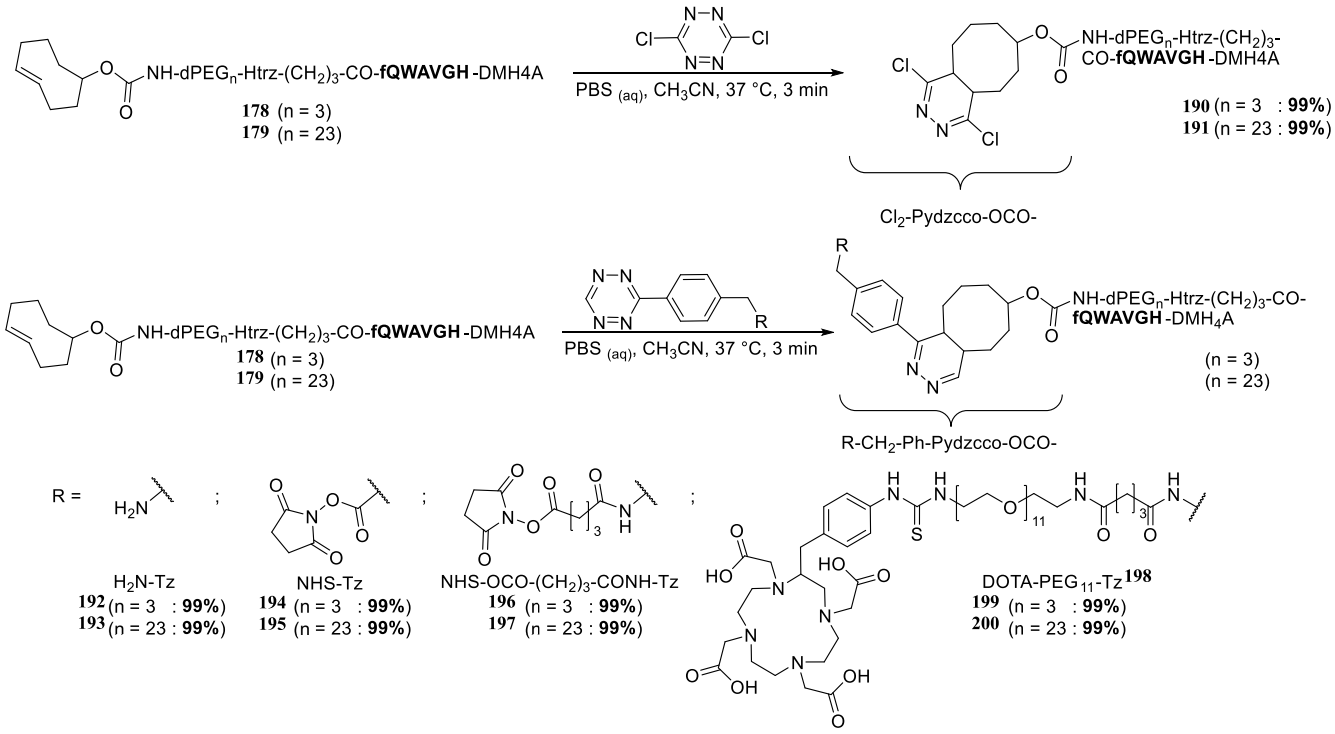


*Schéma 101 : Réaction IEDDA entre les peptides porteurs d'un TCO **178** et **179** issus de la CuAAC et quatre tétrazines commerciales.*

La formation de tous les produits a été confirmée par LC-MS. Les résultats sont quantitatifs et résumés dans la figure 37. Les peptides **178** et **179** synthétisés ont donc été réactifs avec des tétrazines. Cela confirme que le TCO est bien présent et ne s'est pas isomérisé durant la synthèse.

[586] Atherton, J. C. *Anaesth. Intensive Care Med.* **2009**, *10* (11), 557–561.

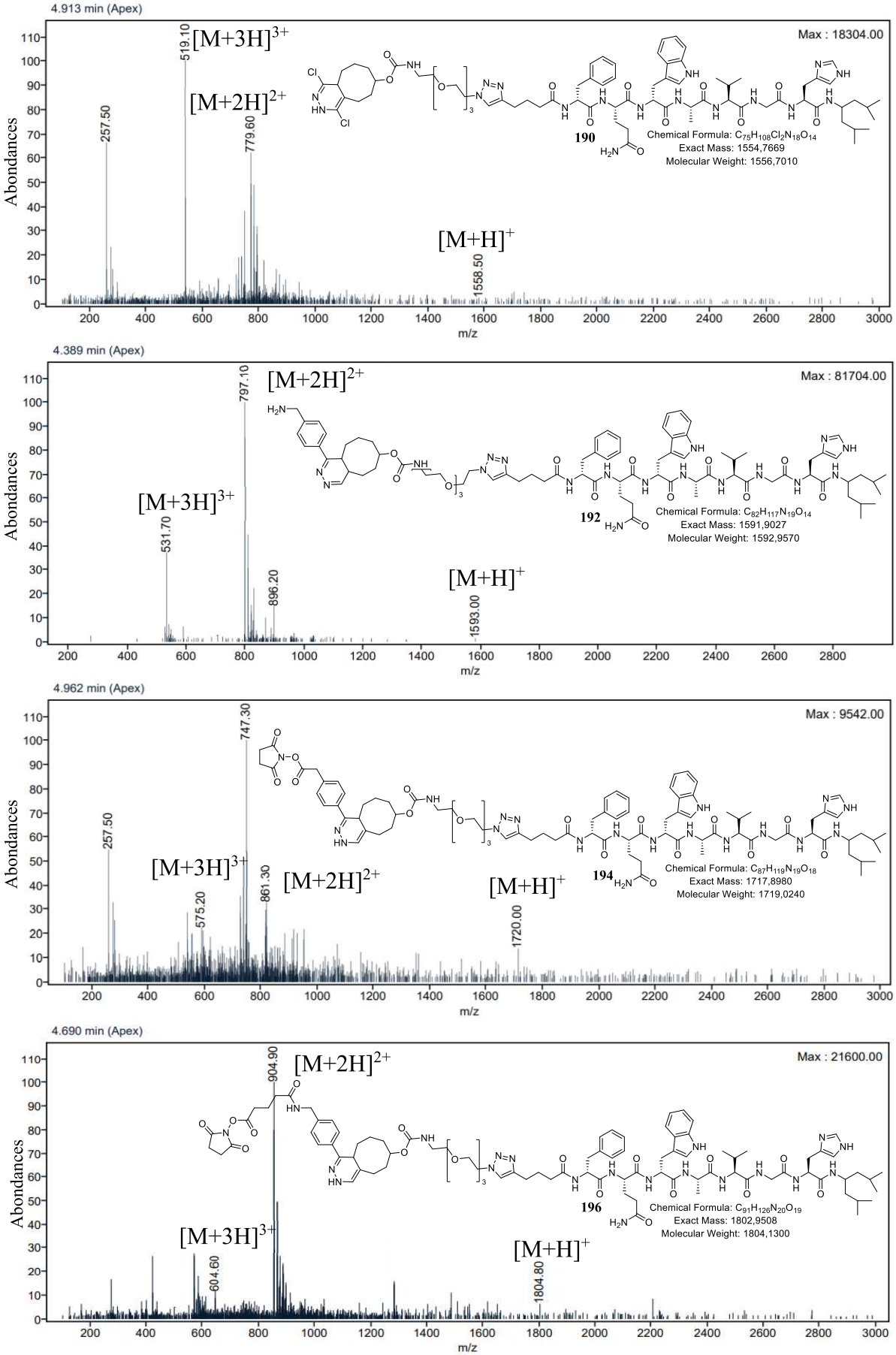


*Figure 37 : Analyses LC-MS des produits de IEDDA entre le peptide **178** issus de la CuAAC et quatre tétrazines commerciales.*

Les mêmes résultats ont été observés pour le peptide **179** dont les analyses de masse sont présentées dans la figure 38.

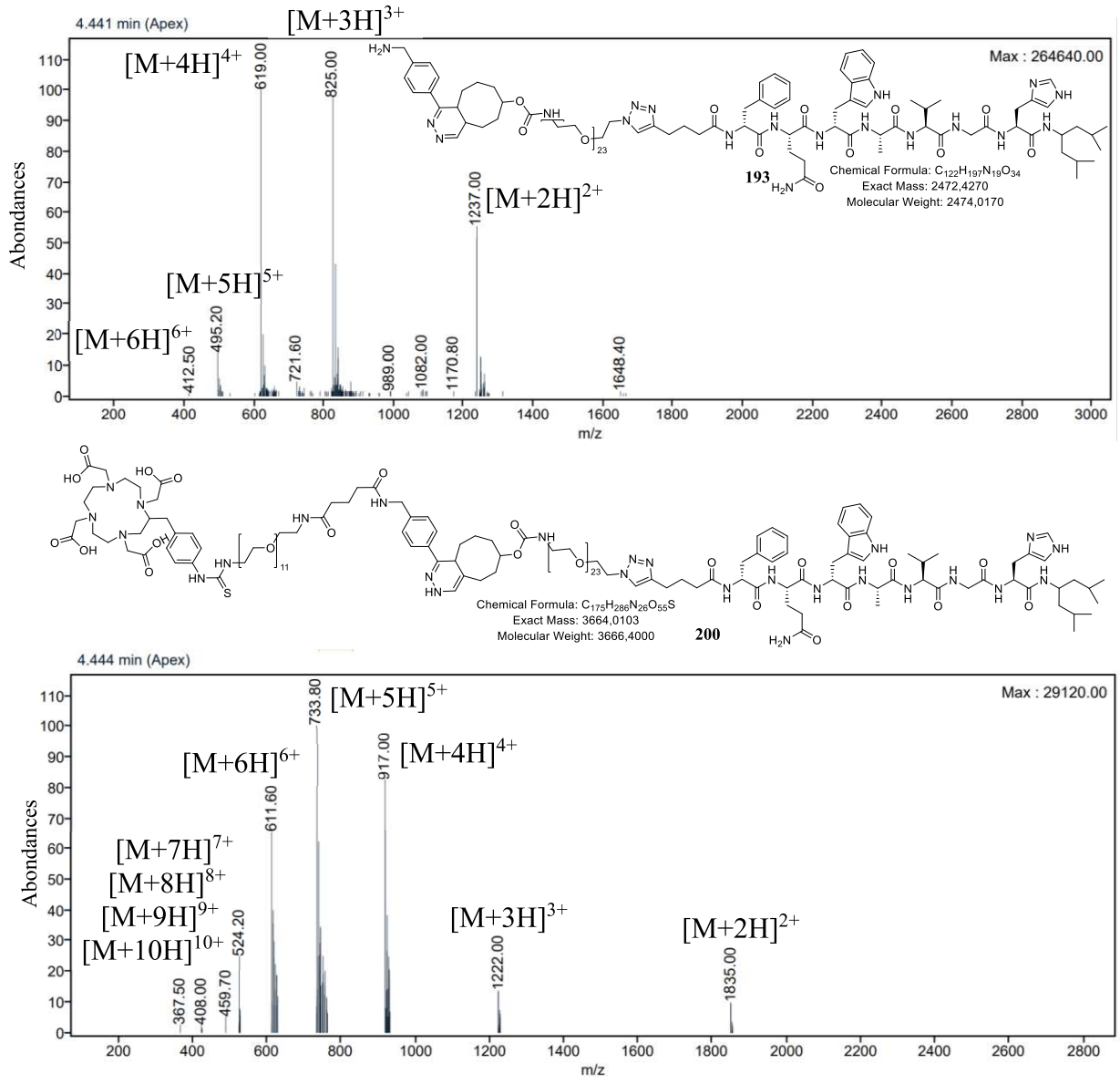


*Figure 38: Analyses LC-MS des produits de IEDDA entre le peptide **179** issus de la CuAAC et quatre tétrazines commerciales.*

Une fois la réactivité des peptides **178** et **179** confirmée, la réaction IEDDA avec la tétrazine 198 a été réalisée dans les mêmes conditions. La tétrazine 198 est un analogue de la DOTA-dPEG$_7$-Tz déjà utilisé pour des applications en imagerie et en théranostiques.[587,588,589,590,591,592] De même, cette structure reste similaire à la NOTA-dPEG$_{11}$-

[587] Poty, S.; Membreno, R.; Glaser, J. M.; Ragupathi, A.; Scholz, W. W.; Zeglis, B. M.; Lewis, J. S. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (21), 2599–2602.
[588] Membreno, R.; Cook, B. E.; Fung, K.; Lewis, J. S.; Zeglis, B. M. *Mol. Pharm.* **2018**, *15* (4), 1729–1734.
[589] Membreno, R.; Keinänen, O. M.; Cook, B. E.; Tully, K. M.; Fung, K. C.; Lewis, J. S.; Zeglis, B. M. *Mol. Pharm.* **2019**, *16* (5), 2259–2263.
[590] Keinänen, O.; Brennan, J. M.; Membreno, R.; Fung, K.; Gangangari, K.; Dayts, E. J.; Williams, C. J.; Zeglis, B. M. *Mol. Pharm.* **2019**, *16* (10), 4416–4421.
[591] Sarrett, S. M.; Keinänen, O.; Dayts, E. J.; Dewaele-Le Roi, G.; Rodriguez, C.; Carnazza, K. E.; Zeglis, B. M. *Nat. Protoc.* **2021**, *16* (7), 3348–3381.
[592] Izawa, A.; Ogawa, Y.; Ichikawa, H.; Kawatani, M.; Takemori, H.; Okumura, Y. WO2021075546A1, **2021**.

Tz elle aussi déjà utilisée dans ces applications.[166,593,594] Après 3 min, la réaction IEDDA est quantitative (99%) à 37 °C dans un mélange CH_3CN/PBS (v/v, 1/1). La LC-MS a confirmé le produit final **200** comme montré dans la figure 38. Le produit **200** a été ensuite purifié par HPLC préparative pour fournir une référence en radiochimie.

E. Radiochimie de l'indium-111 (^{111}In) et du lutétium-177 (^{177}Lu)

Dans la littérature, plusieurs publications décrivent le marquage de tétrazine fonctionnalisée par un PEG_n et un DOTA pour la IEDDA avec un TCO-anticorps. Les seuls isotopes utilisés dans ces publications sont l'actinium-225 (^{225}Ac), le lutétium-177 (^{177}Lu) et l'indium-111 (^{111}In).[587,595,596] Le marquage de DOTA-$dPEG_7$-tétrazine par le ^{177}Lu suivie de la IEDDA avec un TCO-peptide a été décrit par Houghton *et al*, Membreno *et al*, Keinanen *et al*, Izawa *et al*, et Sarrett *et al*.[588,589,590,591,592,597,598] Cependant une seule publication décrit le marquage de DOTA-$dPEG_4$-tétrazine avec l'^{111}In.[487] A notre connaissance, il n'existe pas d'autres longueurs de chaines PEG_n utilisées pour ces marquages. Nous avons donc adapté leurs protocoles à notre cas.

Seuls les peptides **178** et **179** (avec n = 3 ou 23) issus de la CuAAC ont été obtenus en assez grande quantité pour être testés en radiochimie. Ces peptides **178** et **179** ont été marqués suivant deux approches (Schéma 102).

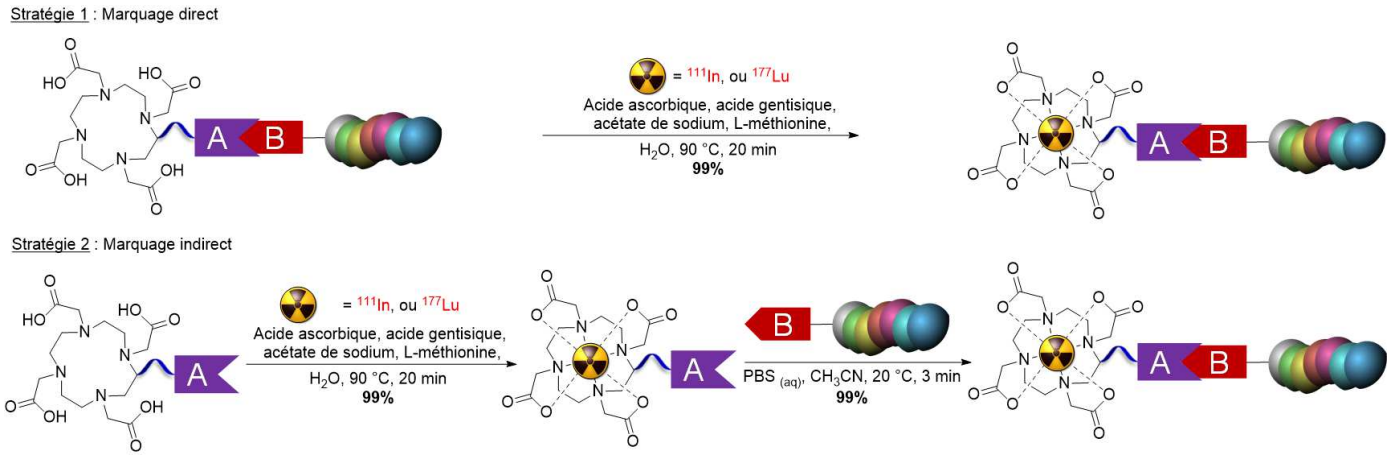


Schéma 102 : Stratégies de marquage utilisées pour marquer les peptides.

[593] Zeglis, B.; Lewis, J.; Reiner, T.; Houghton, J. L.; Meyer, J.-P.; Brand, C. WO2016182804A1, **2016**.
[594] Meyer, J.-P.; Tully, K. M.; Jackson, J.; Dilling, T. R.; Reiner, T.; Lewis, J. S. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29* (2), 538–545.
[595] Cook, B. E.; Membreno, R.; Zeglis, B. M. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29* (8), 2734–2740.
[596] Poty, S.; Carter, L. M.; Mandleywala, K.; Membreno, R.; Abdel-Atti, D.; Ragupathi, A.; Scholz, W. W.; Zeglis, B. M.; Lewis, J. S. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25* (2), 868–880.
[597] Houghton, J. L.; Membreno, R.; Abdel-Atti, D.; Cunanan, K. M.; Carlin, S.; Scholz, W. W.; Zanzonico, P. B.; Lewis, J. S.; Zeglis, B. M. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16* (1), 124–133.
[598] Membreno, R.; Cook, B. E.; Zeglis, B. M. *J. Vis. Exp.* **2019**, *143* (1), 59041–59067.

1. Marquage direct

La première approche (Schéma 102) utilise le marquage direct du produit de la réaction IEDDA obtenu dans la partie précédente. Pour cette approche, les conditions de marquage usuellement utilisées au laboratoire pour le peptide NeoBOMB1 ont été adaptées aux peptides **199** et **200** (Schéma 103).[487,599]

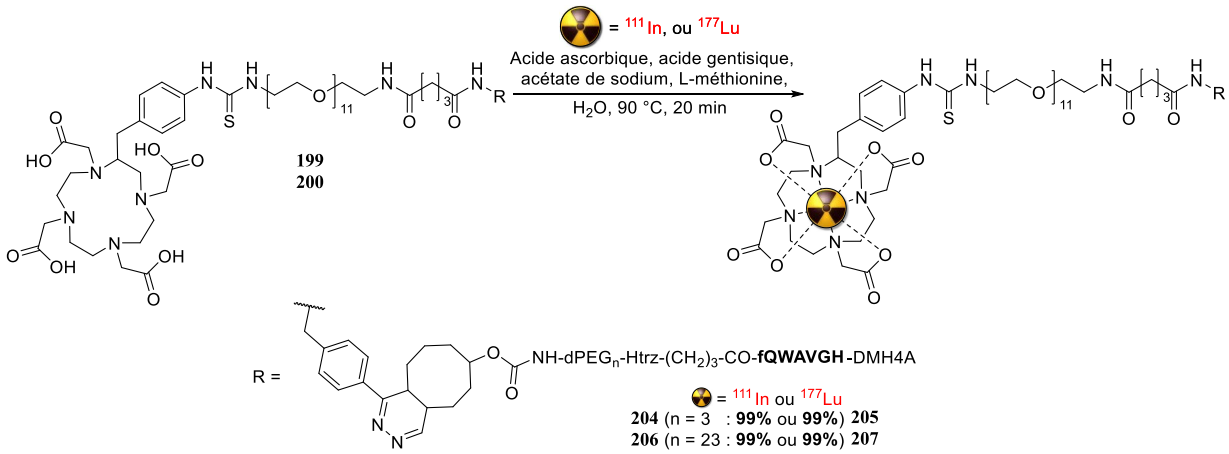


*Schéma 103 : Marquage direct des peptides **199** et **200** (avec n = 3 ou 23) par l'indium-111 (^{111}In) ou le lutétium-177 (^{177}Lu).*

Ces conditions ont été basées sur une approche précédemment publiée par Castaldi *et al.*[600,601] Ainsi un mélange d'acide ascorbique et d'acide gentisique (Gz/Asc, 50 mM), l'acétate de sodium (2,5 M), la L-méthionine (50 mM), et les peptides **199** (n = 3) ou **200** (n = 23) en solution dans l'eau sont d'abord mélangés. Ensuite, le [^{111}In]InCl$_3$ ou le [^{177}Lu]LuCl$_3$ préalablement dilués dans une solution de HCl (1 M, 1 mL) est ajoutés. Le volume d'eau approprié a été calculé en fonction de la concentration de radioactivité de la solution [^{111}In]InCl$_3$ ou [^{177}Lu]LuCl$_3$. En règle générale, 60 à 110 µL d'eau pour un volume total de 140 µL et une activité comprise entre 8 à 40 MBq ont été utilisés. Le mélange réactionnel a ensuite été chauffé pendant 1 à 30 min entre 20 et 110 °C (résultats non présentés). Le meilleur marquage a été obtenu pour le peptide **200** à 90 °C pendant 20 min correspondant à un RCY de 99% et une RCP supérieure à 98% (Tableau 43 entrée 1). Après marquage, une solution d'acide diéthylènetriamine-pentaacétique (DTPA) dans l'eau permet de piéger les radiométaux restés libres.[602,603] L'acétate de sodium est un sel basique permettant de tamponner le pH à 5-6, similaire aux pH physiologiques, couramment utilisés en radiochimie.[604] Le marquage avec les radiométaux des chélates dérivés de DOTA nécessite toutefois des conditions légèrement

[599] Blois, E. de; Chan, H. S.; Konijnenberg, M.; Zanger, R. de; Breeman, W. A. P. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12* (23), 2677–2685.
[600] Baudhuin, H.; Cousaert, J.; Vanwolleghem, P.; Raes, G.; Caveliers, V.; Keyaerts, M.; Lahoutte, T.; Xavier, C. *Pharmaceuticals* **2021**, *14* (5), 448.
[601] Pawlak, D.; Rangger, C.; Kolenc Peitl, P.; Garnuszek, P.; Maurin, M.; Ihli, L.; Kroselj, M.; Maina, T.; Maecke, H.; Erba, P.; Kremser, L.; Hubalewska-Dydejczyk, A.; Mikołajczak, R.; Decristoforo, C. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *85* (1), 1–9.
[602] Breeman, W. A. P.; de Jong, M.; Visser, T. J.; Erion, J. L.; Krenning, E. P. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30* (6), 917–920.
[603] Breeman, W. A.; van der Wansem, K.; Bernard, B. F.; van Gameren, A.; Erion, J. L.; Visser, T. J.; Krenning, E. P.; de Jong, M. *Eur. J. Nucl. Med.* **2003**, *30* (2), 312–315.
[604] Breeman, W. A. P.; de Jong, M.; de Blois, E.; Bernard, B. F.; Konijnenberg, M.; Krenning, E. P. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2005**, *32* (4), 478–485.

acides.[599] De plus, l'acide ascorbate permet de limiter la radiolyse du peptide marqué.[599,605,606,607] De même, l'acide gentisique la limite aussi.[599,605] La L-méthionine est utilisée comme un réducteur (antioxydant naturel) et permet d'éviter des réactions parasites.[599,608,609,610]

Après marquage, un contrôle qualité des produits marqués **[^{111}In]206** et **[^{177}Lu]207** a été effectué par HPLC analytique et radio-CCM pour déterminer le rendement radiochimique (RCY) évalué à 99% et la pureté radiochimique (RCP) trouvée supérieure à 98% (Tableau 43 entrée 2).

Les deux protocoles de marquages ont conduit aux produits marqués **[^{111}In]206** et **[^{177}Lu]207** (t_R = 8 min) avec un rendement quantitatif de 95-99% et une pureté radiochimique de 97-99%. Ces résultats sont présentés dans le tableau 43 et la figure 39, avec à gauche l'indium-111 **[^{111}In]206** et à droite le lutétium-177 **[^{177}Lu]207**.

Entrée	Réactifs	Temps (min)	Rendement RCY (%)	
			[^{111}In]206	[^{177}Lu]207
1	• Acide ascorbique et acide gentisique (Gz/Asc, 50 mM) • Acétate de sodium (2,5 M) • L-méthionine (50 mM)	20	99	99
2	• Acide ascorbique et acide gentisique (Gz/Asc, 50 mM) • Éthanol	20	99	99

*Tableau 43 : Essais de marquages directs à 90 °C du peptide **200** (n = 23).*

[605] Liu, S.; Edwards, D. S. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12* (4), 554–558.
[606] Liu, S.; Ellars, C. E.; Edwards, D. S. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14* (5), 1052–1056.
[607] Chen, J.; Linder, K. E.; Cagnolini, A.; Metcalfe, E.; Raju, N.; Tweedle, M. F.; Swenson, R. E. *Appl. Radiat. Isot.* **2008**, *66* (4), 497–505.
[608] Reiter, R. J. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2003**, *17* (2), 273–285.
[609] Reiter, R. J.; Tan, D.-X.; Mayo, J. C.; Sainz, R. M.; Leon, J.; Czarnocki, Z. *Acta Biochim. Pol.* **2003**, *50* (4), 1129–1146.
[610] Keithahn, C.; Lerchl, A. *J. Pineal Res.* **2005**, *38* (1), 62–66.

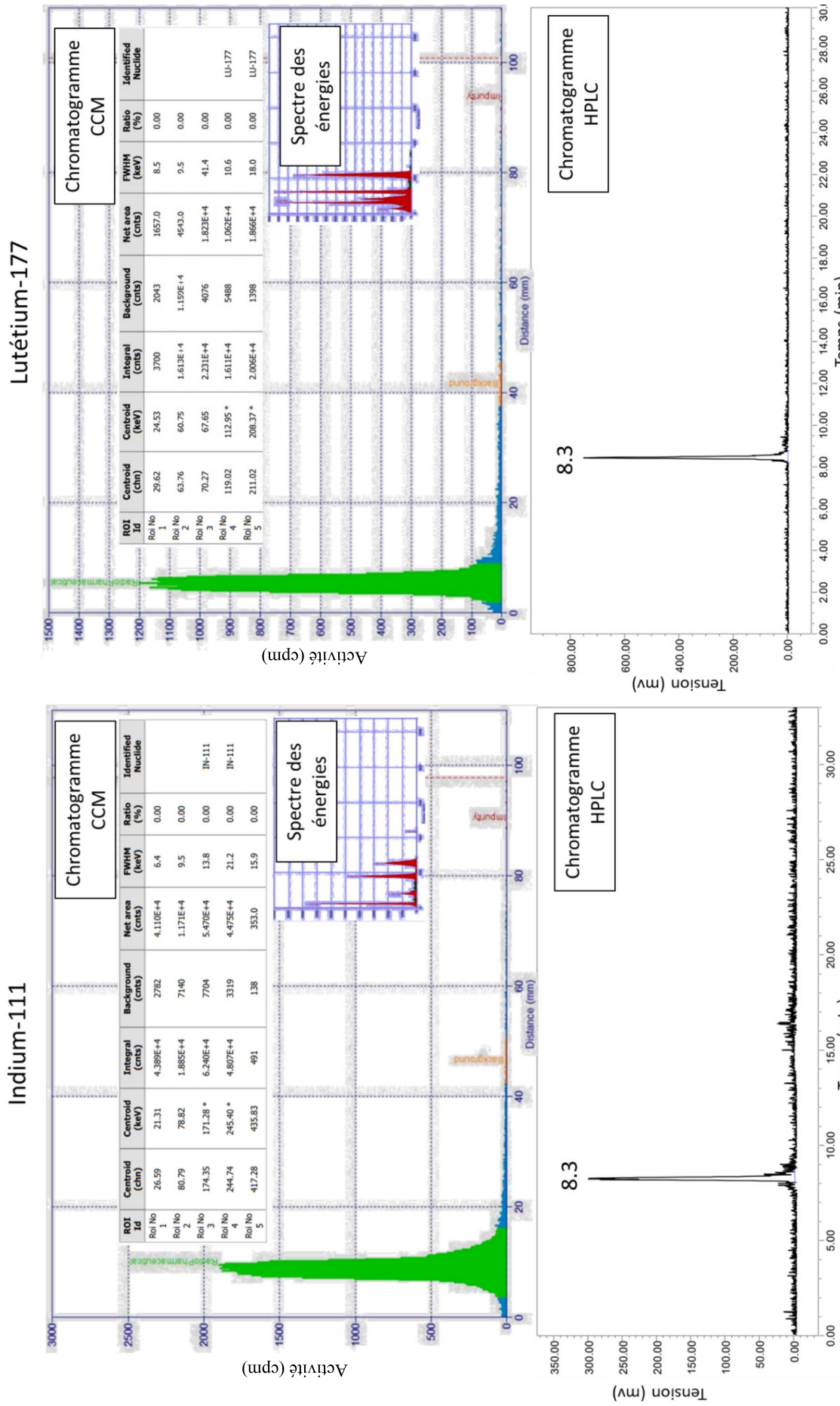


Figure 39: Contrôle qualité issus du marquage directe des DOTA-PEG11-NH-CH2-Ph-pydzcco-NH-(CH2)2-PEGn-HTrz-(CH2)3-fQWAVGH-DMH4A ***[111In]206*** *et* ***[177Lu]207*** *(n = 23).*

2. Marquage indirect

La seconde approche de marquage commence par le marquage de la DOTA-dPEG$_{11}$-Tz 198 suivant les conditions précédemment décrites (Schéma 104).

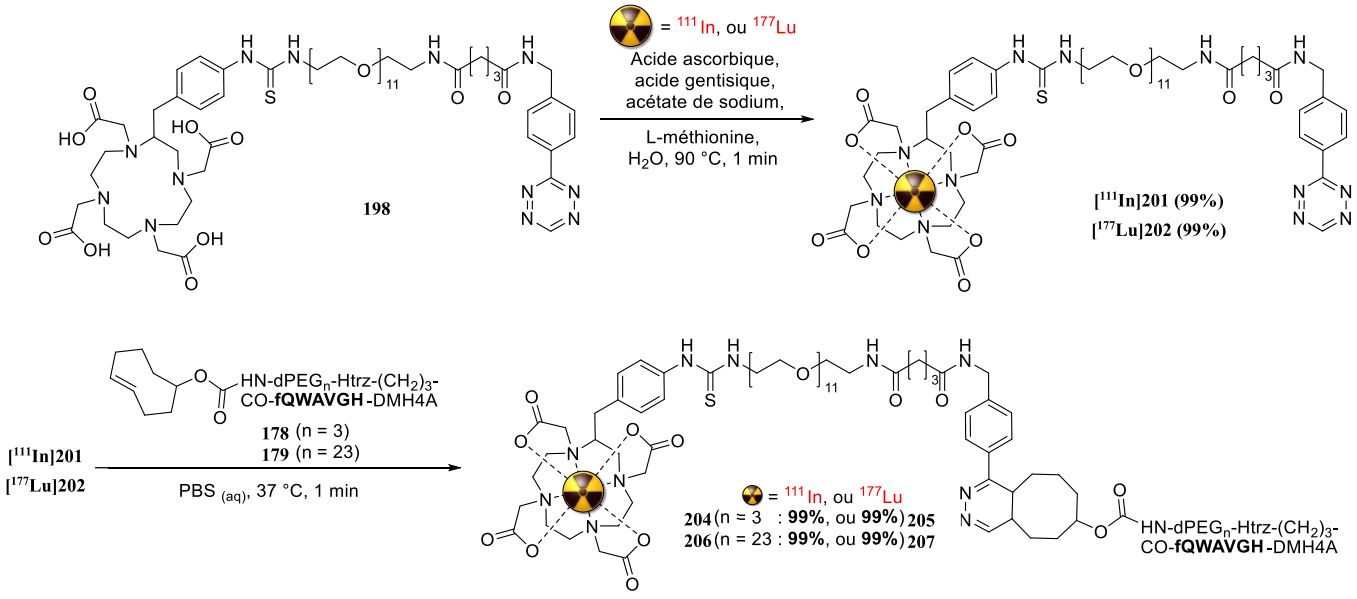


*Schéma 104 : Marquage indirect des peptides **178** et **179** (avec n = 3 ou 23) par l'indium-111 (^{111}In) **201** ou le lutétium-177 (^{177}Lu) **202**.*

Un mélange d'acide ascorbique et d'acide gentisique (Gz/Asc, 50 mM), l'acétate de sodium (2,5 M), la L-méthionine (50 mM) et la tétrazine 198 sont d'abord solubilisés dans l'eau avant d'introduire le [^{111}In]InCl$_3$ ou le [^{177}Lu]LuCl$_3$ préalablement dilué dans une solution de HCl (1 M, 1 mL). Le volume d'eau approprié a été calculé en fonction de la concentration de radioactivité de la solution [^{111}In]InCl$_3$ ou le [^{177}Lu]LuCl$_3$. En règle générale, 60 à 110 µL d'eau pour un volume total de 140 µL et une activité comprise entre 8 et 40 MBq ont été utilisés. Le mélange réactionnel a ensuite été chauffé pendant 1 à 30 min entre 20 et 110 °C. La réaction a donné de faibles rendements en tétrazines **[^{111}In]201** et **[^{177}Lu]202** entre 5 et 10% (Tableau 44 entrée 1-3). Le faible rendement peut être expliqué par l'apparition de nombreux pics de sous-produit (Schéma 105 à droite). Ce marquage a aussi été réalisé avec uniquement l'acide ascorbique, l'acide gentisique, l'acétate de sodium et la tétrazine 198 dans l'eau à 90 °C pendant 1 min avec un rendement de 60% pour la tétrazine marquée **[^{111}In]201** et 58% pour la tétrazine marquée **[^{177}Lu]202** (Tableau 44 entrée 4). Dans ces conditions, les pics de t_R > 13 min ont été largement réduits (Schéma 105). La tétrazine 198 dans l'éthanol pendant 1 min a conduit aux rendements de 45% pour la tétrazine marquée **[^{111}In]201** et 41% pour la tétrazine marquée **[^{177}Lu]202** (Tableau 44 entrée 5). Dans ces conditions, le seul autre pic radioactif en HPLC est le DTPA avec 55% et 59%. Le meilleur marquage a été obtenu avec un mélange d'acide

ascorbique et d'acide gentisique (Gz/Asc, 50 mM) et la tétrazine 198 dans un mélange éthanol et eau (v/v, 1/10) à 90 °C pendant 1 min (Tableau 44 entrée 6). Après marquage, une solution de DTPA a été ajoutée. Ce marquage optimisé a donné un rendement quantitatif de 99% et une pureté radiochimique supérieur à 98% en tétrazine marquée **[^{111}In]201** et **[^{177}Lu]202** (Schéma 105 à gauche en étape 1).

Entrée	Réactifs	Temps (min)	Rendement RCY (%)	
			[^{111}In]201	[^{177}Lu]202
1	• Acide ascorbique et acide gentisique (Gz/Asc, 50 mM) • Acétate de sodium (2,5 M) • L-méthionine (50 mM)	30	5	6
2		15	10	10
3		1	2	3
4	• Acide ascorbique et acide gentisique (Gz/Asc, 50 mM) • Acétate de sodium (2,5 M)	1	60	58
5	• Éthanol/H_2O (v/v, 1/10)	1	45	41
6	• Acide ascorbique et acide gentisique (Gz/Asc, 50 mM) • Éthanol/H_2O (v/v, 1/10)	1	99	99

Tableau 44 : Essais de marquages directs à 90 °C de la DOTA-dPEG$_{11}$-Tz 198.

Après confirmation du contrôle qualité, la réaction IEDDA entre les tétrazines **[^{111}In]201** ou **[^{177}Lu]202**, et les peptides porteurs d'un TCO **178** et **179** (avec n = 3 ou 23) a été faite dans le PBS à 37 °C pendant 1 min. La réaction IEDDA a été quantitative (99%) avec une pureté du produit final **[^{111}In]206** et **[^{177}Lu]207** supérieur à 98% (Schéma 105 à gauche étape 2). Ces différentes étapes sont facilement contrôlées par HPLC (Schéma 105).

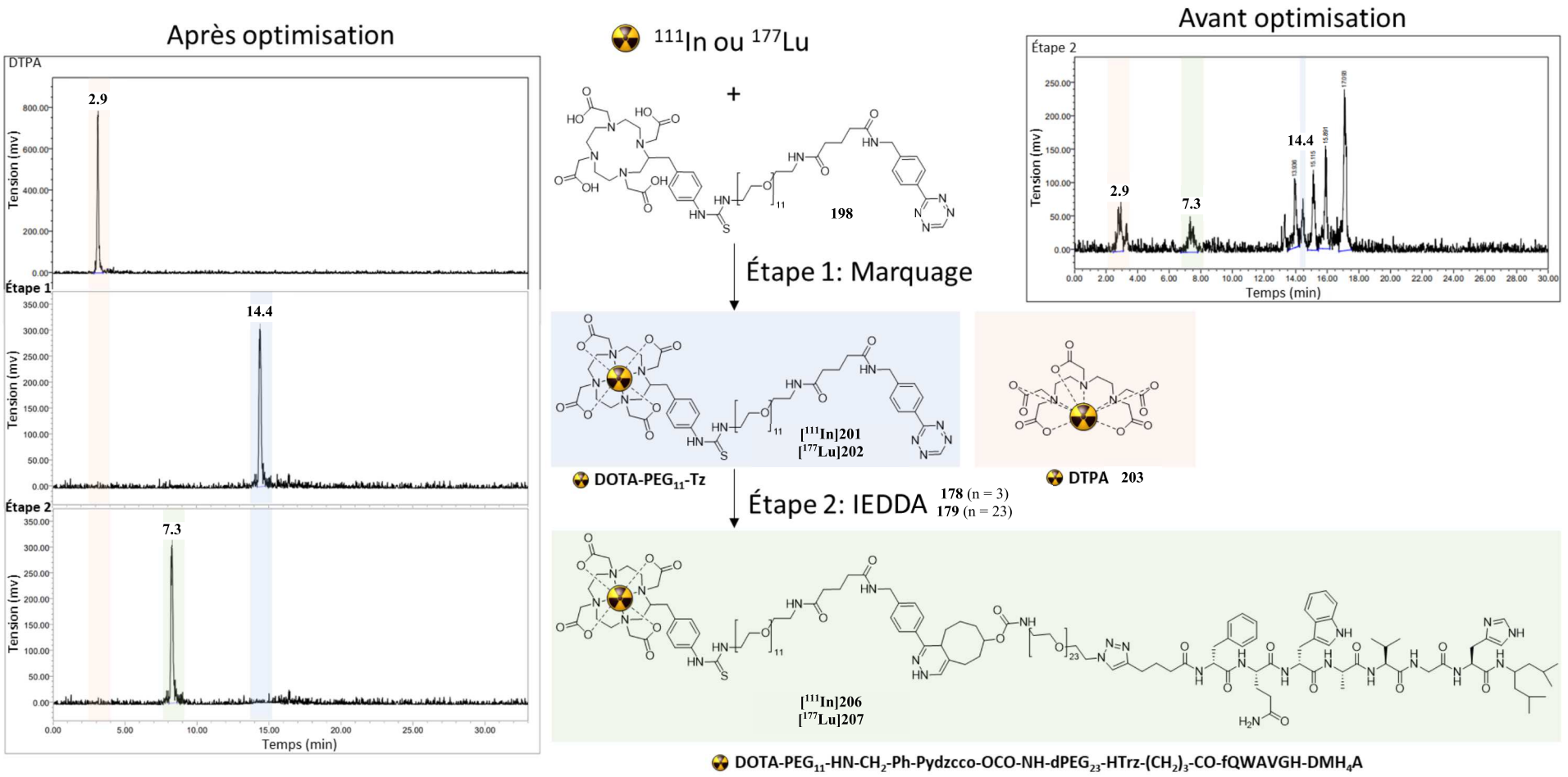


Schéma 105 : Suivie par HPLC de la stratégie de marquage par l'indium-111 (^{111}In) ou le lutétium-177 (^{177}Lu) via IEDDA.

3. Conclusion

En comparant le schéma 105 avec la figure 39, les temps de rétention des produits **[^{111}In]206** et **[^{177}Lu]207** de IEDDA (étape 2) ont été identiques (t_R = 8,3 min). Ceci permet d'attribuer de manière certaine les pics des produits **[^{111}In]206** et **[^{177}Lu]207** sur des chromatogrammes complexes (par comparaison directe ou co-injection) comme nous avons pu l'avoir avant optimisation des protocoles. Cette seconde stratégie de marquage par IEDDA avec l'indium-111 (^{111}In) a été appliquée à des essais *in vitro*.

F. Tests *in vitro*

Les tests *in vitro* ont été réalisés par nos collaborateurs de l'équipe biologie d'Erasmus MC sur des cellules PC-3 (c'est-à-dire des cellules épithéliales d'adénocarcinome de la prostate d'origine humaine positives au GRPR). Par la suite, les cellules (2,5 x 10^5 cellules/puits) sont incubées dans 0,5 mL de milieu d'incubation (Ham's F-12K, 20 mM HEPES, 1% BSA, pH 7,4) à 37 °C pendant 1 h. Ensuite, des concentrations croissantes de TCO-PEG$_n$-NeoBOMB1 avec n = 8 ou 12 (10^{-12} à 10^{-6} M) ou NeoBOMB1 de base sans TCO (témoin positif) sont ajoutées et incubés à 37 °C pendant 1 h. Le [^{111}In]In-NeoBOMB1 (10^{-9} M) est ajouté en quantité croissante à chaque puit. Après incubation, le milieu a été retiré et les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS froid. Pour déterminer la quantité d'activité absorbée par les cellules, les cellules ont été lysées à l'aide d'une solution de NaOH (1 M) à 20 °C pendant 30 min. Les fragments de membranes sont collectés et mesurés dans un compteur γ. Les résultats sont exprimés en pourcentage de dose ajoutée (%AD) et ont été normalisés à l'absorption du [^{111}In]In-NeoBOMB1. Les données représentent la moyenne ± écart-type en triplicata. Ces données permettent de tracer après analyse statistique (GraphPad Prism) la figure 40. Cette figure permet de déterminer la concentration pour laquelle 50% des récepteurs ciblés sont occupés par une molécule pouvant se lier à eux. Cette concentration définit la concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) représentant l'affinité biologique du peptide pour son récepteur. Pour chaque peptide, son affinité pour une cible spécifique, c'est-à-dire au récepteur relarguant de la gastrine (GRPR) a ainsi été déterminée. Elle se calcule selon l'équation de Cheng-Prusoff :[611]

$$IC_{50} = \frac{1 + \frac{[S]}{K_m}}{K_i}$$

K_i représente l'affinité de liaison de la molécule étudiée,
[S] correspond à la concentration en substrat (récepteurs)
et K_m est la constante correspondant à la concentration en substrat nécessaire pour avoir une activité enzymatique égale à la moitié de l'activité maximale.

Équation 1 : Concentration inhibitrice médiane (IC_{50}).

[611] Yung-Chi, C.; Prusoff, W. H. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22* (23), 3099–3108.

Les affinités des peptides **124** (n = 8) et **125** (n = 12) ont été comparées à celle du NeoBOMB1 dans un test sur membrane (Figure 40). Les résultats montrent que les deux peptides **124** et **125** ont des affinités moins grandes que le NeoBOMB1 (IC_{50} = 6,1 x 10^{-9} M et 1,3 x 10^{-8} M vs 1,5 x 10 $^{-9}$ M), mais suffisante pour des études *in vivo*. Le peptide **124** avec le PEG_8 a montré l'affinité la plus proche du NeoBOMB1.

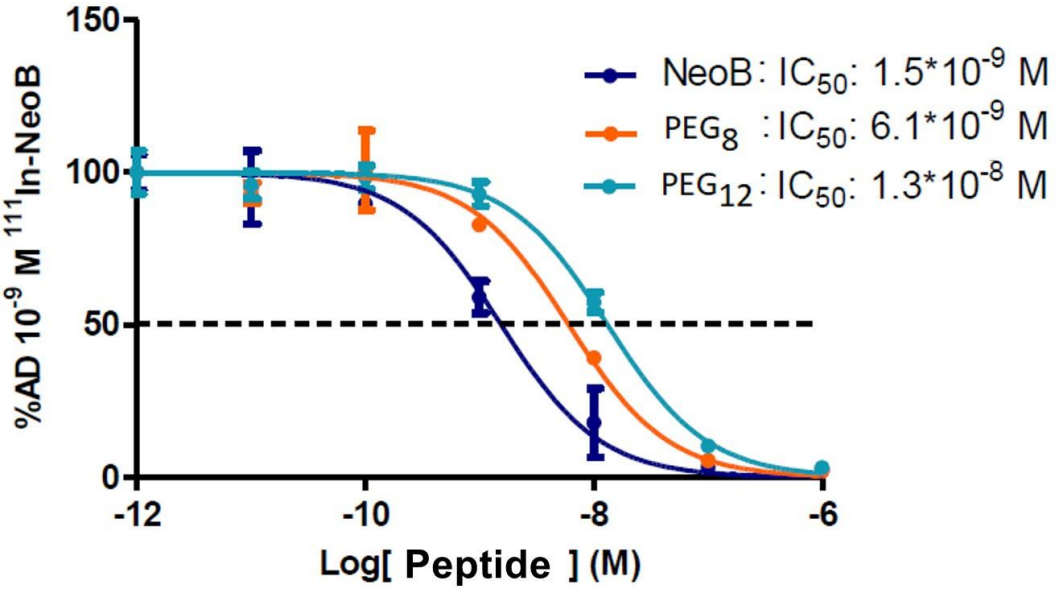


Figure 40 : Tests sur membranes (test IC_{50} in vitro).

Le peptide radiomarqué **[^{111}In]206** a été impliqué dans un test de préciblage *in vitro*. Pour cela, des plaques de puits ont été rempli de membranes sur-exprimant des protéines membranaires GRPR humaines de sous-type BB2 spécifique aux analogues de la bombésine issus de cellules recombinantes CHO-K1. Ces membranes (1,5 µg/puits) diluées dans une solution de Kolliphor (0,06 mg/mL) dans le PBS sont placées à 20 °C pendant 1 h. Le peptide porteur d'un TCO **179** (10^{-6} M) dans la solution de Kolliphor est ajouté puis incubé à 37 °C pendant 1 h. Après lavage, la tétrazine **[^{111}In]201** dans la solution de Kolliphor est ensuite ajoutée avec un ratio TCO/Tz (1/1) et incubée à 37 °C pendant 30 min. Après lavage, la radioactivité a été mesurée aux compteurx γ (Figure 41). La valeur de la radioactivité a aussi été mesuré pour le NeoBOMB1 (ne portant pas de TCO) et la tétrazine seule. Ces derniers ne pouvant pas réagir avec la tétrazine marquée définissent le seuil de radioactivité résiduelle non-spécifique. Les résultats ne montrent pas de différence marquée entre le peptide **179**, le NeoBOMB1 et la tétrazine seule. La réaction IEDDA entre le TCO et la Tz n'est pas efficace pour le peptide **179**.

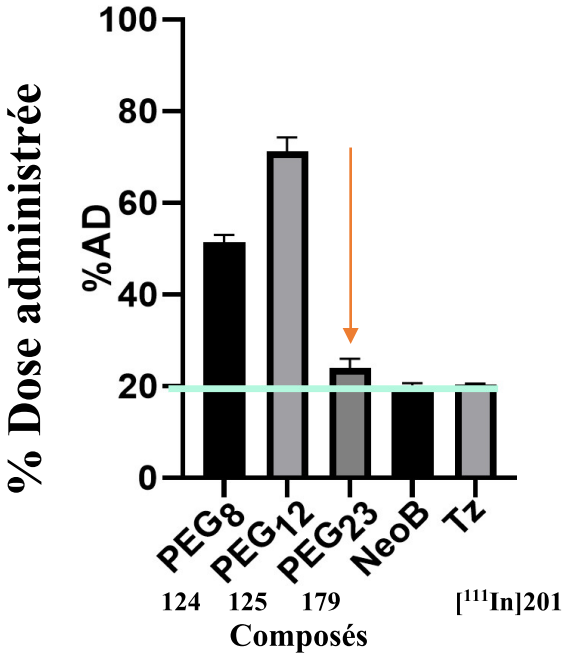


Figure 41 : Test de pré-ciblage in vitro.

Ce test avait été fait au préalable avec les autres peptides porteurs de PEG_n (n = 8 et 12). Dans les deux cas, les résultats sont très significativement supérieurs à ceux du NeoBOMB1 et de la tétrazine seule validant la réaction IEDDA. De plus, les pourcentages de dose ajoutée (%AD) sont supérieurs pour le PEG_{12} comparé à celle du PEG_8. Tout le travail de ce chapitre a permis de conclure quant à la longueur optimale de la chaine PEG pour la réaction IEDDA avec un analogue du NeoBOMB1. Une chaine de longueur n = 12 est la plus optimale pour donner les meilleurs résultats dans la réaction IEDDA.

G. Conclusion générale

En conclusion, la séquence peptidique fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt) a été fonctionnalisée suivant trois grandes stratégies de couplage (couplage peptidique **126** et **127**, multi-couplage peptidique **125**, **156** et **157**, ou CuAAC **178** et **179**). Parmi ces trois stratégies, la CuAAC a permis d'obtenir les peptides porteurs d'un TCO **178** et **179** avec les meilleurs rendements. Au total, huit analogues du NeoBOMB1 **124**, **125**, **126**, **127**, **156**, **157**, **178** et **179** ont été synthétisés avec des puretés supérieures à 98% avec 3 protocoles différents optimisés. Un compromis dans les conditions de purifications ont permis d'obtenir ces peptides à la fois purs et réactifs en remplaçant le TFA à 0,1% par du FA à 0,01%. La présence d'acide reste toutefois déconseillée pour éviter l'isomérisation de TCO en CCO. Tous ces peptides analogues de NeoBOMB1 fonctionnalisés par TCO ont été testés dans la réaction IEDDA avec quatre tétrazines commerciales et une tétrazine synthétisée au laboratoire donnant leurs produits **192**, **194**, **196**, **190** et **200** correspondant de manière quantitative sans sous-produits observés. Certains de ces peptides **200** ont été marqués avec succès par l'^{111}In pour former le peptide **201** ou le ^{177}Lu pour former le peptide **202** suivant deux stratégies. Les peptides **124** et **125** avec n = 8 et 12, et le peptide **[^{111}In]206** présentent un optimum pour la longueur de chaine n = 12. Les autres valeurs d'IC_{50} obtenue restent proche de celui obtenu pour le peptide parent NeoBOMBl. Nous avons donc pu répondre à notre question de recherche initiale et cette partie du projet est donc terminée.

Les prochaines étapes de notre travail consisteront trouver des conditions de purifications plus efficaces que le Sep-Pak® C18 et la purification par HPLC semi-préparative ou préparative pour résoudre la perte massive de peptides et ainsi accroitre fortement les rendements. Notamment, la purification par l'ultrafiltration, la filtration sur gel, la dialyse ou l'HPLC d'échange d'ion ou d'exclusion stérique sont beaucoup plus adaptées aux peptides de masses moléculaires élevées (>3000 g/mol).

Des modifications structurales de la séquence peptidique, de la partie N-terminale et C-terminal par inclusion, substitution ou délétion d'acide aminé pourrait aussi accroitre nos connaissances sur les interactions entre le peptide NeoBOMB1 et son récepteur GRP. De plus, suivant les recommandations pour la IEDDA, des modifications structurales du ligand ciblant la variation de la charge globale ou son hydrophilie pourront être étudiées. Notamment, l'introduction d'un groupement sulfonate à partir de la chimie des sultones apporterait à la fois une charge négative et une augmentation significative de l'hydrophilie. En 2020, Knauer a ainsi introduit un groupement sulfonates sur un peptide permettant de faciliter les étapes de purifications et d'améliorer ces effets biologiques.[612] Enfin, l'application des tétrazines développées au chapitre 2 pourrait être adaptée à cette étude sur les analogues de NeoBOMB1.

[612] Knauer, S.; Koch, N.; Uth, C.; Meusinger, R.; Avrutina, O.; Kolmar, H. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2020**, *59* (31), 12984–12990.

Chapitre

V

Conclusion générale

Conclusion générale

En bilan, la problématique globale et commune posée dans l'ensemble de ce travail de thèse était l'influence, bénéfice ou non, d'un groupe sulfo sur une tétrazine radioactive, et d'une chaine PEG sur un vecteur TCO pour des applications en imagerie et théranostiques. Ces motifs ayant un impact sur l'hydrophilie, l'objectif était d'améliorer les performances de la réaction IEDDA *in vivo*.

Dans la première partie des travaux de thèse, la synthèse de tétrazinesultones originales a été explorée selon trois stratégies : la fonctionnalisation de la butanesultone avec un dérivé halométhyltétrazinique approprié, le couplage de Sonogashira entre une halotétrazine et la butanesultone propargylique, et la CuAAC entre une azidotétrazine et la butanesultone propargylique. La voie par réaction de CuAAC s'est avérée la plus efficace. Elle a conduit à la tétrazinesultone **78** en 3 étapes (substitution avec l'azoture de sodium du bromure de cyanobenzyle, réaction de Pinner entre le 1-azidométhyl-4-cyanobenzene, l'acétonitrile et l'hydrazine, puis réaction de CuAAC de l'azidotétrazine **65** avec la butanesultone propargylique **15**).

La seconde partie de thèse a été dédiée l'étude de l'ouverture du cycle sultone pour l'introduction d'un atome de ^{18}F, d'un fluorophore ou d'un cycle DOTA sur une structure tétrazinique. Les essais de fluoration et de radiofluoration de la tétrazinesultone **78** en [$^{19/18}F$]fluorosulfotétrazine **79** ont été infructueux. La fluorosulfotétrazine **79** a alors été efficacement obtenue par réaction de CuAAC entre l'azidotétrazine **65** et le fluorosulfonate **84** issu de la fluoration de la butanesultone propargylique. La radiosynthèse de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **79** a été réalisée selon ce même schéma avec un RCY de 63% manuellement, et de 27-31% sur l'automate GE TRACERlab FX N Pro et un temps total de synthèse de 90-95 min. Les propriétés hydrophiles de la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **79** ont été vérifiées (Log P = -1,3 et Log D = -1,7). Son comportement *in vivo* a été examiné par imagerie TEP. Les résultats ont révélé une élimination rapide par voie rénale et urinaire (à 60%) et par voie hépatobiliaire (à 40%), ainsi qu'une totale stabilité. Les analogues sulfotétrazines **82** fluorescent, portant le motif 6-FAM-amino, et **80**, portant le DOTA-GA-amino, ont été également obtenus.

Dans la dernière partie, le peptide NeoBOMB1, ligand antagoniste du récepteur du peptide libérant de la gastrine (GRPR), a été fonctionnalisé selon deux approches par différentes longueurs de chaine de polyéthylène glycol afin d'écarter le groupement *trans*-cyclooctène (TCO) de la séquence peptidique. La première approche était basée sur la synthèse peptidique sur support solide, tandis que l'autre approche consistait à fonctionnaliser le peptide en solution. Seule l'approche en solution selon une réaction de CuAAC entre un dérivé propargylique du NeoBOMB1 et un azido-PEG_n a permis d'obtenir les produits TCO-HN-$(CH_2)_2$-PEG_n-Htrz-

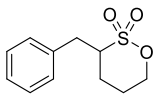
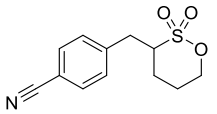
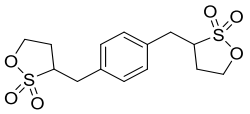
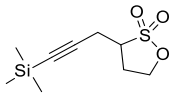
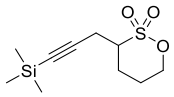
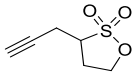
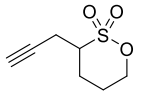
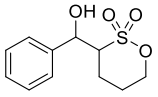
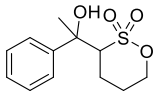
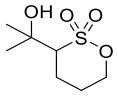
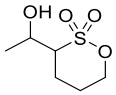
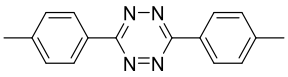
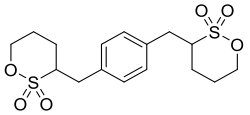
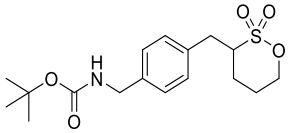
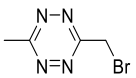
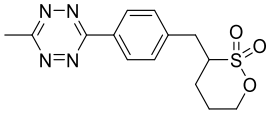
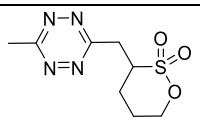
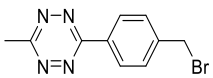
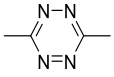
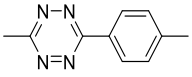
$(CH_2)_3$-C(O)-fQWAVGH-DMH4A (**178** et **179**) pour des longueurs de chaine (n = 3 et 23) en quantité suffisante. Des essais de réaction click IEDDA entre **178** ou **179** et différents réactifs tétraziniques ont permis de confirmer le potentiel de nos dérivés de NeoBOMB1 pour les applications de pré-ciblage. Deux stratégies de marquage, directe et indirecte (marquage suivi de la réaction IEDDA), à l'indium-111 et le lutétium-177 ont permis d'obtenir les produits radiomarqués **[^{111}In]206** et **[^{177}Lu]207** avec un rendement et un pureté radiochimique excédant 95%. Ensuite, après avoir confirmé leur affinité de liaison pour GRPR, les dérivés TCO-PEG_n-NeoBOMB1 (n = 8, 12 et 23) ont été évalués dans un essai de pré-ciblage avec une tétrazine de référence ([^{111}In]In-DOTA-PEG_{11}-Tz) sur membranes cellulaires. Les résultats ont révélé un optimum pour le PEG_{12}. Des essais complémentaires *in vitro* et *in vivo* sont en cours pour évaluer les performances du TCO-PEG_{12}-NeoBOMB1.

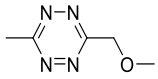
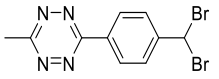
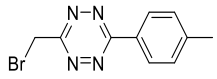
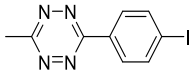
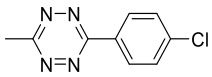
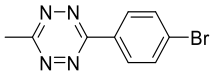
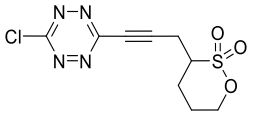
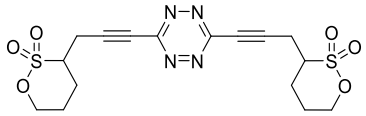
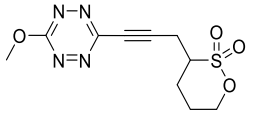
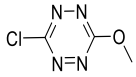
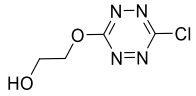
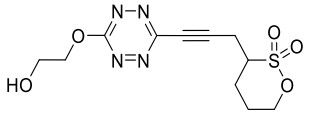
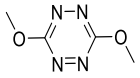
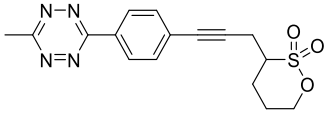
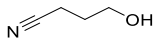
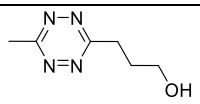
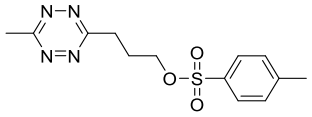
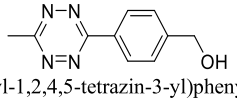
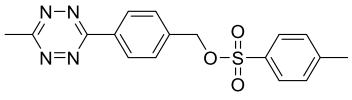
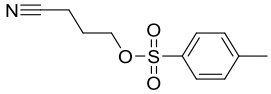
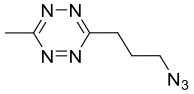
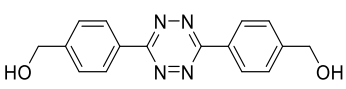
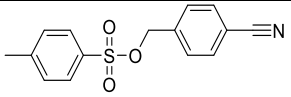
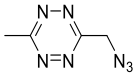
En perspective, la [^{18}F]fluorosulfotétrazine **79** sera évaluée dans une approche de pré-ciblage. Ce travail est en cours dans le cadre de l'imagerie de l'inflammation vasculaire avec des particules à base d'anticorps anti-VCAM-1 fonctionnalisés avec le TCO. Des études *in vitro* sur des cellules surexprimant le GRPR et des échantillons de tumeurs humaines sont également en cours pour comparer la capture du NeoBOMB1 radiomarqué et celle de [^{111}In]In-DOTA-PEG_{11}-Tz après pré-localisation du TCO-PEG_{12}-NeoBOMB1.

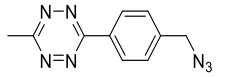
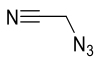
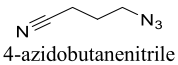
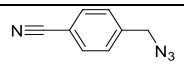
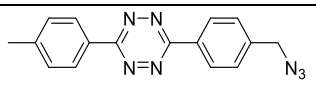
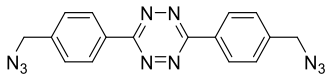
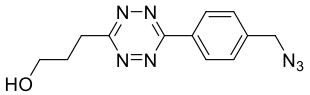
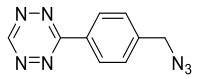
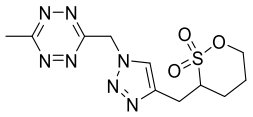
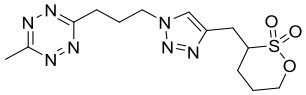
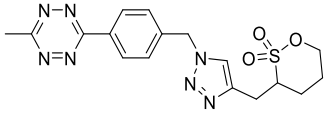
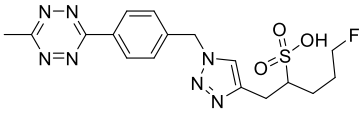
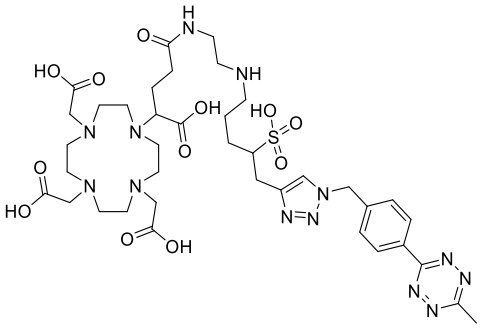
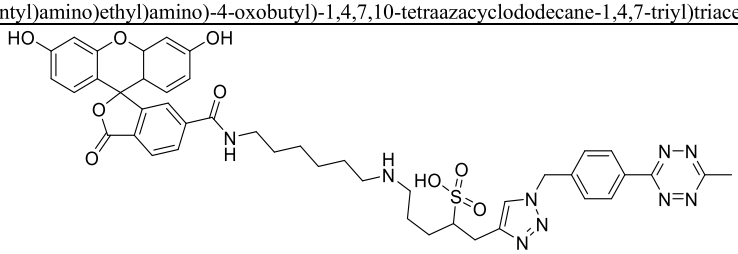
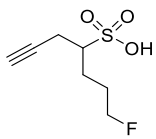
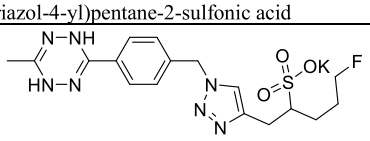
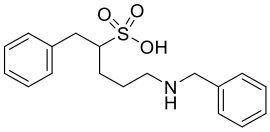
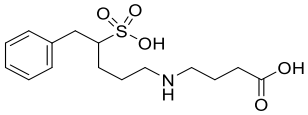
Partie expérimentale

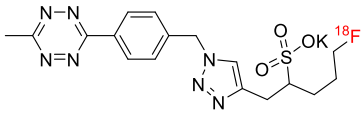
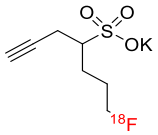
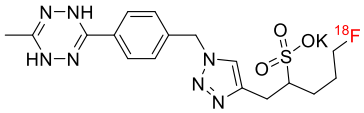
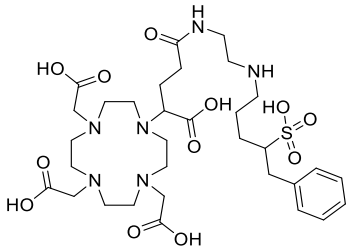
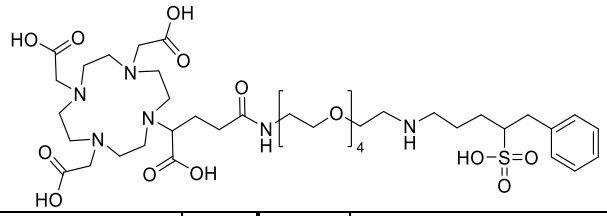
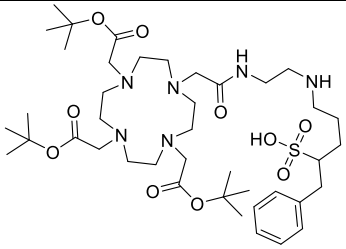
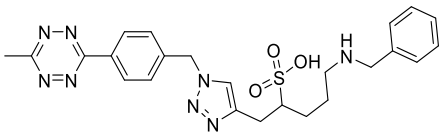
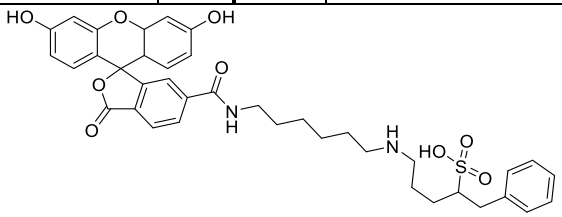
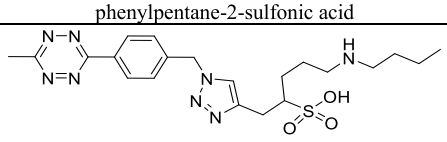
Partie expérimentale du chapitre 2 et 3

A. Synthetized compound list

5	 3-benzyl-1,2-oxathiane 2,2-dioxide	261	**7**	 4-((2,2-dioxido-1,2-oxathian-3-yl)methyl)benzonitrile	261
9	 3,3'-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(1,2-oxathiolane 2,2-dioxide)	262	**11**	 3-(3-(trimethylsilyl)prop-2-yn-1-yl)-1,2-oxathiolane 2,2-dioxide	263
12		263	**14**	 3-(prop-2-yn-1-yl)-1,2-oxathiolane 2,2-dioxide	264
15	 3-(prop-2-yn-1-yl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide	264	**16**	 3-(hydroxy(phenyl)methyl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide	265
17	 3-(1-hydroxy-1-phenylethyl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide	265	**18**	 3-(2-hydroxypropan-2-yl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide	266
19	 3-(1-hydroxyethyl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide	266	**21**	 3,6-di-*p*-tolyl-1,2,4,5-tetrazine	267
22	 3,3'-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(1,2-oxathiane 2,2-dioxide)	267	**24**	 *tert*-butyl (4-((2,2-dioxido-1,2-oxathian-3-yl)methyl)benzyl)carbamate	267
25	 3-(bromomethyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine	269	**28**	 3-(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide	269
26	 3-((6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)methyl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide	269	**27**	 3-(4-(bromomethyl)phenyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine	269
32	 3,6-dimethyl-1,2,4,5-tetrazine	270	**33**	 3-methyl-6-(*p*-tolyl)-1,2,4,5-tetrazine	271

30	 3-(methoxymethyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine	270	**34**	 3-(4-(dibromomethyl)phenyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine	272
35	 3-(bromomethyl)-6-(*p*-tolyl)-1,2,4,5-tetrazine	272	**37**	 3-(4-iodophenyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine	274
38	 3-(4-chlorophenyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine	274	**39**	 3-(4-bromophenyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine	274
40	 3-(3-(6-chloro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide	274	**41**	 3,3'-((1,2,4,5-tetrazine-3,6-diyl)bis(prop-2-yne-3,1-diyl))bis(1,2-oxathiane 2,2-dioxide)	274
42	 3-(3-(6-methoxy-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide	274	**43**	 3-chloro-6-methoxy-1,2,4,5-tetrazine	274
45	 2-((6-chloro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)oxy)ethan-1-ol	275	**46**	 3-(3-(6-(2-hydroxyethoxy)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide	276
47	 3,6-dimethoxy-1,2,4,5-tetrazine	276	**52**	 3-(3-(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl)prop-2-yn-1-yl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide	278
53	 4-hydroxybutanenitrile	279	**54**	 3-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)propan-1-ol	279
55	 3-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)propyl 4-methylbenzenesulfonate	280	**57**	 (4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl)methanol	281
58	 4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl 4-methylbenzenesulfonate	282	**60**	 3-cyanopropyl 4-methylbenzenesulfonate	282
61	 3-(3-azidopropyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine	282	**62**	 ((1,2,4,5-tetrazine-3,6-diyl)bis(4,1-phenylene))dimethanol	283
63	 4-cyanobenzyl 4-methylbenzenesulfonate	283	**64**	 3-(azidomethyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine	284

65	 3-(4-(azidomethyl)phenyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine	285	**68**	 2-azidoacetonitrile	286
69	 4-azidobutanenitrile	286	**70**	 4-(azidomethyl)benzonitrile	286
71	 3-(4-(azidomethyl)phenyl)-6-(*p*-tolyl)-1,2,4,5-tetrazine	286	**72**	 3,6-bis(4-(azidomethyl)phenyl)-1,2,4,5-tetrazine	287
73	 3-(6-(4-(azidomethyl)phenyl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)propan-1-ol	287	**75**	 3-(4-(azidomethyl)phenyl)-1,2,4,5-tetrazine	288
76	 3-((1-((6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide	288	**77**	 3-((1-(3-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)propyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide	289
78	 5-(^{19}F-fluoro)-1-(1-(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)pentane-2-sulfonic acid	289	**79**	 5-(^{19}F-Fluoro)-1-(1-(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)pentane-2-sulfonic acid	290
80	 2,2',2"-(10-(1-carboxy-4-((2-((5-(1-(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-4-sulfopentyl)amino)ethyl)amino)-4-oxobutyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid				291
82	 5-((6-(3',6'-dihydroxy-3-oxo-4a',9a'-dihydro-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthene]-6-carboxamido)hexyl)amino)-1-(1-(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)pentane-2-sulfonic acid				291
84	 7-(^{19}F-fluoro)hept-1-yne-4-sulfonic acid	292	**85**	 Potassium 5-(^{19}F-fluoro)-1-(1-(4-(6-methyl-1,4-dihydro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)pentane-2-sulfonate	**292**
88		301	**89**	 4-((5-phenyl-4-sulfopentyl)amino)butanoic acid	301

	5-(benzylamino)-1-phenylpentane-2-sulfonoic acid				
[^{18}F] 79		296	**[^{18}F] 84**	 Potassium 7-([^{18}F]fluoro)hept-1-yne-4-sulfonate	292
[^{18}F] 85	 Potassium 5-([^{18}F]fluoro)-1-(1-(4-(6-methyl-1,4-dihydro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)pentane-2-sulfonate	292	**90**	 2,2',2''-(10-(1-carboxy-4-oxo-4-((2-((5-phenyl-4-sulfopentyl)amino)ethyl)amino)butyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid	301
91					302
92	 1-phenyl-5-((2-(2-(4,7,10-tris(2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)acetamido)ethyl)amino)pentane-2-sulfonic acid	302	**94**	 5-(benzylamino)-1-(1-(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)pentane-2-sulfonic acid	303
93	 5-((6-(3',6'-dihydroxy-3-oxo-4a',9a'-dihydro-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthene]-6-carboxamido)hexyl)amino)-1-phenylpentane-2-sulfonic acid				303
95	 5-(butylamino)-1-(1-(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)pentane-2-sulfonic acid				304

B. General methods

1. Numerotation of molecules

The atomic numbering of the carbon skeleton was generated automatically by the Chemdraw software and by the MestReNova software and therefore does not necessarily follow the IUPAC nomenclature. The labeled compounds have been named according to the conventions defined by Coenen *et al.*[613]

2. Reagents and solvents

Unless otherwise indicated, all reagents used were purchased from Sigma-Aldrich, Fluorochem, Apollo Scientific, Acros organics, Alfa Aesar and Honeywell - Fluka, and were used as received without purification. Anhydrous toluene, tetrahydrofuran, dichloromethane and diethyl ether were obtained from a solvent purification system (SPS) model Mbraun SPS-800. Other anhydrous solvents acetonitrile, *N,N*-dimethylformamide and 1,4-dioxane were purchased from Sigma-Aldrich. All deuterated solvents were purchased from Eurisotop. HPLC or LC-MS UHPLC quality solvents were purchased from Merck.

3. Nuclear magnetic resonance (NMR)

The Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker Avance III spectrometer at 500.13 MHz (^{1}H), 470.59 MHz (^{19}F) and 125.77 MHz (^{13}C) or a Bruker Avance Neo CAB AV4 Basic spectrometer at 600.25 MHz (^{1}H), 564.80 MHz (^{19}F), 150.94 MHz (^{13}C) and 60.84 (^{15}N) MHz (ENSICaen, Caen, France) in chloroform-d ($CDCl_3$), methanol-d_4 [CD_3OD], acetonitrile-d_3 [CD_3CN], acetone-d_6 [$(CD_3C)_2O$], *N,N*-dimethylformamide-d_7 [$(CD_3)_2NCDO$ or DMF-d_7], tetrahydrofuran-d_8 [THF-d_8], deuterium oxide-d_2 [D_2O] or dimethylsulfoxide-d_6 [$(CD_3S)_2O$ or DMSO-d_6]. Chemical shifts (δ) were reported in parts per million (ppm) relative to the characteristic signal(s) of the residual hydrogenated analogue of the deuterated solvent used. The coupling constants (*J*) were reported in Hertz (Hz). Standard multiplicity abbreviations were used (in alphabetical order) such as: d (doublet), dd (doublet of doublets), ddd (doublet of doublet of doublets), dddd (doublet of doublet of doublet of doublets), ddt (doublet of doublet of triplets), ddtd (doublet of doublet of triplet of doublets), dp (doublet of pentets), dq (doublet of quartets), dqd (doublet of quartet of doublets), dt (doublet of triplets), dtd (doublet of triplet of doublets), hept (heptet), m (multiplet), p (pentets), q (quartet), qd (quartet of doublets), quin (quintet), s (singlet), t (triplet), td (triplet of doublets), tdd (triplet of doublet of doublets), tt (triplet of triplets).

[613] Coenen, H. H.; Gee, A. D.; Adam, M.; Antoni, G.; Cutler, C. S.; Fujibayashi, Y.; Jeong, J. M.; Mach, R. H.; Mindt, T. L.; Pike, V. W.; Windhorst, A. D. *Nucl. Med. Biol.* **2017**, *55* (1), v–xi.

4. Infrared (IR)

The Infrared (IR) spectra were recorded on a Perkin Elmer Two IR spectrophotometer (ENSICaen, Caen, France). Peaks were given in cm^{-1}.

5. Mass spectrometry (MS)

Low resolution mass spectra were recorded on a Waters 3100 positive or negative electrospray ionization (ESI) mode. Low-resolution mass analyses were by default requested with high performance liquid chromatography (UHPLC) on the Acquity UPLC H-Class Waters equipment fitted with a Waters Acquity UPLC HSS T3 C18 100 Å column (50 x ⌀2.1 mm, 1.8 µm) (A: milli-Q water; B: CH_3OH UHPLC-MS; C: 0.1% aqueous formic acid solution; D: 0.1% methanoic solution of formic acid). The sample was diluted in methanol grade UHPLC-MS and it elutes with a linear gradient of 10% D to 50% D in C from 0 to 9 min, an isocratic C/D 50/50 from 9 to 12 min, a linear gradient of 50% D to 10% D in C from 12 to 14.5 min, a C/D 50/50 isocratic from 14.5 to 15 min with a flow rate of 0.6 mL / min.

High resolution mass spectra were recorded on a Xevo G2-XS Q-Tof™ Waters (from ENSICaen, Caen, France) positive or negative electrospray ionization (ESI) mode. High-resolution mass analyses were requested with high performance liquid chromatography (HPLC) on the Acquity UPLC H-Class Waters apparatus fitted with a Waters Acquity UPLC CSH C18 ⌀1.7 µm column. The sample was eluted with a gradient of water in acetonitrile with 0.1% acetic acid at a flow rate of 0.5 mL / min.

6. Melting point

Melting points (Mp) were determined on a BI Barnstead Electrothermal IA 9100 digital apparatus.

7. Chromatography

7.1. TLC

Thin layer chromatographies (TLC) were run on plates of silica gel Meck 60 F_{254} deposited on aluminum plates of the type “Merck Pre-coated TLC sheets Alugramm Xtra Sil G / UV 254 nm, layer 0.20 mm silica gel 60 with fluorescent indicator UV 254”.

The radio-TLC was carried out on Merck $60F_{254}$ silica gel deposited on a glass plate. Radio-TLCs was eluted with CH_3CN/TFA(0.1%) 98/02 with TFA 0.1% solution at pH 2.05 (578 µL TFA 98% in 500 mL milli-Q water). Radio-TLCs were read on a Elysia Raytest Rita Star 2018203 plate reader. The identity of the radiolabeled compound was determined by

comparing its retention time with that of the non-radiolabeled compound by HPLC and radio-TLC.

7.2. Column chromatography on silica

Column chromatography purifications were carried out either on silica gel (Merck Kieselgel 60 F_{254}, 40-63 µm), or on a Macherey-Nagel Chromabond° Flash RS 4, 15, 25 or 40 Silica column (40-63 µm).

8. High-performance liquid chromatography (HPLC)

The high-performance liquid chromatography (HPLC) analyses were carried out on a Waters alliance e2695 separation module coupled with a Waters 2998 diode array detector (190-800 nm) and a Berthold LB 500 Herm 0.05 id 35144 radioactivity detector interfaced by Waters e-SAT/IN. Analytical HPLC column was used a Phenomenex Gemini® LC column (C18 with TMS endcapping, 5 µm, 110 Å, 375 sq. m/g surface area, 14% carbon load, 250 x ⌀4.6 nm Ea) with Phenomenex Gemini® PHE SecurityGuard™ standard cartridges (C18, ≥ 3 µm, 4 x ⌀3 mm) with eluent system (A: 40 mL of phosphate buffer (NaH_2PO_4 (39 g) + H_3PO_4 (16.8 mL) + milli-Q water (250 mL) in 960 mL milli-Q water); B: milli-Q water; C: acetonitrile; D: absolute EtOH HPLC grade). The sample was diluted in acetonitrile grade HPLC or milli-Q water and it elutes with a linear gradient of 0% D to 34% D in A from 0 to 1 min, an isocratic A/D 66/34 from 1 to 20 min (sulfonic acid elution), a linear gradient of 34% D to 60% D in A from 20 to 21 min, a A/D 40/60 isocratic from 21 to 31 min (tetrazine elution), a linear gradient of 0% B to 100% B from 31 to 32 min, a 100% B isocratic from 32 to 45 min (salt elution) with a flow rate of 0.6 mL / min.

High performance liquid chromatography (HPLC) purifications were developed on a Merck L-6200 intelligent pump coupled to a Merck L-4250 or L-4000 UV / Visible detector UV detector. The semi-preparatory HPLCs were carried out using a Waters 515 HPLC pump coupled with a Waters 2487 dual absorbance UV absorbance detector at λ = 254 nm and a Berthold LB 500 Herm 0.05 id 35144 radioactivity detector interfaced by Waters e-SAT/IN. Semi-preparative HPLC column was used Phenomenex Gemini® LC column (C18 with TMS endcapping, 5 µm, 110 Å, 375 sq. m/g surface area, 14% carbon load, 250 x ⌀10 nm Ea) with Phenomenex Gemini® PHE SecurityGuard™ standard cartridges (C18, ≥ 3 µm, 10 x ⌀10 mm). Phosphate buffer (PB) at pH 2,1 was prepared with 40 mL of phosphate buffer at pH 1,9 (NaH_2PO_4 (39 g) + H_3PO_4 (16.8 mL) + milli-Q water (250 mL) in 960 mL milli-Q water. The sample was eluted with an isocratic PB/EtOH 72/28 from 1 to 45 min (sulfonic acid elution) with a flow rate of 4.0 mL / min (manual) or 3.3 mL/min (FN N Pro). The column was washed with a PB/EtOH 40/60 or 100% CH_3OH HPLC grade isocratic for 60 min (tetrazine elution), a 100% milli-Q water isocratic for 60 min (salt elution) and a H_2O/CH_3CN 50/50 isocratic for 60 min (for column storage) with a flow rate of 4.0 mL / min (manual) or 3.3 mL/min (FN N Pro).

The 2D chromatogram (λ = 254 nm) was recorded with a resolution of 4.8 mm while the analog signal e-SAT/IN (60 Hz) was directly used.

9. Determination of partition and distribution coefficient

The logP and $logD_{7.4}$ values were determined using a standard shake flask protocol,[614] consisting in the quantification of the radiotracer repartition between equal volumes of 1-octanol and pure water (for LogP) or phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4 for $logD_{7.4}$). Octanol (1 mL) and water or PBS buffer (1 mL) were placed in a hemolysis tube and mixed together for 20 min at room temperature before the addition of formulated radiotracer solution (4 µL, ≈ 4,4 µCi, ≈ 0.185 MBq). Tubes were then vigorously shaken for 40 min. After centrifugation at 4024 g for 5 min, samples (3 x 100 µL) from each phase were collected and the radioactivity was measured in a γ-counter (Perkin wizard 2 gamma detector series 2470). The experiment was carried out twice in triplicate.

10. Biological evaluations

10.1. *In vivo* stability

Stability of the radiotracer in blood of male SWISS mice (38 g) was checked at 30 min post-injection (29 MBq/100 µL). Blood samples (≈ 1 g) were harvested by intracardiac puncture, treated with heparin and centrifuged (4024 g, 5 min, 4 °C). The plasma was collected, mixed with an equivalent volume of acetonitrile and centrifuged again (4024 g, 10 min, 4 °C). The supernatant was filtered through a 0.45 µm PVDF then injected into analytical HPLC. Co-injection of the non-radioactive reference compound was used to validate the radio-HPLC chromatogram.

10.2. PET-CT Imaging

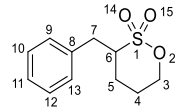
PET-CT imaging was performed on a Inveon µPET/CT scanner (Siemens Healthcare Molecular Imaging). Respiratory rate was monitored during imaging sessions. PET acquisitions were performed over 60 min and they started as soon as the radiotracer (5.6 MBq / 100 µL) was injected. Data were acquired in list-mode and PET images were reconstructed using iterative OSEM3D/MAP algorithm.[615] Dead-time, random, scatter as well as attenuation correction (based on CT) were applied. Images analysis was performed with P-Mod 3.7 software (P-MOD Technologies). Briefly, PET and CT images were co-registered and volume of interests (VOIs) were semi-automatically delimitated on following organs: bladder, bone, brain, heart, kidney, liver, lung, and muscle, if available. Time activity curves (TAC) were extracted from PET images and normalized as standardized uptake value (SUV).

[614] Fujita, T.; Iwasa, J.; Hansch, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (23), 5175–5180.
[615] Vollmar, S.; Michel, C.; Treffert, J. T.; Newport, D. F.; Casey, M. *Phys. Med. Biol.* **2002**, *47* (15), 2651–2658.

C. Synthesis

1. Sultone synthesis

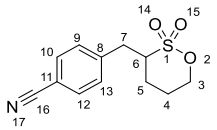
3-Benzyl-1,2-oxathiane 2,2-dioxide [1344707-66-9][616] (5)



Chemical Formula: $C_{11}H_{14}O_3S$
Exact Mass: 226.0664
Molecular Weight (g/mol): 226.2900

In a 250 mL three-neck round-bottom flask under nitrogen, a solution of 1,4-butanesultone **3** (1 mL, 7.3 mmol) in anhydrous THF (50 mL) was cooled to -82 °C. *n*-Butyllithium (2.5 M in hexane, 4 mL, 9.5 mmol) was then added dropwise at -82 °C for 10 min, then the mixture was stirred for 20 min at -82 °C. Benzyl bromide **4** (1 mL, 7.6 mmol) was added dropwise over 3 min, and the mixture was stirred for 5 h at -78 °C. The reaction was quenched by addition of water (20 mL) at -73 °C. After rising to 20 °C and extraction with AcOEt (3 x 10 mL), the organic phase was washed with water (2 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was prepurified by flash pad using *n*-pentane / Et_2O 50/50 as eluant. Collected product was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / Et_2O 60/40 as eluant to give the product **5** as a white powder (0.89 g, 54%). **Rf**: 0.46 (*n*-pentane/Et_2O 50/50); **Mp**: 125 °C; **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.37 – 7.31 (m, 2H, $H_{12, 14}$), 7.31 – 7.27 (m, 1H, H_{11}), 7.22 – 7.17 (m, 2H, $H_{9, 13}$), 4.57 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.47 (m, 1H, $H_{7'}$), 3.52 (dd, *J* = 13.6, 3.8 Hz, 1H, $H_{5'}$), 3.28 (tt, *J* = 11.0, 3.8 Hz, 1H, H_6), 2.76 (dd, *J* = 13.6, 11.0 Hz, 1H, $H_{5''}$), 2.07 – 1.98 (m, 1H, $H_{3''}$), 1.96 – 1.84 (m, 1H, $H_{7''}$), 1.84 – 1.77 (m, 2H, H_4); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 135.9, 129.4, 129.0, 127.3, 73.9, 60.7, 34.1, 27.5, 24.1; **IR (cm^{-1})**: 1495, 1332, 1165, 1017, 939, 916, 901, 866, 791, 761, 719, 702, 598, 531, 512, 458, 424; **LC-MS**: t_R = 4.3 min, calcd. for $C_{11}H_{15}O_3S$: 227.07 $[M+H]^+$, found: 227.07; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{11}H_{15}O_3S$: 227.0742 $[M+H]^+$, found: 227.0738; calcd. for $C_{11}H_{14}O_3NaS$: 249.0561 $[M+Na]^+$, found: 249.0560; **Analytical HPLC**: t_R = 36.0 min (PB/EtOH 66/34; λ_{max} = 488.4 nm).

4-((2,2-Dioxido-1,2-oxathian-3-yl)methyl)benzonitrile [1344707-70-5][616] (7)

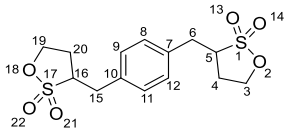


Chemical Formula: $C_{12}H_{13}NO_3S$
Exact Mass: 251.0616
Molecular Weight (g/mol): 251.3000

In a 250 mL three-neck round-bottom flask under nitrogen, a solution of 1,4-butanesultone **3** (1 mL, 7.2 mmol) in anhydrous THF (50 mL) was cooled to -81 °C. *n*-Butyllithium (2.5 M in hexane, 4 mL, 9.5 mmol) was then added dropwise at -78 °C for 1 h then the mixture was stirred for 2 h at -78 °C. 4-(Bromomethyl)benzonitrile **6** (1.44 g, 7.3 mmol) was added dropwise over 21 min, then the mixture was stirred for 3 h at -78 °C. The reaction was quenched by addition of water (20 mL) at -78 °C. After rising to 20 °C and extraction with AcOEt (3 x 10 mL), the organic phase was washed with water (2 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / DCM 60/40 as eluant to give the product **7** as a white powder

(82.3 mg, 5%). **Rf** : 0.41 (100% Et_2O); 0.27 (*n*-pentane/DCM 60/40); 0.77 (100% DCM); **Mp** : 104 °C; **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.65 – 7.59 (m, 2H, $H_{10, 12}$), 7.37 – 7.31 (m, 2H, $H_{9, 13}$), 4.63 – 4.51 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.51 – 4.42 (m, 1H, $H_{7'}$), 3.51 (dd, *J* = 13.9, 4.7 Hz, 1H, $H_{5'}$), 3.33 – 3.23 (m, 1H, H_6), 2.86 (dd, *J* = 13.9, 10.0 Hz, 1H, $H_{5''}$), 2.06 – 1.98 (m, 1H, $H_{7''}$), 1.98 – 1.89 (m, 1H, $H_{3''}$), 1.89 – 1.78 (m, 2H, H_4); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 141.9, 133.0, 130.5, 118.9, 111.8, 74.2, 60.5, 34.9, 28.2, 24.3; **IR (cm^{-1})**: 2947, 2228, 1331, 1162, 940, 918, 901, 833, 792, 588, 543; **LC-MS**: t_R = 4.5 min, calcd. for $C_{12}H_{14}NO_3S$: 252.07 $[M+H]^+$, found: 252.07; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{12}H_{13}NO_3S$: 252.0694 $[M+H]^+$, found: 252.0694.

3,3'-(1,4-Phenylenebis(methylene))bis(1,2-oxathiolane 2,2-dioxide) [1344707-91-0][616] (9)

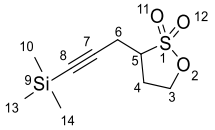


Chemical Formula: $C_{14}H_{18}O_6S_2$
Exact Mass: 346.0545
Molecular Weight (g/mol): 346.4120

In a 100 mL three-neck round-bottom flask under nitrogen, a solution of 1,3-propanesultone **2** (0.45 g, 3.6 mmol) in anhydrous THF (10 mL) was cooled to -78 °C. *n*-Butyllithium (2.5 M in hexane, 2 mL, 4.7 mmol) was then added dropwise at -78 °C for 20 min, then the mixture was stirred for 30 min at -78 °C. 1,4-Bis(bromomethyl)benzene (0.51 g, 1.9 mmol) was added dropwise over 20 min, then the mixture was stirred for 5 h at -78 °C. The reaction was quenched by addition of water (20 mL) at -78 °C. After rising to 20 °C and extraction with AcOEt (3 x 10 mL), the organic phase was washed with water (2 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / Et_2O 60/40 as eluant to give the product **9** as a white powder (0.22 g, 35%). **Rf**: 0.21 (*n*-pentane/AcOEt 1/1); 0.65 (AcOEt 100%); **Mp**: 208 – 209 °C; **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_3CN): δ 7.28 (s, 4H, $H_{8, 9, 11, 12}$), 4.46 – 4.39 (m, 2H, $H_{3', 19'}$), 4.37 – 4.29 (m, 2H, $H_{3'', 19''}$), 3.72 – 3.55 (m, 2H, $H_{6'', 15''}$), 3.20 (dd, *J* = 14.3, 7.0 Hz, 2H, $H_{5, 16}$), 2.95 (dd, *J* = 14.3, 8.2 Hz, 2H, $H_{6', 15'}$), 2.56 – 2.51 (m, 2H, $H_{4'', 20''}$), 2.36 – 2.26 (m, 2H, $H_{4', 20'}$); **^{13}C NMR** (126 MHz, CD_3CN): δ 137.1, 129.9, 129.0, 120.0, 60.4, 51.9, 44.7, 36.6, 28.0; **IR (cm^{-1})**: 3394, 2938, 1737, 1517, 1442, 1322, 1250, 1191, 1160, 1123, 1034, 987, 926, 875, 858, 788, 716, 616, 579, 528, 504, 468, 406; **LC-MS**: t_R = 4.5 min, calcd. for $C_{14}H_{18}O_6NaS_2$: 369.04 $[M+Na]^+$, found: 369.04; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{14}H_{18}O_6NaS_2$: 369.0442 $[M+Na]^+$, found: 369.0442.

[616] Schmitt, S.; Bouteiller, C.; Barré, L.; Perrio, C. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (41), 11465–11467.

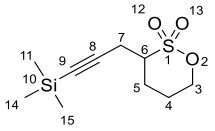
3-(3-(Trimethylsilyl)prop-2-yn-1-yl)-1,2-oxathiolane 2,2-dioxide [1817615-36-3][617] (11)



Chemical Formula: $C_9H_{16}O_3SSi$
Exact Mass: 232.0589
Molecular Weight (g/mol): 232.3690

In a 250 mL three-neck round-bottom flask under nitrogen, a solution of 1,3-propanesultone **2** (1 mL, 14.5 mmol) in anhydrous THF (50 mL) was cooled to -78 °C. *n*-Butyllithium (1.6 M in hexane, 18 mL, 28.8 mmol) was then added dropwise at -78 °C for 30 min and the mixture was stirred for 15 min at -78 °C. 3-Bromo-1-(trimethylsilyl)-1-propyne (2 mL, 14.4 mmol) was added dropwise for 15 min, then the mixture was stirred for 3 h at -78 °C then for 1 h at -60 °C. The reaction was quenched by addition of a mixture of H_2O / AcOEt 1/1 (60 mL) at -78 °C. After rising to 20 °C and extraction with AcOEt (4 x 25 mL), the organic phase was washed with water (4 x 25 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 30 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / Et_2O 60/40 as eluant to give the product **11** as white powder (0.50 g, 15%). **R_f**: 0.02 (*n*-pentane/Et_2O 1/1); 0.14 (*n*-pentane/AcOEt 1/1); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 4.19 – 4.15 (m, 2H, H_3), 3.52 (tt, J = 7.1, 6.1 Hz, 1H, H_5), 2.65 – 2.62 (m, 1H, $H_{6'}$), 2.53 – 2.47 (m, 1H, $H_{6''}$), 2.33 – 2.30 (m, 2H, H_4), 0.14 (s, 9H, $H_{10, 13, 14}$); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): 99.9, 88.8, 66.9, 53.8, 29.0, 20.5, 0.1; **LC-MS**: t_R =5.7 min, calcd. for $C_9H_{17}O_3SSi$: 233.07 $[M+H]^+$, found: 233.07; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_9H_{17}O_3SSi$: 233.0662 $[M+H]^+$, found: 233.0679.

3-(3-(triméthylsilyl)prop-2-yn-1-yl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide[618] (12)

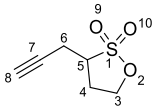


Chemical Formula: $C_{10}H_{18}O_3SSi$
Exact Mass: 246.0746
Molecular Weight (g/mol): 246.3960

In a 250 mL three-neck round-bottom flask under nitrogen, a solution of 1,4-butanesultone **3** (1 mL, 14.5 mmol) in anhydrous THF (50 mL) was cooled to -78 °C. *n*-Butyllithium (1.6 M in hexane, 18 mL, 28.8 mmol) was then added dropwise at -78 °C for 30 min and the mixture was stirred for 15 min at -78 °C. 3-Bromo-1-(trimethylsilyl)-1-propyne (2 mL, 14.4 mmol) was added dropwise for 15 min, then the mixture was stirred for 3 h at -78 °C then for 1 h at -60 °C. The reaction was quenched by addition of a mixture of H_2O / AcOEt 1/1 (60 mL) at -78 °C. After rising to 20 °C and extraction with AcOEt (4 x 25 mL), the organic phase was washed with water (4 x 25 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 30 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / Et_2O 60/40 as eluant to give the product **12** as white powder (0.54 g, 17%). **R_f**: 0.13 (*n*-pentane/AcOEt 1/1); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 4.09 – 3.82 (m, 2H, H_3), 3.09 – 2.87 (m, 1H, H_6), 2.75 – 2.47 (m, 2H, H_7), 2.06 – 1.97 (m, 1H, $H_{5'}$), 1.95 – 1.88 (m, 2H, $H_{5''}$), 1.88 – 1.75 (m, 2H, H_4), 0.14 (s, 9H, $H_{11, 14, 15}$); **LC-MS**: t_R =5.9 min, calcd. for $C_{10}H_{19}O_3SSi$: 247.08 $[M+H]^+$, found: 247.08; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_9H_{19}O_3SSi$: 247.0824 $[M+H]^+$, found: 247.0827.

[617] Chang, C.-C.; Letteri, R.; Hayward, R. C.; Emrick, T. *Macromolecules* **2015**, *48* (21), 7843–7850.

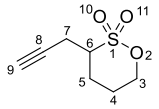
3-(Prop-2-yn-1-yl)-1,2-oxathiolane 2,2-dioxide [2261035-14-5][618] (14)



Chemical Formula: $C_6H_8O_3S$
Exact Mass: 160.0194
Molecular Weight (g/mol): 160.1870

In a 250 mL three-neck round-bottom flask under nitrogen, a solution of 1,3-propanesultone **2** (2.63 g, 21.6 mmol) in anhydrous THF (50 mL) was cooled to -78 °C. *n*-Butyllithium (1.6 M in hexane, 23 mL, 36.8 mmol) was then added dropwise at -78 °C for 30 min and the mixture was stirred for 15 min at -78 °C. 3-Bromopropyne **13** (3 mL, 80% in toluene, 26.0 mmol) was added dropwise for 15 min, then the mixture was stirred for 3 h at -78 °C then for 1 h at -60 °C. The reaction was quenched by addition of a mixture of H_2O / AcOEt 1/1 (60 mL) at -78 °C. After rising to 20 °C and extraction with AcOEt (4 x 25 mL), the organic phase was washed with water (4 x 25 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 30 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / Et_2O 60/40 as eluant to give the product **14** as a white powder (0.37 g, 11%). **R_f**: 0.16 (*n*-pentane/Et_2O 1/1); 0.31 (*n*-pentane/AcOEt 1/1); **Mp**: 60-62 °C; **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 4.50 – 4.31 (m, 2H, $H_{3''}$), 3.53 – 3.39 (m, 1H, H_5), 2.88 – 2.72 (m, 2H, $H_{6'}$), 2.65 – 2.54 (m, 1H, $H_{6''}$), 2.51 – 2.37 (m, 1H, $H_{4''}$), 2.14 (t, J = 2.7 Hz, 1H, H_8); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 78.0, 72.0, 66.9, 53.7, 29.1, 19.3; **IR (cm^{-1})**: 3289, 2959, 1732, 1431, 1355, 1294, 1244, 1167, 1132, 1045, 996, 863, 790, 637, 513, 475; **LC-MS**: t_R = 4.2 min, calcd. for $C_6H_9O_3S$: 161.03 $[M+H]^+$, found: 161.03; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_6H_9O_3S$: 161.0275 $[M+H]^+$, found: 161.0272; **Analytical HPLC**: t_R = 35.8 min (PB/EtOH 66/34; λ_{max} = 488.2 nm).

3-(Prop-2-yn-1-yl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide [2261035-11-2][618] (15)



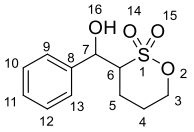
Chemical Formula: $C_7H_{10}O_3S$
Exact Mass: 174.0351
Molecular Weight (g/mol): 174.2140

In a 250 mL three-neck round-bottom flask under nitrogen, a solution of 1,4-butanesultone **3** (2 mL, 21.2 mmol) in anhydrous THF (8 mL) was cooled to -78 °C. *n*-Butyllithium (11 M in hexane, 3 mL, 33.0 mmol) diluted in anhydrous THF (8 mL) was then added dropwise at -78 °C for 30 min. In parallel with the addition of 3-bromopropyne **13** (2 mL, 80% in toluene, 21.5 mmol) was added dropwise for 30 min, then the mixture was stirred for 20 min at -78 °C. The reaction was quenched by addition of a mixture of H_2O / AcOEt 1/1 (60 mL) at -78 °C. After extraction with AcOEt (3 x 10 mL), the organic phase was washed with water (2 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica flash chromatography using *n*-pentane / Et_2O 70/30 as eluant to give the product **15** as a white powder (1.48 g, 40%). **R_f**: 0.38 (*n*-pentane/AcOEt 3/2); 0.32 (*n*-pentane/Et_2O 7/3); 0.48 (*n*-pentane/Et_2O 1/1); **Mp**: 58 – 60 °C (sublimated); 68-70 °C (Silica purification); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 4.59 – 4.45 (m, 2H, H_3), 3.28 – 3.19 (m, 1H, H_6), 3.03 – 2.93 (m, 1H, $H_{7'}$), 2.59 – 2.53 (m, 1H, $H_{7''}$), 2.53 – 2.46 (m, 1H, $H_{5'}$), 2.13 – 2.10 (m, 1H, H_9), 2.10 – 2.01 (m, 1H, $H_{5''}$), 1.95 – 1.87 (m, 2H, H_4); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 78.1,

[618] Lafargue, A.-E.; Perrio, C. WO2019008119A1, January 10, **2019**.

74.2, 74.2, 72.0, 57.6, 27.6, 23.6, 18.5: **IR (cm^{-1})**: 3264, 2973, 2933, 1466, 1444, 1421, 1347, 1335, 1305, 1284, 1259, 1220, 1189, 1165, 1096, 1066, 1059, 1013, 953, 943, 924, 892, 876, 840, 828, 781, 701, 692, 681, 583, 542, 523, 507, 453, 412; **LC-MS**: t_R = 4.2 min, calcd. for $C_7H_9O_3S$: 173.03 $[M-H]^-$, found: 173.07; t_R = 4.2 min, calcd. for $C_7H_{11}O_3S$: 175.04 $[M+H]^+$, found: 175.04; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_7H_{11}O_3S$: 175.0429 $[M+H]^+$, found: 175.0430; calcd. for $C_7H_{10}O_3NaS$: 197.0248 $[M+Na]^+$, found: 197.0250; **Analytical HPLC**: t_R = 35.9 min (PB/EtOH 66/34; λ_{max} = 487.2 nm).

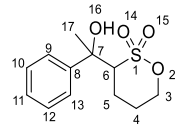
3-(Hydroxy(phenyl)methyl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide (16)



Chemical Formula: $C_{11}H_{14}O_4S$
Exact Mass: 242.0613
Molecular Weight (g/mol): 242.2890

In a 250 mL three-neck round-bottom flask under nitrogen, a solution of 1,4-butanesultone **3** (0.8 mL, 7.3 mmol) in anhydrous THF (50 mL) was cooled to -78 °C. *n*-Butyllithium (2.5 M in hexane, 3.8 mL, 9.5 mmol) was then added dropwise at -78 °C for 10 min, then the mixture was stirred for 20 min at -78 °C. Benzaldehyde (1 mL, 7.6 mmol) was added dropwise over 3 min, then the mixture was stirred for 5 h at -78 °C. The reaction was quenched by addition of water (20 mL) at -78 °C. After rising to 20 °C and extraction with AcOEt (3 x 10 mL), the organic phase was washed with water (2 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / Et_2O 50/50 as eluant to give the product **16** as a white powder (1.49 g, 89%). **R$_f$**: 0.46 (*n*-pentane/Et_2O 50/50); **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_3CN): δ 7.40 – 7.39 (m, 2H, $H_{10, 12}$), 7.37 – 7.28 (m, 3H, $H_{9, 11, 13}$), 4.89 – 4.84 (m, 1H, H_7), 4.42 – 4.38 (m, 2H, H_3), 3.53 – 3.45 (m, 1H, H_6), 3.44 – 3.38 (m, 2H, H_5), 2.10 – 2.04 (m, 3H, H_4); **^{13}C NMR** (126 MHz, CD_3CN): δ 142.5, 129.5, 128.8, 128.3, 75.4, 70.5, 66.6, 24.8, 24.1; **IR (cm^{-1})**: 3488, 2921, 1495, 1453, 1340, 1313, 1272, 1181, 1163, 1109, 1068, 1053, 1019, 981, 934, 917, 876, 854, 828, 788, 766, 718, 706, 679, 625, 590, 577, 537, 522, 503, 484, 456, 434; **LC-MS**: t_R = 2.9 min, calcd. for $C_{11}H_{14}O_4NaS$: 265.05 $[M+Na]^+$, found: 265.05; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{11}H_{14}O_4NaS$: 265.0510 $[M+Na]^+$, found: 265.0515.

3-(1-Hydroxy-1-phenylethyl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide (17)

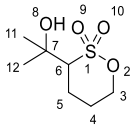


Chemical Formula: $C_{12}H_{16}O_4S$
Exact Mass: 256.0769
Molecular Weight (g/mol): 256.3160

In a 250 mL three-neck round-bottom flask under nitrogen, a solution of 1,4-butanesultone **3** (1 mL, 12.6 mmol) in anhydrous THF (50 mL) was cooled to -78 °C. *n*-Butyllithium (2.5 M in hexane, 10 mL, 25.0 mmol) was then added dropwise at -78 °C for 10 min, then the mixture was stirred for 20 min at -78 °C. Acetophenone (1 mL, 12.3 mmol) was added dropwise over 3 min, then the mixture was stirred for 5 h at -78 °C. The reaction was quenched by addition of water (20 mL) at -78 °C. After rising to 20 °C and extraction with AcOEt (3 x 10 mL), the organic phase was washed with water (2 x 10 mL), dried over $MgSO_4$,

filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / Et_2O 50/50 as eluant to give the product **17** as white powder (2.87 g, 91%). **R_f**: 0.48 (*n*-pentane/Et_2O 50/50); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.40 – 7.39 (m, 2H, $H_{10, 12}$), 7.35 – 7.30 (m, 3H, $H_{9, 11, 13}$), 4.41 – 4.39 (m, 2H, H_3), 3.52 – 3.46 (m, 1H, H_6), 3.43 – 3.39 (m, 2H, H_5), 2.09 – 2.05 (m, 2H, H_4), 1.51 (s, 3H, H_{17}); **LC-MS**: t_R = 3.1 min, calcd. for $C_{12}H_{16}O_4NaS$: 279.07 $[M+Na]^+$, found: 279.07; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{11}H_{14}O_4NaS$: 279.0667 $[M+Na]^+$, found: 279.0667.

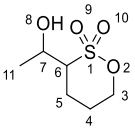
3-(2-Hydroxypropan-2-yl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide (18)



Chemical Formula: $C_7H_{14}O_4S$
Exact Mass: 194.0613
Molecular Weight (g/mol): 194.2450

In a 250 mL three-neck round-bottom flask under nitrogen, a solution of 1,4-butanesultone **3** (1 mL, 7.2 mmol) in anhydrous THF (3 mL) was cooled to -78 °C. *n*-Butyllithium (2.5 M in hexane, 4 mL, 9.5 mmol) was then added dropwise at -78 °C for 7 min, then the mixture was stirred for 10 min at -78 °C. Freshly distilled acetone (0.6 mL, 8.1 mmol) was added dropwise over 10 min, then the mixture was stirred for 3 h at -78 °C. The reaction was quenched by addition of water (20 mL) at -78 °C. After rising to 20 °C and extraction with AcOEt (3 x 25 mL), the organic phase was washed with water (2 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was prepurified by flash pad (Silica 20 g, *n*-pentane / Et_2O 60/40) and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / Et_2O 70/30 as eluant to give the product **18** as a white powder (1.1 g, 78%). **R_f**: 0.30 (*n*-pentane / Et_2O 60/40); **Mp**: 58-60 °C; **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 6.34 (s, 2H, H_8), 4.61 – 4.52 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.49 – 4.43 (m, 1H, $H_{3''}$), 3.19 (dd, *J* = 12.3, 3.9 Hz, 1H, H_6), 2.34 – 2.26 (m, 1H, $H_{5'}$), 2.26 – 2.12 (m, 1H, $H_{4'}$), 2.05 – 1.94 (m, 1H, $H_{5''}$), 1.94 – 1.88 (m, 1H, $H_{4''}$), 1.50 (s, 3H, H_{11}), 1.41 (s, 3H, H_{12}); **LC-MS**: t_R = 2.6 min, calcd. for $C_6H_{15}O_4S$: 195.07 $[M+H]^+$, found: 195.07; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_6H_{15}O_4S$: 195.0691 $[M+H]^+$, found: 195.0691.

3-(1-Hydroxyethyl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide (19)

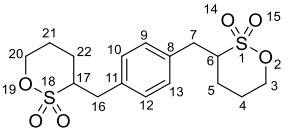


Chemical Formula: $C_6H_{12}O_4S$
Exact Mass: 180.0456
Molecular Weight (g/mol): 180.2180

In a 250 mL three-neck round-bottom flask under nitrogen, the 1,4-butanesultone **3** (2 mL, 17.6 mmol) in anhydrous THF (50 mL) was cooled to -78 °C. *n*-Butyllithium (2.5 M in hexane, 9 mL, 23.2 mmol) was then added dropwise at -78 °C for 10 min and the mixture was stirred for 7 min at -78 °C. Acetaldehyde (1 mL, 17.9 mmol) was added dropwise for 3 min, then the mixture was stirred for 5 h at -78 °C. The reaction was quenched by addition of water (20 mL) at -78 °C. After rising to 20 °C and extraction with AcOEt (3 x 25 mL), the organic phase was washed with water (2 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure (40 °C). The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane /

Et_2O 70/30 as eluant to give the product **19** as a white powder (0.22 g, 7%). **R_f**: 0.28 (*n*-pentane/Et_2O 60/40); **Mp**: 53-55 °C; **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 4.44 – 4.39 (m, 2H, H_3), 3.06 – 3.02 (m, 2H, H_6), 2.15 – 2.08 (m, 2H, H_7), 1.76 – 1.70 (m, 2H, H_4), 1.25 – 1.18 (m, 1H, H_5), 1.14 (s, 1H, H_8), 0.86 – 0.58 (m, 2H, H_{11}); **LC-MS**: t_R = 2.4 min, calcd. for $C_6H_{13}O_4S$: 181.05 $[M+H]^+$, found: 181.05; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_6H_{13}O_4S$: 181.0534 $[M+H]^+$, found: 181.0534.

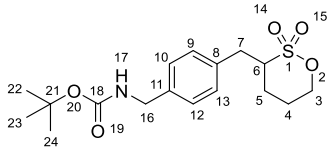
3,3'-(1,4-Phenylenebis(methylene))bis(1,2-oxathiane 2,2-dioxide) (22)



Chemical Formula: $C_{16}H_{22}O_6S_2$
Exact Mass: 374.0858
Molecular Weight (g/mol): 374.4660

In a 100 mL three-neck round-bottom flask under nitrogen, a solution of 1,4-butanesultone **3** (1 mL, 7.2 mmol) in anhydrous THF (10 mL) was cooled to -78 °C. *n*-Butyllithium (2.5 M in hexane, 4 mL, 9.5 mmol) was then added dropwise at -78 °C for 20 min, then the mixture was stirred for 30 min at -78 °C. 1,4-Bis(bromomethyl)benzene (0.64 g, 2.4 mmol) was added dropwise over 20 min, then the mixture was stirred for 5 h at -78 °C. The reaction was quenched by addition of water (20 mL) at -78 °C. After rising to 20 °C and extraction with AcOEt (3 x 10 mL), the organic phase was washed with water (2 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / Et_2O 60/40 as eluant to give the product **22** as a white powder (0.79 g, 89%). **R_f**: 0.32 (*n*-pentane/Et_2O 50/50); **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_3CN): δ 7.21 (s, 4H, $H_{9, 10, 12, 13}$), 4.53 – 4.35 (m, 4H, $H_{3, 20}$), 3.47 – 3.34 (m, 2H, $H_{6, 17}$), 3.34 – 3.23 (m, 2H, $H_{7', 16'}$), 2.80 – 2.75 (m, 4H, $H_{5, 22}$), 1.85 – 1.74 (m, 6H, $H_{4, 7'', 16'', 21}$); **^{13}C NMR** (126 MHz, CD_3CN): δ 145.3, 130.6, 129.3, 128.0, 127.3, 118.3, 75.3, 61.1, 46.9, 34.6, 28.6, 24.4; **IR (cm^{-1})**: 3392, 1638, 1513, 1444, 1419, 1374, 1351, 1336, 1291, 1278, 1250, 1233, 1186, 1162, 1041, 1018, 945, 923, 902, 873, 831, 794, 767, 705, 614, 592, 533, 519, 473, 422; **LC-MS**: t_R = 4.6 min, calcd. for $C_{16}H_{23}O_6S_2$: 375.09 $[M+H]^+$, found: 375.09; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{16}H_{23}O_6S_2$: 375.0936 $[M+H]^+$, found: 375.0938.

***tert*-Butyl (4-((2,2-dioxido-1,2-oxathian-3-yl)methyl)benzyl)carbamate (24)**



Chemical Formula: $C_{17}H_{25}NO_5S$
Exact Mass: 355.1453
Molecular Weight (g/mol): 355.4490

In a 250 mL three-neck round-bottom flask under nitrogen, a solution of 1,4-butanesultone **3** (0.3 mL, 3.4 mmol) in anhydrous THF (50 mL) was cooled to -78 °C. *n*-Butyllithium (2.5 M in hexane, 2 mL, 4.5 mmol) was then added dropwise at -78 °C for 5 min, then the mixture was added was stirred for 4 h at -78 °C. *tert*-Butyl 4-(bromomethyl)benzylcarbamate **23** (1.0 g, 3.2 mmol) was added dropwise over 20 min, then the mixture was stirred for 5 h at -78 °C . The reaction was quenched by addition of water (20 mL) at -70 °C. After rising to 20 °C and extraction with DCM (4 x 10 mL), the organic phase was washed with water (2 x 10 mL) and HCl (1 M) (2 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered

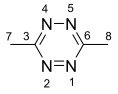
and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / AcOEt from 80/20 to 50/50 as eluant to give the product **24** as a white powder (0.13 g, 11%). **Rf**: 0.42 (*n*-pentane/AcOEt 60/40); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.20 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, $H_{10, 12}$), 7.13 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, $H_{9, 13}$), 5.51 (s, 1H, H_{17}), 4.43 – 4.36 (m, 2H, H_3), 4.23 – 4.12 (m, 2H, H_{16}), 4.08 – 4.01 (m, 1H, $H_{7'}$), 3.29 – 3.21 (m, 1H, $H_{7''}$), 3.36 – 3.30 (m, 1H, H_6), 2.73 – 2.66 (m, 2H, H_5), 1.87 – 1.80 (m, 2H, H_4), 1.40 (s, 9H, $H_{22, 23, 24}$); **LC-MS**: t_R = 5.1 min, calcd. for $C_{17}H_{26}NO_5S$: 356.15 $[M+H]^+$, found: 356.15; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{17}H_{26}NO_5S$: 356.1532 $[M+H]^+$, found: 356.1531.

2. Synthesis of tetrazinesultones

2.1. Route A: Functionalization of commercial butanesultone 3

2.1.1. Synthesis of tetrazinesultone 26

3,6-Dimethyl-1,2,4,5-tetrazine [1558-23-2][619] (32)

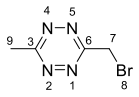


Chemical Formula: $C_4H_6N_4$
Exact Mass: 110.0592
Molecular Weight (g/mol): 110.1200

In a 25 mL round-bottom flask, acetonitrile (4 mL, 74.5 mmol), nickel(II) trifluoromethanesulfonate (80 µL, 0.2 mmol), hydrazine monohydrate (2 mL, 38.5 mmol) in ethanol (2 mL, 32.9 mmol) were stirred at 65 °C for 26 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure at 20 °C. Sodium nitrite (0.6 g, 8.4 mmol) in water (5 mL) was added at 0 °C, then acetic acid (10.0 mL, 174.5 mmol) diluted in water (5 mL) was carefully added dropwise over 10 min at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 5 min. After extraction with DCM (3 x 10 mL), the organic phase was washed with $HCl_{(aq)}$ (1M) (2 x 10 mL), $Na_2CO_{3\ (sat)}$ (1 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 20 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / DCM from 60/40 to 0/100 as eluant to give the product **32** as a red powder (30.1 mg, 1%). **Rf**: 0.13 (*n*-pentane/DCM 60/40); **Mp**: 74 °C (sublimation); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 3.02 (s, 6H, $H_{7, 8}$); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 167.9, 20.7; **LC-MS**: calcd. for $C_4H_7N_4$: 111.07 $[M+H]^+$, found: 111.07; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_4H_7N_4$: 111.06707 $[M+H]^+$, found: 111.06707; **Analytical HPLC**: t_R = 5.1 min (PB/EtOH 66/34; λ = 280.0 nm).

[619] Davies, S.; Oliveira, B. L.; Bernades, G. J. L. *Org. Biomol. Chem.*, **2019**, *17* (1), 5725–5730.

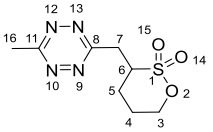
3-(Bromomethyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine [2067322-24-9][258] (25)



Chemical Formula: $C_4H_5BrN_4$
Exact Mass: 187.9698
Molecular Weight (g/mol): 189.0160

In a 250 mL round-bottom flask, a mixture of tetrazine **32** (1.3 g, 12 mmol), *N*-bromosuccinimide (2.6 g, 14.4 mmol), benzoyl peroxide (75%, 0.1 g, 0.4 mmol) in chloroform (25 mL) was refluxed for 21 h. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure at 20 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / DCM from 80/20 to 0/100 as eluant to give the product **25** as a red powder (385.0 mg, 17%). **R_f**: 0.76 (*n*-pentane/DCM 80/20); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 4.55 (s, 2H, H_7), 3.02 (s, 3H, H_9); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 167.5, 163.8, 32.5, 21.3; **LC-MS**: calcd. for $C_4H_6BrN_4$: 188.98 $[M+H]^+$, found: 188.98; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_4H_6BrN_4$: 188.9775 $[M+H]^+$, found: 188.9785.

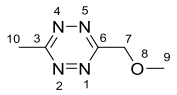
3-((6-Methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)methyl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide (26)



Chemical Formula: $C_8H_{12}N_4O_3S$
Exact Mass: 244.0630
Molecular Weight (g/mol): 244.2690

In a 250 mL three-neck round-bottom flask under nitrogen, 1,4-butanesultone **3** (0.2 mL, 2.4 mmol) in anhydrous THF (10 mL) was cooled to -78 °C. *n*-Butyllithium (2.5 M in hexane, 1.5 mL, 3.7 mmol) was then added dropwise at -78 °C for 10 min, then the mixture was stirred for 15 min at -78 °C. Tetrazine **25** (0.45 g, 2.4 mmol) in anhydrous THF (15 mL) was added dropwise over 10 min, then the mixture was stirred for 5 h at -78 °C. The reaction was quenched by addition of water (5 mL) at -78 °C. After rising to 20 °C and extraction with AcOEt (4 x 25 mL), the organic phase was washed with water (2 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 20 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / Et_2O 80/20 as eluant to give the product **26** as red powder (5.8 mg, 1%). **R_f**: 0.30 (*n*-pentane/Et_2O 90/10); **Mp**: T > 130 °C (decomposition); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 4.70 – 4.69 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.61 – 4.57 (m, 1H, $H_{7'}$), 3.58 (dd, *J* = 13.4, 3.9 Hz, 1H, $H_{5'}$), 3.36 (tt, *J* = 10.9, 3.9 Hz, 1H, H_6), 3.04 (s, 3H, H_{16}), 2.82 (dd, *J* = 13.4, 11.0 Hz, 1H, $H_{5''}$), 2.10 – 2.06 (m, 1H, $H_{7''}$), 2.01 – 1.93 (m, 1H, $H_{3''}$), 1.89 – 1.83 (m, 2H, H_4); **LC-MS**: calcd. for $C_8H_{13}N_4O_3S$: 245.07 $[M+H]^+$, found: 245.07; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_8H_{13}N_4O_3S$: 245.0708 $[M+H]^+$, found: 245.0708.

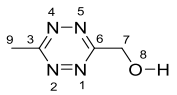
3-(Methoxymethyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine [2067322-21-6][258,259,620] (30)



Chemical Formula: $C_5H_8N_4O$
Exact Mass: 140.0698
Molecular Weight (g/mol): 140.1460

In a 25 mL sealed tube under nitrogen, methoxyacetonitrile **29** (0.1 mL, 1.3 mmol), 3-mercapto-propionic acid (0.1 mL, 1.3 mmol), acetonitrile (0.4 mL, 8.0 mmol), ethanol (0.1 mL, 2.6 mmol) and hydrazine monohydrate (50%, 1.3 mL, 21.2 mmol) were stirred at 40 °C for 24 h. The mixture was then concentrated under reduced pressure at 20 °C. Sodium nitrite (0.46 g, 6.6 mmol) in water (5 mL) was added at 0 °C, then chlorohydric acid (1 mL, 14.5 mmol) diluted in water (9 mL) was carefully added dropwise at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 5 min until the evolution of nitrous oxide stopped. After extraction with DCM (5 x 10 mL), the organic phase was washed with $HCl_{(aq)}$ (1M) (3 x 10 mL), $Na_2CO_{3\ (sat)}$ (10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under pressure reduced (40 °C). The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / DCM from 80/20 to 0/100 as eluant to give the product **30** as red powder (3.7 mg, 2%). **Rf**: 0.15 (*n*-pentane/DCM 70/30); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 5.06 (s, 2H, H_7), 3.59 (s, 3H, H_9), 3.11 (s, 3H, H_{10}); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 168.7, 166.3, 72.3, 59.8, 21.4; **LC-MS**: calcd. for $C_5H_9N_4O$: 141.08 $[M+H]^+$, found: 141.08; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_5H_8N_4ONa$: 163.0590 $[M+Na]^+$, found: 163.0590.

(6-Methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)methanol [2067322-22-7][258,259,620] (31)



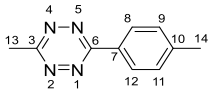
Chemical Formula: $C_4H_6N_4O$
Exact Mass: 126.0542
Molecular Weight (g/mol): 126.1190

In a 25 mL sealed tube under nitrogen, a solution of tetrazine **30** (15 mg, 0.1 mmol) in anhydrous DCM (5 mL) was cooled to -78 °C for 5 min. Boron tribromide (26.8 mg, 0.1 mmol) was added dropwise over 3 min. The mixture was stirred for 3 h -78 °C. The reaction was quenched by addition of CH_3OH (2.5 mL) at -25 °C. After rising to 20 °C and extraction with DCM (3 x 25 mL), the organic phase was washed with water (2 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 20 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / Et_2O from 90/10 to 60/40 as eluant to give the product **31** as red powder (3 mg, 2%). **Rf**: 0.15 (*n*-pentane/DCM 70/30); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 5.27 – 5.25 (m, 2H, H_7), 3.11 (s, 3H, H_9), 3.03 – 3.01 (m, 1H, H_8); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 169.1, 167.3, 62.8, 21.5; **LC-MS**: calcd. for $C_4H_7N_4O$: 127.06 $[M+H]^+$, found: 127.06; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_4H_6N_4ONa$: 149.0434 $[M+Na]^+$, found: 149.0431.

[620] Carlson, J.; Mikula, H.; Weissleder, R. WO2022072949A2, April 7, **2022**.

2.1.2. Synthesis of tetrazinesultone 28

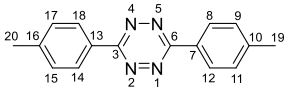
3-Methyl-6-(*p*-tolyl)-1,2,4,5-tetrazine [56107-77-8][260,261,262,293,621] (33)



Chemical Formula: $C_{10}H_{10}N_4$
Exact Mass: 186.0905
Molecular Weight (g/mol): 186.2180

In a 250 mL round-bottom flask, *p*-tolunitrile **20** (2 mL, 16.4 mmol), 3-mercaptopropionic acid (1.5 mL, 17.2 mmol), acetonitrile (5.4 mL, 103.1 mmol), hydrazine monohydrate (50%, 17 mL, 272.9 mmol) in ethanol (2 mL, 34.2 mmol) were stirred at 40 °C for 24 h. The mixture was concentrated under reduced pressure at 40 °C. Sodium nitrite (5.82 g, 83.5 mmol) in water (25 mL) was added at 0 °C, then hydrochloric acid (37%, 15 mL, 181.1 mmol) diluted in water (25 mL) was carefully added dropwise over 10 min at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 5 min. After extraction with AcOEt (5 x 20 mL), the organic phase was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 40 °C to give the product **33** as a red powder (3.01 g, 99%) which was used directly without further purification. **R_f**: 0.20 (*n*-pentane/Et_2O 80/20); 0.22 (*n*-pentane/DCM 60/40); 0.38 (toluene/DCM/AcOEt 90/08/02); **Mp**: 102-103 °C; **^{1}H NMR** (600 MHz, $CDCl_3$): 8.57 – 8.31 (m, 2H, $H_{8, 12}$), 7.53 – 7.31 (m, 2H, $H_{9, 11}$), 3.08 (s, 3H, H_{13}), 2.47 (s, 3H, H_{14}); **^{13}C NMR** (151 MHz, $CDCl_3$): δ 167.1, 164.3, 143.4, 130.1, 129.2, 128.0, 21.8, 21.3; **IR (cm^{-1})**: 3020, 2928, 2658, 2567, 1692, 1605, 1423, 1398, 1381, 1363, 1340, 1306, 1277, 1238, 1210, 1179, 1157, 1112, 1087, 1043, 1017, 936, 919, 891, 842, 814, 797, 716, 683, 658, 638, 563, 527; **LC-MS**: t_R = 10.4 min, calcd. for $C_{10}H_9N_4$: 185.08 $[M-H]^-$, found: 185.12; **HRMS (ESI$^-$)**: calcd. for $C_{10}H_9N_4$: 185.0827 $[M-H]^-$, found: 185.1180; **Analytical HPLC**: t_R = 33.0 min (PB/EtOH 66/34; λ_{max} = 270.9 nm).

3,6-Di-*p*-tolyl-1,2,4,5-tetrazine [51973-26-3][150,292,303,622,623,624,625,626,627] (21)



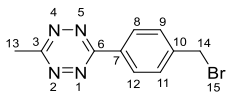
Chemical Formula: $C_{16}H_{14}N_4$
Exact Mass: 262.1218
Molecular Weight (g/mol): 262.3160

In a 250 mL round-bottom flask, *p*-tolunitrile **20** (2 mL, 16.4 mmol), 3-mercaptopropionic acid (1.5 mL, 17.2 mmol), acetonitrile (5.4 mL, 103.2 mmol), hydrazine monohydrate (50%, 17 mL, 272.9 mmol) in ethanol (3.5 mL, 59.8 mmol) were stirred at 40 °C for 24 h. The mixture was concentrated under reduced pressure (40 °C). Sodium nitrite (5.7 g, 81. 8 mmol) in water (15 mL) was added at 0 °C, then hydrochloric acid (37%, 15 mL, 181.1 mmol) diluted in water (15 mL) was carefully added dropwise over 10 min at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 5 min. After extraction with AcOEt (5 x 20 mL), the organic phase was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 40 °C to give the product **21** as a red powder (3.8 g, 89%) which was used directly without further

[621] Rainsford, K. D. *Agents and Actions* **1978**, *8* (6), 587–605.
[622] Wlostowski, M.; Zachara, J.; Olszewski, A., December 21, **2006**.
[623] Robins, L. I.; Carpenter, R. D.; Fettinger, J. C.; Haddadin, M. J.; Tinti, D. S.; Kurth, M. J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (6), 2480–2485.
[624] Liu, H.; Wei, Y. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54* (35), 4645–4648.
[625] Counotte-Potman, A.; Van der Plas, H. C.; Van Veldhuizen, B. *J. Org. Chem.* **1981**, *46* (19), 3805–3810.
[626] Kong, K.; Zhang, J.; Zhao, P.; Lu, H.; Chen, Z.; Cao, W.; Chen, J.; Chen, Y. *Tetrahedron* **2017**, *73* (48), 6742–6746.
[627] Hu, W.-X.; Rao, G.-W.; Sun, Y.-Q. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (5), 1177–1181.

purification. **Rf**: 0.58 (*n*-pentane / DCM 60/40); **Mp**: 232 °C; **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.57 – 8.47 (m, 4H, $H_{8, 12, 14, 18}$), 7.41 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H, $H_{9, 11, 15, 17}$), 2.48 (s, 6H, $H_{19, 20}$); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 164.0, 143.4, 130.2, 129.3, 128.0, 21.9; **IR (cm^{-1})**: 2915, 1928, 1696, 1608, 1414, 1391, 1301, 1240, 1179, 1112, 1103, 1050, 1016, 956, 917, 839, 822, 716, 636, 585, 456, 421; **LC-MS**: calcd. for $C_{16}H_{15}N_4$: 263.13 $[M+H]^+$, found: 263.13; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{16}H_{15}N_4$: 263.1297 $[M+H]^+$, found: 263.1298; **Analytical HPLC**: t_R = 57.0 min (PB/EtOH 66/34; λ_{max} = 272.1 nm).

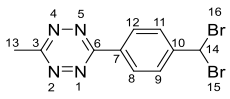
3-(4-(Bromomethyl)phenyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine (27)



Chemical Formula: $C_{10}H_9BrN_4$
Exact Mass: 264.0011
Molecular Weight (g/mol): 265.1140

In a 100 mL round-bottom flask, a mixture of tetrazine **33** (1.5 g, 8.3 mmol), *N*-bromosuccinimide (1.5 g, 8.2 mmol) and benzoyl peroxide (75%, 93.7 mg, 0.3 mmol) in carbon tetrachloride (20 mL) was refluxed for 21 h. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure at 40 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / DCM from 90/10 to 0/100 as eluant to give the product **27** as a red powder (1.18 g, 54%). **Rf**: 0.16 (*n*-pentane/DCM 80/20); **Mp**: 106-108 °C; **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.60 – 8.56 (m, 2H, $H_{8, 12}$), 7.64 – 7.60 (m, 2H, $H_{9, 11}$), 4.57 (s, 2H, H_{14}), 3.11 (s, 3H, H_{13}); **^{13}C NMR** (151 MHz, $CDCl_3$): δ 167.5, 163.8, 142.4, 131.9, 130.0, 128.5, 32.5, 21.3; **^{15}N NMR** (61 MHz, $CDCl_3$): δ 386.5; **IR (cm^{-1})**: 2926, 1690, 1606, 1400, 1362, 1226, 1199, 1180, 1087, 1038, 1016, 919, 890, 854, 815, 798, 738, 716, 636, 606, 576, 552, 455; **LC-MS**: t_R = 11.0 min, calcd. for $C_{10}H_{10}{}^{79}BrN_4$: 265.01 $[M+H]^+$, found: 265.01; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{10}H_{10}{}^{79}BrN_4$: 265.0089 $[M+H]^+$, found: 265.0090; **Analytical HPLC**: t_R = 32.1 min (PB/EtOH 66/34; λ_{max} = 270.9 nm).

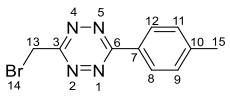
3-(4-(Dibromomethyl)phenyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine (34)



Chemical Formula: $C_{10}H_8Br_2N_4$
Exact Mass: 341.9116
Molecular Weight (g/mol): 344.0100

In a 100 mL round-bottom flask, a mixture of tetrazine **33** (0.2 g, 1.1 mmol), *N*-bromosuccinimide (0.2 g, 1.2 mmol) and 2,2′-azobis(2-methylpropionitrile) (0.2 g, 1.2 mmol) in carbon tetrachloride (10 mL) was stirred at 20 °C for 2 min. Hydrogen bromide (50 µL, 2.2 mmol) was added. The mixture was stirred at 70 °C for 35 h. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure (40 °C.). The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / DCM from 90/10 to 0/100 as eluant to give the product **34** as a red powder (84.9 mg, 23%). **Rf**: 0.17 (*n*-pentane/DCM 80/20); **Mp**: 101-103 °C; **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.58 – 8.55 (m, 2H, $H_{8, 12}$), 7.78 – 7.74 (m, 2H, $H_{9, 11}$), 6.71 (s, 1H, H_{14}), 3.09 (s, 3H, H_{13}); **LC-MS**: calcd. for $C_{10}H_9{}^{79}Br_2N_4$: 342.92 $[M+H]^+$, found: 342.92; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{10}H_9{}^{79}Br_2N_4$: 342.9194 $[M+H]^+$, found: 342.9197.

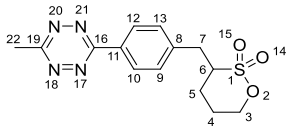
3-(Bromomethyl)-6-(*p*-tolyl)-1,2,4,5-tetrazine (35)



Chemical Formula: $C_{10}H_9BrN_4$
Exact Mass: 264.0011
Molecular Weight (g/mol): 265.1140

In a 10 mL round-bottom flask, a mixture of tetrazine **33** (12.3 mg, 66.2 µmol), *N*-bromosuccinimide (13.5 mg, 75.9 µmol) and 2,2′-azobis(2-methylpropionitrile) (0.8 mg, 4.9 µmol) in chloroform (0.6 mL) was refluxed for 25 h. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure at 40 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / DCM from 90/10 to 0/100 as eluant to give the product **35** as red powder (1.7 mg, 10%). **R_f**: 0.28 (*n*-pentane/DCM 60/40); **Mp**: 104 – 105 °C; **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, $H_{8, 12}$), 7.42 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, $H_{9, 11}$), 4.99 (s, 2H, H_{13}), 2.49 (s, 3H, H_{15}); **^{13}C NMR** (151 MHz, $CDCl_3$): δ 167.5, 163.8, 142.4, 131.9, 130.0, 128.5, 32.5, 21.3; **^{15}N NMR** (61 MHz, $CDCl_3$): δ 386.5; **LC-MS**: t_R = 11.0 min, calcd. for $C_{10}H_{10}{}^{79}BrN_4$: 265.01 $[M+H]^+$, found: 265.01; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{10}H_{10}{}^{79}BrN_4$: 265.0089 $[M+H]^+$, found: 265.0091.

3-(4-(6-Methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide (28)



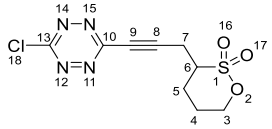
Chemical Formula: $C_{14}H_{16}N_4O_3S$
Exact Mass: 320.0943
Molecular Weight (g/mol): 320.3670

In a 250 mL three-neck round-bottom flask under nitrogen, a solution of 1,4-butanesultone **3** (0.2 mL, 2.4 mmol) in anhydrous THF (20 mL) was cooled to -78 °C. *n*-Butyllithium (2.5 M in hexane, 1.2 mL, 3.0 mmol) was then added dropwise at -78 °C for 10 min, then the mixture was stirred for 30 min at -78 °C. Tetrazine **27** (0.59 g, 2.2 mmol) in anhydrous THF (10 mL) was added dropwise over 10 min, then the mixture was stirred for 5 h at -78 °C. The reaction was quenched by addition of water (5 mL) at -78 °C. After rising to 20 °C and extraction with AcOEt (4 x 25 mL), the organic phase was washed with water (2 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 40 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / Et_2O 80/20 as eluant on aluminum oxide (Merck Al_2O_3 90 active neutral 25 g) to give the product **28** as a red powder (77.5 mg, 10%). **R_f**: 0.31 (*n*-pentane / Et_2O 80/20); **Mp**: T > 190 °C (decomposition); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.09 – 7.95 (m, 2H, $H_{10, 12}$), 7.67 – 7.51 (m, 2H, $H_{9, 13}$), 4.02 – 3.90 (m, 2H, H_7), 3.57 – 3.34 (m, 1H, H_6), 3.08 – 2.96 (m, 2H, H_5), 2.75 (s, 3H, H_{22}), 2.06 – 1.91 (m, 1H, H_3), 1.91 – 1.74 (m, 3H, H_4); **LC-MS**: t_R = 9.5 min, calcd. for $C_{14}H_{17}N_4O_3S$: 321.10 $[M+H]^+$, found: 321.10; **HRMS (ESI$^{-/+}$)**: calcd. for $C_{14}H_{15}N_4O_3S$: 319.0864 $[M-H]^-$, found: 319.1485; calcd. for $C_{14}H_{17}N_4O_3S$: 321.1021 $[M+H]^+$, found: 321.0992.

2.2. Route B: Coupling of Sonogashira between propargyl sultone 15 and a halotetrazine

2.2.1. From dichlorotetrazine 36

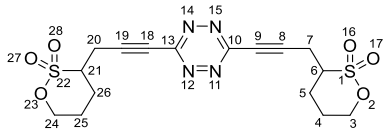
3-(3-(6-Chloro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide (40)



Chemical Formula: $C_9H_9ClN_4O_3S$
Exact Mass: 288.0084
Molecular Weight (g/mol): 288.7060

In a 4 mL conical reactivial®, 3,6-dichloro-1,2,4,5-tetrazine **36** (50.0 mg, 0.3 mmol), propargylic sultone **15** (0.4 g, 2.1 mmol), bis(triphenylphosphine)palladium (II) chloride (38.2 mg , 54.4 µmol) and copper(I) iodide (12.6 mg, 66.2 µmol) were solubilized in *N,N*-dimethylacetamide (3 mL) at 20 °C. Triethylamine (0.3 mL, 2.1 mmol) was added dropwise at 0 °C and the mixture was stirred at 20 °C for 24 h. The solvent was removed under reduced pressure (40 °C) to give the product **40** as red powder (25.8 mg, 27%). **Rf**: 0.22 (*n*-pentane/DCM 60/40); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 4.63 – 4.44 (m, 2H, H_3), 3.30 – 3.19 (m, 1H, H_6), 3.12 – 3.00 (m, 1H, $H_{7'}$), 2.72 – 2.56 (m, 1H, $H_{7''}$), 2.53 – 2.33 (m, 1H, $H_{5'}$), 2.12 – 2.00 (m, 1H, $H_{5''}$), 2.00 – 1.84 (m, 2H, H_4); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 168.2, 164.9, 78.0, 74.1, 71.9, 57.5, 27.6, 23.5, 18.5; **LC-MS**: calcd. for $C_9H_{10}ClN_4O_3S$: 289.02 $[M+H]^+$, found: 289.02; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_9H_{10}ClN_4O_3S$: 289.0162 $[M+H]^+$, found: 289.0165.

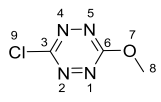
3,3'-((1,2,4,5-Tetrazine-3,6-diyl)bis(prop-2-yne-3,1-diyl))bis(1,2-oxathiane 2,2-dioxide) (41)



Chemical Formula: $C_{16}H_{18}N_4O_6S_2$
Exact Mass: 426.0668
Molecular Weight (g/mol): 426.4620

In a 4 mL conical reactivial®, 3,6-dichloro-1,2,4,5-tetrazine **36** (25.0 mg, 0.2 mmol), propargylic sultone **15** (0.1 g, 0.7 mmol), bis(triphenylphosphine)palladium (II) chloride (11.5 mg, 16.4 µmol) and copper(I) iodide (3.3 mg, 17.3 µmol) were solubilized in *N,N*-dimethylacetamide (300 µL) at 20 °C. Triethylamine (93 µL, 0.7 mmol) diluted in *N,N*-dimethylacetamide (300 µL) was added dropwise at 0 °C. The resulting mixture was stirred at 80 °C for 24 h. The solvent was removed under reduced pressure (40 °C) to give the product **41** as red powder (3.5 mg, 5%). **LC-MS**: calcd. for $C_{16}H_{19}N_4O_6S_2$: 427.07 $[M+H]^+$, found: 427.07; **HRMS (ESI$^{-/+}$)**: calcd. for $C_{16}H_{17}N_4O_6S_2$: 425.0589 $[M-H]^-$, found: 425.0589; calcd. for $C_{16}H_{19}N_4O_6S_2$: 427.0746 $[M+H]^+$, found: 427.0747.

3-Chloro-6-methoxy-1,2,4,5-tetrazine [614756-34-2][285,289] (43)

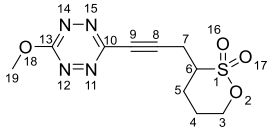


Chemical Formula: $C_3H_3ClN_4O$
Exact Mass: 145.9995
Molecular Weight (g/mol): 146.5340

In a 50 mL round-bottom flask under nitrogen, a solution of 3,6-dichloro-1,2,4,5-tetrazine **36** (0.1 g, 6.6 mmol) in anhydrous DCM (5 mL) was prepared at 20 °C. Anhydrous

CH_3OH (1 mL, 24.4 mmol) was added then DIPEA (0.3 mL, 1.7 mmol) was added dropwise at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 1 h. The solvents were removed under reduced pressure (20 °C). The residue was purified by chromatography on silica gel using *n*-pentane / AcOEt 5/1 as eluant to give the product **43** as red powder (18.6 mg, 19%). **Rf**: 0.13 (AcOEt/CH_3OH 95/05); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 4.34 (s, 3H, H_8); **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_3CN): δ 4.27 (s, 3H, H_8); **^{13}C NMR** (126 MHz, CD_3CN): δ 168.2, 164.9, 58.1; **LC-MS**: calcd. for $C_3H_4ClN_4O$: 147.01 $[M+H]^+$, found: 147.01; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_3H_4ClN_4O$: 147.0074 $[M+H]^+$, found: 147.0077.

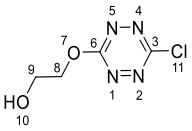
3-(3-(6-Methoxy-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide (42)



Chemical Formula: $C_{10}H_{12}N_4O_4S$
Exact Mass: 284.0579
Molecular Weight (g/mol): 284.2900

In a 4 mL conical reactivial® under nitrogen, propargylic sultone **15** (0.1 g, 0.7 mmol), bis(triphenylphosphine)palladium (II) dichloride (11.5 mg, 16.4 µmol), copper (I) iodide (3.8 mg, 20.0 µmol) and triethylamine (0.1 mL, 0.7 mmol) were stirred in *N,N*-dimethylacetamide (3 mL). Tetrazine **43** (50 µL, 0.3 mmol) solubilized in *N,N*-dimethylacetamide (2 mL) was added dropwise for 2 min. The mixture was stirred at 40 °C for 20 h then concentrated under reduced pressure at 40 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / DCM from 80/20 to 0/100 as eluant to give the product **42** as a red powder (4.9 mg, 6%). **Rf**: 0.29 (*n*-pentane/DCM 60/40); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 4.63 – 4.44 (m, 2H, H_3), 4.35 (s, 3H, H_{19}), 3.30 – 3.19 (m, 1H, H_6), 3.12 – 3.00 (m, 1H, $H_{7'}$), 2.72 – 2.56 (m, 1H, $H_{7''}$), 2.53 – 2.33 (m, 1H, $H_{5'}$), 2.12 – 2.00 (m, 1H, $H_{5''}$), 2.00 – 1.84 (m, 2H, $H_{4'}$); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 168.2, 164.9, 78.0, 74.1, 71.9, 58.2, 57.5, 27.6, 23.5, 18.5; **LC-MS**: t_R = 8.3 min, calcd. for $C_{10}H_{11}N_4O_4S$: 283.05 $[M-H]^-$, found: 283.15; **HRMS (ESI$^-$)**: calcd. for $C_{10}H_{11}N_4O_4S$: 283.0501 $[M-H]^-$, found: 283.1558.

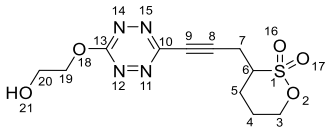
2-((6-Chloro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)oxy)ethan-1-ol (45)



Chemical Formula: $C_4H_5ClN_4O_2$
Exact Mass: 176.0101
Molecular Weight (g/mol): 176.5600

In a 50 mL round-bottom flask under nitrogen, anhydrous ethylene glycol **44** (0.1 mL, 1.8 mmol) was diluted in anhydrous THF (5 mL) then sodium hydride (39.6 mg, 1.6 mmol) was added at -78 °C. A solution of 3,6-dichloro-1,2,4,5-tetrazine **36** (0.2 g, 1.3 mmol) in anhydrous THF (5 mL) at 20 °C was added. The mixture was stirred at -78 °C for 10 min then at 23 °C for 1.5 h. The solvents were removed under reduced pressure (20 °C). The residue was purified by chromatography on silica gel using *n*-pentane / AcOEt 5/1 as eluant to give the product **45** as red powder (2.3 mg, 1%). **Rf**: 0.18 (*n*-pentane/AcOEt 80/20); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 4.83 – 4.71 (m, 2H, H_8), 4.16 – 4.07 (m, 2H, H_9); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 166.0, 161.0, 68.2, 60.8; **LC-MS**: calcd. for $C_4H_6ClN_4O_2$: 177.02 $[M+H]^+$, found: 177.02; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_4H_6ClN_4O_2$: 177.0179 $[M+H]^+$, found: 177.0182.

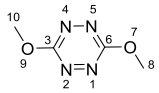
3-(3-(6-(2-Hydroxyethoxy)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)prop-2-yn-1-yl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide (46)



Chemical Formula: $C_{11}H_{14}N_4O_5S$
Exact Mass: 314.0685
Molecular Weight (g/mol): 314.3160

In a 4 mL conical reactivial® under nitrogen, propargylic sultone **15** (10.0 mg, 57.4 µmol), bis(triphenylphosphine)palladium (II) dichloride (0.9 mg, 1.3 µmol), copper (I) iodide (0.3 mg, 1.3 µmol) and triethylamine (8 µL, 57.1 mmol) were stirred in *N,N*-dimethylacetamide (250 µL). Tetrazine **45** (5.0 mg, 28.3 µmol) solubilized in *N,N*-dimethylacetamide (250 µL) was added dropwise for 2 min. The mixture was stirred at 80 °C for 24 h then concentrated under reduced pressure at 20 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / DCM from 80/20 to 0/100 as eluant to give the product **46** as red powder (0.1 mg, 1%). **LC-MS**: calcd. for $C_{11}H_{15}N_4O_5S$: 315.07 $[M+H]^+$, found: 315.07; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{11}H_{15}N_4O_5S$: 315.0763 $[M+H]^+$, found: 315.0764.

3,6-Dimethoxy-1,2,4,5-tetrazine (47)



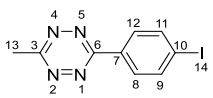
Chemical Formula: $C_4H_6N_4O_2$
Exact Mass: 142.0491
Molecular Weight (g/mol): 142.1180

In a 50 mL round-bottom flask under nitrogen, 3,6-dichloro-1,2,4,5-tetrazine **36** (1 g, 6.6 mmol, 1equiv.) was solubilized in anhydrous DCM (5 mL) at 20 °C. Anhydrous CH_3OH (1 mL, 24.4 mmol) was added then DIPEA (9.5 mL, 53.4 mmol) was added dropwise at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 1 h. The solvents were removed under reduced pressure (20 °C). The residue was purified by chromatography on silica gel using *n*-pentane / AcOEt 5/1 as eluant to give the product **47** as red powder (135.9 mg, 14%). **Rf**: 0.10 (AcOEt/CH_3OH 95/05); **Mp**: 62-64; **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 4.35 (s, 6H, $H_{8,\ 10}$); **^{13}C NMR** (151 MHz, $CDCl_3$) δ 166.5, 56.9; **LC-MS**: calcd. for $C_4H_7N_4O_2$: 143.06 $[M+H]^+$, found: 143.06; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_4H_7N_4O_2$: 143.0569 $[M+H]^+$, found: 143.0571.

2.2.2. From functionalized halophenyltetrazines 37-39

a) Synthesis of precursors 37-39

3-(4-Iodophenyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine [56108-04-4][147,156,162,260,301,302,304,628] (37)



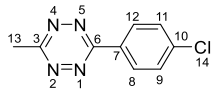
Chemical Formula: $C_9H_7IN_4$
Exact Mass: 297.9715
Molecular Weight (g/mol): 298.0875

In a 250 mL round-bottom flask, 4-iodobenzonitrile **51** (2.0 g, 8.8 mmol), 3-mercaptopropionic acid (0.7 mL, 8.0 mmol), acetonitrile (3 mL, 51.6 mmol), hydrazine monohydrate (50%, 8 mL, 128.4 mmol) in ethanol (2 mL, 29.6 mmol) were stirred at 40 °C for

[628] Kjaer, A.; Herth, M. M.; Battisti, U. M.; Garcia, R. EP3909944A1, May 14, **2020**.

19 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure at 40 °C. Sodium nitrite (4.7 g, 67.9 mmol) in water (50 mL) was added at 0 °C, then hydrochloric acid (37%, 12 mL, 144.9 mmol) diluted in water (250 mL) was carefully added dropwise over 10 min at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 5 min. After extraction with AcOEt (5 x 20 mL), the organic phase was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 40 °C to give the product **37** as a red powder (2.6 g, 93%) which was used directly without further purification. **R_f**: 0.18 (*n*-pentane / DCM 70/30); **Mp**: 160-162 °C; **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.38 – 8.25 (m, 2H, $H_{8, 12}$), 8.00 – 7.90 (m, 2H, $H_{9, 11}$), 3.10 (s, 3H, H_{13}); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 167.7, 163.9, 138.7, 131.4, 129.4, 100.4, 21.4; **^{15}N NMR** (61 MHz, $CDCl_3$): δ 387.1; **IR (cm^{-1})**: 2928, 1695, 1583, 1424, 1399, 1365, 1276, 1239, 1178, 1158, 1116, 1090, 1058, 1003, 937, 920, 890, 845, 829, 814, 796, 707, 641, 626, 559; **LC-MS**: calcd. for $C_9H_8IN_4$: 298.98 $[M+H]^+$, found: 298.98; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_9H_8IN_4$: 298.9794 $[M+H]^+$, found: 298.9797; **Analytical HPLC**: t_R = 28.7 min (PB/EtOH 66/34; λ_{max} = 259.0 nm).

3-(4-Chlorophenyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine [56107-76-7][260,261,294,293,629,630] (38)

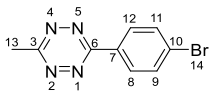


Chemical Formula: $C_9H_7ClN_4$
Exact Mass: 206.0359
Molecular Weight (g/mol): 206.6330

In a 250 mL round-bottom flask, 4-chlorobenzonitrile **48** (2 mL, 14.6 mmol), 3-mercaptopropionic acid (1.3 mL, 14.9 mmol), acetonitrile (4.6 mL, 87.9 mmol), hydrazine monohydrate (50%, 14.5 mL, 232.7 mmol) in ethanol (3 mL, 49.3 mmol) were stirred at 40 °C for 19 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure at 40 °C. Sodium nitrite (7.8 g, 112.2 mmol) in water (50 mL) was added at 0 °C, then hydrochloric acid (37%, 19 mL, 229.4 mmol) diluted in water (250 mL) was carefully added dropwise over 10 min at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 5 min. After extraction with AcOEt (5 x 20 mL), the organic phase was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 40 °C to give the product **38** as a red powder (2.26 g, 75%) which was used directly without further purification. **R_f**: 0.17 (*n*-pentane / DCM 70/30); **Mp**: 140-142 °C; **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.58 – 8.45 (m, 2H, $H_{8, 12}$), 7.62 – 7.50 (m, 2H, $H_{9, 11}$), 3.10 (s, 3H, H_{13}); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 167.5, 163.6, 139.3, 130.4, 129.7, 129.3, 21.3; **^{15}N NMR** (61 MHz, $CDCl_3$): δ 387.0; **IR (cm^{-1})**: 3090, 2927, 1949, 1695, 1589, 1490, 1395, 1365, 1287, 1240, 1173, 1127, 1108, 1092, 1045, 1004, 937, 919, 887, 854, 799, 750, 734, 714, 646, 583, 561, 480, 462; **LC-MS**: calcd. for $C_9H_8ClN_4$: 207.04 $[M+H]^+$, found: 207.05; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_9H_8ClN_4$: 207.0437 $[M+H]^+$, found: 207.0441; calcd. for $C_9H_{10}ClN_4$: 209.0594 $[M+3H]^+$, found: 209.0593; **Analytical HPLC**: t_R = 27.3 min (PB/EtOH 66/34; λ_{max} = 247.2 nm).

[629] Zaschke, H.; Wolff, R.; Pelzl, G.; Demus, D. US4348298A, March 31, **1980**.
[630] Xu, F.; Hu, W.-X.; Zhou, W.; Xia, C.-N. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **2006**, *62* (7), o2875–o2876.

3-(4-Bromophenyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine (39) **[56108-00-0]**[145,260,262,295,296,297,298,299,629]

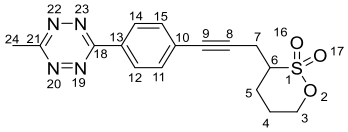


Chemical Formula: $C_9H_7BrN_4$
Exact Mass: 249.9854
Molecular Weight (g/mol): 251.0870

In a 250 mL round-bottom flask, 4-bromobenzonitrile **49** (1.98 g, 10.9 mmol), 3-mercaptopropionic acid (1 mL, 11.5 mmol), acetonitrile (3.4 mL, 65.0 mmol), hydrazine monohydrate (50%, 11 mL, 176.6 mmol) in ethanol (2 mL, 32.9 mmol) were stirred at 40 °C for 15 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure at 40 °C. Sodium nitrite (5.9 g, 85.2 mmol) in water (40 mL) was added at 0 °C, then hydrochloric acid (37%, 15 mL, 181.1 mmol) diluted in water (250 mL) was carefully added dropwise over 10 min at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 5 min. After extraction with AcOEt (4 x 20 mL), the organic phase was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 40 °C to give the product **39** as a red powder (2.7 g, 99%) which was used directly without further purification. **Rf**: 0.16 (*n*-pentane / DCM 70/30); **Mp**: 136 – 138 °C; **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.50 – 8.42 (m, 2H, $H_{8, 12}$), 7.76 – 7.71 (m, 2H, $H_{9, 11}$), 3.10 (s, 3H, H_{13}); **^{13}C NMR** (151 MHz, $CDCl_3$): δ 167.6, 163.7, 132.7, 130.8, 129.5, 127.9, 21.4; **^{15}N NMR** (61 MHz, $CDCl_3$): δ 386.7; **IR (cm^{-1})**: 2928, 1694, 1588, 1423, 1398, 1365, 1277, 1238, 1174, 1157, 1105, 1090, 1071, 1049, 1007, 936, 919, 889, 846, 829, 814, 797, 742, 709, 634, 558, 418; **LC-MS**: calcd. for $C_9H_8{}^{79}BrN_4$: 250.99 $[M+H]^+$, found: 251.01; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_9H_8{}^{79}BrN_4$: 250.9932 $[M+H]^+$, found: 250.9934; **Analytical HPLC**: t_R = 28.2 min (PB/EtOH 66/34; λ_{max} = 251.9 nm).

b) Sonogashira couplings of tetrazines 37-39 with propargyl sultone 15

3-(3-(4-(6-Methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl)prop-2-yn-1-yl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide (52)



Chemical Formula: $C_{16}H_{16}N_4O_3S$
Exact Mass: 344.0943
Molecular Weight (g/mol): 344.3890

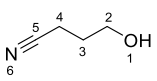
In a 50 mL round-bottom flask under nitrogen, tetrazine **37** (0.1 g, 0.3 mmol), propargylic sultone **15** (0.1 g, 0.7 mmol), bis(triphenylphosphine)palladium (II) dichloride (11.6 mg, 16.5 µmol), copper (I) iodide (7.4 mg, 38.9 mmol) and triethylamine (0.1 mL , 0.7 mmol) in anhydrous acetonitrile (10 mL) were refluxed for 24 h. The mixture was concentrated under reduced pressure at 20 °C. The residue was purified by chromatography on silica gel using *n*-pentane / DCM 80/20 as eluant to give the product **52** as a red powder (11.1 mg, 9%). **Rf**: 0.06 (*n*-pentane/DCM 60/40); **Mp**: T > 190 °C (decomposition); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.29 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, $H_{11, 15}$), 7.93 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, $H_{12, 14}$), 4.64 – 4.43 (m, 2H, $H_{7'}$), 3.70 – 3.45 (m, 1H, H_6), 3.41 – 3.29 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.29 – 3.19 (m, 1H, $H_{3'}$), 3.08 (s, 3H, H_{24}), 3.05 – 2.96 (m, 1H, $H_{7''}$), 2.84 – 2.70 (m, 1H, $H_{4'}$), 2.69 – 2.51 (m, 1H, $H_{3''}$), 2.21 – 2.00 (m, 1H, $H_{5''}$), 2.00 – 1.85 (m, 1H, $H_{4''}$); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 148.1, 147.1, 136.4, 132.0, 129.2, 129.0, 128.6, 128.2, 127.3, 116.5, 72.0, 57.4, 53.1, 46.1, 30.9, 27.5, 23.5; **LC-**

MS: t_R = 10.5 min, calcd. for $C_{16}H_{15}N_4O_3S$: 343.09 $[M-H]^-$, found: 343.01; **HRMS (ESI$^-$)**: calcd. for $C_{16}H_{15}N_4O_3S$: 343.0865 $[M-H]^-$, found: 343.0126.

2.3. Route C: CuAAC reaction between the propargyl sultone 15 and an azidotetrazine

2.3.1. Synthesis of azidotetrazines from tetrazinetosylates

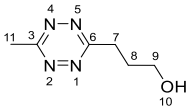
4-Hydroxybutanenitrile [628-22-8][259,374] (53)



Chemical Formula: C_4H_7NO
Exact Mass: 85.0528
Molecular Weight (g/mol): 85.1060

In a 250 mL round-bottom flask, tetrabutylammonium iodide (0.4 g, 1.1 mmol), 18-crown-6 (0.3 g, 1.1 mmol) and potassium cyanide (24.8 g, 373.2 mmol) were solubilized in acetonitrile (30 mL). 3-Chloro-1-propanol **59** (20 mL, 234.3 mmol) was added. The mixture was refluxed for 65 hours. The mixture was filtered by Buchner filtration on a No. 4 frit and the solid residue was washed with diethyl ether (6 x 10 mL). The filtrate was concentrated under reduced pressure at 20 °C. The residue was purified by fractional distillation under reduced pressure (5 mbar) at 149 °C to give the product **53** as a clear colorless oil (13.0 g, 65%). **Rf**: 0.44 (Et_2O); 0.07 (*n*-pentane/DCM 60/40); **Mp**: -15--5 °C; **Bp**: 121 °C at 5 mbar; **^{1}H NMR** (600 MHz, $CDCl_3$): δ 3.58 – 3.47 (m, 2H, H_2), 3.17 (s, 1 H, H_1), 2.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H_4), 1.80 – 1.63 (m, 2H, H_3); **^{13}C NMR** (151 MHz, $CDCl_3$): δ 119.6, 59.7, 27.7, 13.4; **^{1}H NMR** (600 MHz, CD_3OD): δ 4.12 (s, 1H, H_1), 3.01 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H_2), 1.89 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H_4), 1.20 (tt, *J* = 7.2, 6.0 Hz, 2H, H_3); **^{13}C NMR** (151 MHz, CD_3OD): δ 121.0, 60.7, 29.2, 14.0; **IR (cm^{-1})**: 3322, 2934, 2873, 2248, 1737, 1667, 1535, 1422, 1383, 1229, 1056, 911, 868, 590, 475; **LC-MS**: t_R = 0.6 min, calcd. for C_4H_8NO: 86.06 $[M+H]^+$, found: 85.99; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for C_4H_8NO: 86.0606 $[M+H]^+$, found: 86.0606; **Analytical HPLC**: t_R = 1.5 min (PB/EtOH 66/34; λ_{max} = 190 nm).

3-(6-Methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)propan-1-ol [1629962-56-6][126,376] (54)

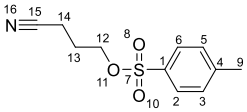


Chemical Formula: $C_6H_{10}N_4O$
Exact Mass: 154.0855
Molecular Weight (g/mol): 154.1730

In a 25 mL sealed tube under nitrogen, nitrile **53** (50 µL, 0.6 mmol), nickel (II) trifluoromethanesulfonate (0.1 g, 0.3 mmol), acetonitrile (1 mL, 24.9 mmol), ethanol (2 mL, 34.2 mmol) and hydrazine monohydrate (50%, 3 mL, 51.4 mmol) were stirred at 60 °C for 24 h. The mixture was then concentrated under reduced pressure at 20 °C. Sodium nitrite (0.8 g, 11.0 mmol) in water (5 mL) was added at 0 °C, then acetic acid (5 mL, 87.2 mmol) diluted in water (15 mL) was carefully added dropwise at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 5 min until the evolution of nitrous oxide stopped. After extraction with DCM (5 x 10 mL), the organic phase was washed with $HCl_{(aq)}$ (1M) (3 x 10 mL), $Na_2CO_{3\ (sat)}$ (1 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under pressure reduced (40 °C). The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / DCM from 60/40 to 0/100 as eluant. The product **54** as a red

powder (13.3 mg, 15%). **Rf**: 0.11 (*n*-pentane/Et_2O 60/40); 0.16 (*n*-pentane/DCM 60/40); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 3.82 – 3.78 (m, 2H, H_9), 3.45 – 3.41 (m, 2H, H_7), 3.04 (s, 3H, H_{11}), 2.23 – 2.21 (m, 2H, H_8), 1.62 – 1.60 (m, 1H, H_{10}); **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_3OD): δ 4.86 (s, 1H, H_{10}), 3.70 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H_9), 3.38 – 3.32 (m, 2H, H_7), 2.97 (s, 3H, H_{11}), 2.18 – 2.10 (m, 2H, H_8); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 169.8, 167.4, 61.8, 31.4, 30.6, 21.1; **^{13}C NMR** (126 MHz, CD_3OD): δ 170.3, 168.9, 44.8, 32.9, 31.6, 21.0; **LC-MS**: calcd. for $C_6H_{11}N_4O$: 155.09 $[M+H]^+$, found: 155.09; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_6H_{11}N_4O$: 155.0927 $[M+H]^+$, found: 155.0924.

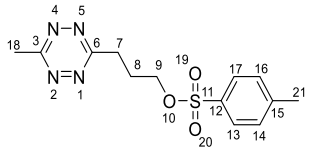
3-Cyanopropyl 4-methylbenzenesulfonate [107289-42-9][631] (60)



Chemical Formula: $C_{11}H_{13}NO_3S$
Exact Mass: 239.0616
Molecular Weight (g/mol): 239.2890

In a 50 mL round-bottom flask, nitrile **53** (1 mL, 11.7 mmol), *p*-toluenesulfonyl chloride (9.1 g, 47.4 mmol) and pyridine (4 mL, 48.2 mmol) were stirred in DCM (5 mL) at 18 °C for 72 h. After extraction with DCM (8 x 10 mL), the organic phase was washed with $HCl_{(aq)}$ (1M) (4 x 10 mL), $NaHCO_{3\ (aq)}$ (2%, 4 x 10 mL), $NaCl_{(sat)}$ (3 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 20 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / AcOEt from 90/10 to 50/50 as eluant to give the product **60** as a colorless oil (99.3 mg, 4%). **Rf**: 0.45 (*n*-pentane/AcOEt 7/3); **^{1}H NMR** (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7.77 – 7.71 (m, 2H, $H_{2,6}$), 7.36 – 7.30 (m, 2H, $H_{3,5}$), 4.11 – 4.05 (m, 2H, H_{14}), 2.43 – 2.38 (m, 5H, $H_{9,12}$), 2.01 – 1.93 (m, 2H, H_{13}); **^{13}C NMR** (151 MHz, $CDCl_3$): δ 121.0, 60.7, 29.2, 14.0; **IR (cm^{-1})**: 2230, 1595, 1355 1175; **LC-MS**: calcd. for $C_{11}H_{14}NO_3S$: 240.07 $[M+H]^+$, found: 240.07; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{11}H_{13}NO_3S$: 239.0617 $[M]^+$, found: 239.0609.

3-(6-Methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)propyl 4-methylbenzenesulfonate [1629962-57-7][126,370] (55)



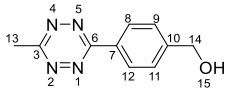
Chemical Formula: $C_{13}H_{16}N_4O_3S$
Exact Mass: 308.0943
Molecular Weight (g/mol): 308.3560

In a 25 mL sealed tube under nitrogen, nitrile **60** (50 µL, 0.4 mmol), nickel (II) trifluoromethanesulfonate (50.2 mg, 0.2 mmol), acetonitrile (130 µL, 2.5 mmol), ethanol (49 µL, 0.8 mmol) and hydrazine monohydrate (50%, 430 µL, 6.7 mmol) were stirred at 60 °C for 24 h. The mixture was then concentrated under reduced pressure at 20 °C. Sodium nitrite (0.4 g, 6.3 mmol) in water (5 mL) was added at 0 °C, then acetic acid (720 µL, 12.6 mmol) diluted in water (15 mL) was carefully added dropwise at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 5 min until the evolution of nitrous oxide stopped. After extraction with DCM (5 x 10 mL), the organic phase was washed with $HCl_{(aq)}$ (1M) (3 x 10 mL), $Na_2CO_{3\ (sat)}$ (1 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under pressure reduced (40 °C). The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / DCM from 60/40 to 0/100 as eluant to give the product

[631] Kobayashi, K.; Suginome, H. *Bull. Chem. Soc. Japon* **1986**, *59* (8), 2635–2636.

55 as a red powder (38.8 mg, 30%). **R_f**: 0.08 (Et_2O or *n*-pentane/DCM 60/40); 0.30 (*n*-pentane/AcOEt 80/20); **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_2Cl_2): δ 7.83 – 7.66 (m, 2H, $H_{14,16}$), 7.43 – 7.28 (m, 2H, $H_{13,17}$), 4.23 – 4.08 (m, 2H, H_9), 3.39 – 3.27 (m, 2H, H_7), 3.00 (s, 3H, H_{18}), 2.45 (s, 3H, H_{21}), 2.32 – 2.22 (m, 2H, H_8); **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_3OD): δ 7.78 – 7.73 (m, 2H, $H_{14, 16}$), 7.43 (d, J = 8.0 Hz, 2H, $H_{13, 17}$), 4.19 (t, J = 6.0 Hz, 2H, H_9), 3.32 – 3.32 (m, 2H, H_7), 2.97 (s, 3H, H_{18}), 2.45 (s, 3H, H_{21}), 2.33 – 2.25 (m, 2H, H_8); **^{13}C NMR** (126 MHz, CD_2Cl_2): δ 169.3, 168.2, 145.7, 133.3, 130.5, 128.4, 69.9, 31.3, 27.3, 21.9, 21.5; **^{13}C NMR** (126 MHz, CD_3OD): δ 171.9, 170.1, 167.8, 145.0, 131.1, 129.0, 70.9, 31.7, 27.8, 21.6, 21.0; **LC-MS**: calcd. for $C_{13}H_{17}N_4O_3S$: 309.10 $[M+H]^+$, found: 309.10; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{13}H_{17}N_4O_3S$: 309.1016 $[M+H]^+$, found: 309.1011.

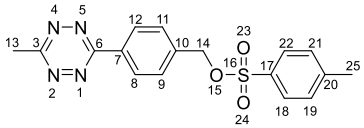
(4-(6-Methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl)methanol [1380500-87-7][147,301,371] (57)



Chemical Formula: $C_{10}H_{10}N_4O$
Exact Mass: 202.0855
Molecular Weight (g/mol): 202.2170

In a 50 mL round-bottom flask, 4-(hydroxymethyl)benzonitrile **56** (0.5 g, 3.6 mmol), nickel (II) trifluoromethanesulfonate (0.7 mL, 1.8 mmol), acetonitrile (2 mL, 38.2 mmol) and hydrazine hydrate (50%, 14.0 mL, 224.7 mmol) were stirred at 61 °C for 36 h. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure (60 °C). Sodium nitrite (6.3 g, 90.9 mmol) in water (10 mL) was added at -15 °C, then hydrochloric acid (37%, 10 mL, 120.8 mmol) diluted in water (10 mL) was carefully added dropwise over 10 min at –2 °C. The reaction mixture was stirred at -2 °C for 5 min. After extraction with AcOEt (6 x 10 mL), the organic phase was washed with water (2 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 40 °C. The residue was purified by chromatography on silica gel using *n*-pentane / AcOEt from 280/100 to 0/100 as eluant to give the product **57** as a red powder (0.3 g, 37%). **R_f**: 0.29 (*n*-pentane/AcOEt 65/45); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.57 (d, J = 8.0 Hz, 2H, $H_{8, 12}$), 7.58 (d, J = 8.0 Hz, 2H, $H_{9, 11}$), 4.83 (s, 2H, H_{14}), 3.09 (s, 3H, H_{13}), 2.03 (s, 1H, H_{15}); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 167.4, 164.1, 145.8, 131.1, 128.3, 127.5, 64.9, 21.3; **IR (cm^{-1})**: 3446, 2069, 1636, 1403, 1362, 1038, 562; **LC-MS**: t_R = 1.7 min, calcd. for $C_{10}H_{11}N_4O$: 203.09 $[M+H]^+$, found: 203.09; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{10}H_{11}N_4O$: 203.0933 $[M+H]^+$, found: 203.0939.

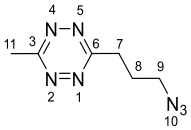
4-(6-Methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl 4-methylbenzenesulfonate [1961217-47-9][371,372] (58)



Chemical Formula: $C_{17}H_{16}N_4O_3S$
Exact Mass: 356.0943
Molecular Weight (g/mol): 356.4000

In a 2 mL reactivial® conical, tetrazine **57** (0.2 g, 1.2 mmol), *p*-toluenesulfonyl chloride (1.0 g, 5.3 mmol) and anhydrous pyridine (0.4 mL, 4.9 mmol) were stirred in DCM (5 mL) at 20 °C for 96 h. After extraction with DCM (5 x 10 mL), the organic phase was washed with $HCl_{(aq)}$ (1 M) (4 x 10 mL), $NaHCO_{3\,(aq)}$ (2%, 4 x 10 mL), $NaCl_{(aq,\,sat)}$ (2 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 40 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / AcOEt from 9/1 to 5/5 as eluant to give the product **58** as a red powder (2.7 mg, 1%). **Rf**: 0.44 (*n*-pentane/AcOEt 70/30); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.55 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, $H_{8,\,12}$), 7.85 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, $H_{9,\,11}$), 7.49 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, $H_{18,\,22}$), 7.36 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, $H_{19,\,21}$), 5.16 (s, 2H, H_{14}), 3.11 (s, 3H, H_{13}), 2.45 (s, 3H, H_{25}); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 167.5, 163.6, 145.1, 137.9, 133.0, 132.3, 129.9, 128.8, 128.1, 128.1, 70.8, 21.7, 21.1; **LC-MS**: calcd. for $C_{17}H_{17}N_4O_3S$: 357.10 $[M+H]^+$, found: 357.10; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{17}H_{17}N_4O_3S$: 357.1021 $[M+H]^+$, found: 357.1021.

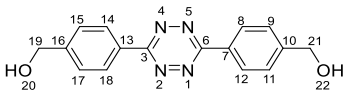
3-(3-Azidopropyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine (61)



Chemical Formula: $C_6H_9N_7$
Exact Mass: 179.0919
Molecular Weight (g/mol): 179.1870

In a 25 mL round-bottom flask, tetrazine **55** (20.1 mg, 65.2 µmol) and sodium azide (8.3 mg, 45.9 mmol) were solubilized in DMF (2 mL). The mixture was stirred at 60 °C for 28 h then concentrated under reduced pressure at 20 °C. After extraction with AcOEt (4 x 5 mL), the organic phase was washed with water (3 x 5 mL), $NaCl_{(sat)}$ (3 x 5 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 20 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / DCM 80/20 as eluant to give the product **61** as a red powder (8.3 mg, 71%). **Rf**: 0.15 (*n*-pentane/DCM 60/40); 0.73 (*n*-pentane/AcOEt 50/50); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 3.49 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H_7), 3.44 – 3.37 (m, 2H, H_9), 3.06 (s, 3H, H_{11}), 2.29 – 2.21 (m, 2H, H_8); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 170.3, 168.9, 44.8, 32.9, 31.6, 21.0; **LC-MS**: calcd. for $C_6H_{10}N_7$: 180.10 $[M+H]^+$, found: 180.10; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_6H_{10}N_7$: 180.0998 $[M+H]^+$, found: 180.1001.

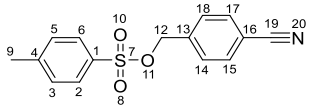
((1,2,4,5-Tetrazine-3,6-diyl)bis(4,1-phenylene))dimethanol [73490-73-0][632] (62)



Chemical Formula: $C_{16}H_{14}N_4O_2$
Exact Mass: 294.1117
Molecular Weight (g/mol): 294.3140

In a 50 mL round-bottom flask, 4-(hydroxymethyl)benzonitrile **56** (1.0 g, 7.1 mmol), nickel (II) trifluoromethanesulfonate (0.7 mL, 1.8 mmol) and hydrazine hydrate (50%, 14 mL, 224.7 mmol) were stirred at 61 °C for 36 h. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure at 60 °C. Sodium nitrite (5.6 g, 81.1 mmol) in water (10 mL) was added at -15 °C, then hydrochloric acid (37%, 10 mL, 120.8 mmol) diluted in water (10 mL) was carefully added dropwise over 10 min at -2 °C. The reaction mixture was stirred at -2 °C for 5 min. After extraction with AcOEt (6 x 10 mL), the organic phase was washed with water (2 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 40 °C. The residue was purified by chromatography on silica gel using *n*-pentane / AcOEt from 28/10 to 5/95 as eluant to give the product **62** as a red powder (0.1 mg, <1%). **R_f**: 0.12 (*n*-pentane/AcOEt 65/45); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): 8.47 (d, J = 8.0 Hz, 4H, $H_{8, 12, 14, 18}$), 7.46 (d, J = 8.0 Hz, 4H, $H_{9, 11, 15, 17}$), 4.83 (s, 4H, $H_{19, 21}$), 2.03 (s, 2H, $H_{20, 22}$); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 165.2, 144.0, 130.2, 129.8, 128.9, 64.8; **LC-MS**: calcd. for $C_{16}H_{16}N_4O_2$: 296.13 $[M+2H]^+$, found: 296.13; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{16}H_{16}N_4O_2$: 296.1273 $[M+2H]^+$, found: 296.1244.

4-Cyanobenzyl 4-methylbenzenesulfonate [128622-53-7][633,634] (63)



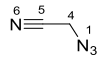
Chemical Formula: $C_{15}H_{13}NO_3S$
Exact Mass: 287.0616
Molecular Weight (g/mol): 287.3330

In a 2 mL reactivial® conical, 4-(hydroxymethyl)benzonitrile **56** (0.1 g, 0.7 mmol), *p*-toluenesulfonyl chloride (0.6 g, 3.2 mmol) and anhydrous pyridine (0.2 mL, 3.1 mmol) were stirred in DCM (5 mL) at 20 °C for 24 h. After extraction with DCM (5 x 10 mL), the organic phase was washed with HCl $_{(aq)}$ (1M) (4 x 10 mL), $NaHCO_{3\ (aq)}$ (2%, 4 x 10 mL), NaCl $_{(aq, sat)}$ (2 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 40 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / AcOEt from 9/1 to 7/3 as eluant to give the product **63** as white powder (0.2 g, 85%). **R_f**: 0.31 (*n*-pentane/ AcOEt 7/3); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.82 – 7.57 (m, 4H, $H_{2, 6, 15, 17}$), 7.53 – 7.35 (m, 4H, $H_{3, 5, 14, 18}$), 5.17 (s, 2H, H_{12}), 2.41 (s, 3H, H_9); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 143.1, 137.7, 134.0, 132.2, 130.1, 128.3, 128.0, 118.6, 110.5, 77.4, 77.1, 76.9, 71.6, 21.5; **LC-MS**: calcd. for $C_{15}H_{14}NO_3S$: 288.07 $[M+H]^+$, found: 288.07; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd for $C_{15}H_{14}NO_3S$: 288.06944 $[M+H]^+$, found: 288.06944.

[632] Anonymous, Research Disclosure, **1980**, *189* (1), 3–4.
[633] Yitzhaki, O.; Hoz, S. *Chem. – Eur. J.* **2015**, *21* (25), 9242–9248.
[634] Fujio, M.; Goto, M.; Susuki, T.; Akasaka, I.; Mishima, M.; Tsuno, Y. *Bull. Chem. Soc. Japon* **1990**, *63* (4), 1146–1153.

2.3.2. Synthesis of azidotetrazines by Pinner reaction with an azidonitrile

2-Azidoacetonitrile [57707-64-9][635,636,637,638] (68)

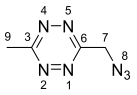


Chemical Formula: $C_2H_2N_4$
Exact Mass: 82.0279
Molecular Weight (g/mol): 82.0660

In a 50 mL round-bottom flask, a mixture of 1-bromo-1-nitrile **66** (2.0 g, 16.2 mmol), sodium azide (10.8 g, 59.8 mmol) and potassium iodide (1.4 g, 8.4 mmol) in acetone (15 mL) was stirred at 20 °C for 16 h. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure at 20 °C. The residue was purified by Buchner filtration on a No. 4 frit on silica 15 g using *n*-pentane / DCM 90/10 as eluant at 0 °C. Collected product was concentrated under reduced pressure at 20 °C to give the product **68** as a light-yellow oil (0.3 g, 26%) which was used directly without further purification. **Rf**: 0.24 (*n*-pentane/DCM 80/20); **Bp**: 52-54 °C; **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 4.06 (s, 2H, H_4); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 114.2, 38.1; **IR (cm^{-1})**: 2255, 2113; **LC-MS**: calcd. for $C_2H_3N_4$: 83.04 $[M+H]^+$, found: 83.04; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_2H_3N_4$: 83.0358 $[M+H]^+$, found: 83.0358.

Caution: 2-Azidoacetonitrile are nitrogen-rich molecules which can be very reactive in releasing dinitrogen. We have not experienced any difficulty or accident while performing this protocol.

3-(Azidomethyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine (64)

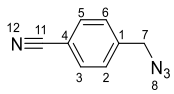


Chemical Formula: $C_4H_5N_7$
Exact Mass: 151.0606
Molecular Weight (g/mol): 151.1330

In a 250 mL round-bottom flask, nitrile **68** (0.56 g, 6.8 mmol), 3-mercaptopropionic acid (0.6 mL, 6.9 mmol), acetonitrile (2 mL, 38.2 mmol), hydrazine monohydrate (50%, 7 mL, 112.4 mmol) in ethanol (1.4 mL, 23.0 mmol) were stirred at 40 °C for 21 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure at 40 °C. Sodium nitrite (3.5 g, 50.8 mmol) in water (50 mL) was added at 0 °C, then hydrochloric acid (37%, 8.5 mL, 102.6 mmol) diluted in water (200 mL) was carefully added dropwise over 10 min at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 5 min. After extraction with AcOEt (5 x 20 mL), the organic phase was washed with water (2 x 10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 40 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / DCM from 90/10 to 0/100 as eluant to give the product **64** as a red powder (0.1 g, 10%). **Rf**: 0.39 (*n*-pentane/DCM 60/40); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 4.27 (s, 2H, H_7), 3.04 (s, 3H, H_9); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 166.6, 165.3, 77.4, 77.2, 76.9, 45.6, 21.7; **LC-MS**: calcd. for $C_4H_6N_7$: 152.07 $[M+H]^+$, found: 152.07; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_4H_6N_7$: 152.0685 $[M+H]^+$, found: 152.0688.

[635] Martins, F.; Duarte, M. F.; Fernandez, M. T.; Langley, G. J.; Rodrigues, P.; Barros, M. T.; Costa, M. L. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18* (3), 363–366.
[636] Algarra, M.; Soto, J. *ChemPhysChem* **2020**, *21* (11), 1126–1133.
[637] Golas, P. L.; Tsarevsky, N. V.; Matyjaszewski, K. *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, *29* (12–13), 1167–1171.
[638] Verkhozina, O. N.; Kizhnyaev, V. N.; Vereshchagin, L. I.; Rokhin, A. V.; Smirnov, A. I. *Russ. J. Org. Chem.* **2003**, *39* (12), 1792–1796.

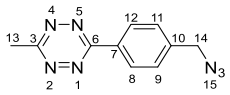
4-(Azidomethyl)benzonitrile [84466-87-5][642,639,640] (70)



Chemical Formula: $C_8H_6N_4$
Exact Mass: 158.0592
Molecular Weight (g/mol): 158.1640

In a 50 mL round-bottom flask, 4-(bromomethyl)benzonitrile **6** (5.1 g, 26.2 mmol), sodium azide (8.5 g, 130.6 mmol) and potassium iodide (2.1 g, 12.7 mmol) in acetone (15 mL) were stirred at 27 °C for 15 h. The residue was purified by Buchner filtration through a No. 4 frit on DCM at 0 °C and FlashPad on silica 15 g using DCM as eluant at 0 °C to give the product **70** as a light-yellow oil (4.0 g, 97%) which was used directly without further purification. **Rf**: 0.34 (*n*-pentane/DCM 80/20); **Mp**: 0-4 °C; **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.65 – 7.52 (m, 2H, $H_{3,5}$), 7.38 (d, J = 8.1 Hz, 2H, $H_{2,6}$), 4.39 (s, 2H, H_7); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 140.6, 132.3, 128.3, 118.2, 111.6, 53.6; **IR (cm^{-1})**: 2932, 2229, 2095, 1738, 1610, 1505, 1439, 1414, 1346, 1291, 1255, 1205, 1117, 1021, 914, 847, 814, 751, 696, 659, 548, 494, 418; **LC-MS**: t_R = 10.8 min, calcd. for $C_8H_7N_4$: 159.07 $[M+H]^+$, found: 158.99; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_8H_7N_4$: 159.0671 $[M+H]^+$, found: 158.9929; **Analytical HPLC**: t_R = 27.3 min (PB/EtOH 66/34; λ_{max} = 305.4 nm).

3-(4-(Azidomethyl)phenyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine (65)



Chemical Formula: $C_{10}H_9N_7$
Exact Mass: 227.0919
Molecular Weight (g/mol): 227.2310

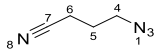
In a 250 mL round-bottom flask, nitrile **70** (2.0 g, 12.7 mmol), 3-mercaptopropionic acid (1 mL, 12.6 mmol), acetonitrile (9 mL, 179.6 mmol), hydrazine monohydrate (50%, 12 mL, 202.3 mmol) in ethanol (10 mL, 164.4 mmol) were stirred at 45 °C for 24 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure at 40 °C. Sodium nitrite (6.9 g, 98.7 mmol) in water (20 mL) was added, then formic acid (10 mL, 265.0 mmol) diluted in water (10 mL) was carefully added dropwise over 10 min at -5 °C (to pH 4-5). The mixture was stirred at -5 °C for 5 min. After extraction with diethyl ether (3 x 10 mL), the organic phase was washed with sodium thiosulfate (5%, 2 x 5 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 40 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / DCM from 100/0 to 85/15 to 0/100 as eluant to give the product **65** as a red powder (1.1 g, 48%). **Rf**: 0.32 (*n*-pentane/DCM 30/70); 0.78 (DCM); 0.30 (*n*-pentane/Et_2O 70/30); 0.15 (*n*-pentane/AcOEt 50/1); **Mp**: 108 – 110 °C; 75 °C (at 6.8 x 10^{-3} bar); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.67 – 8.53 (m, 2H, $H_{8,12}$), 7.57 – 7.50 (m, 2H, $H_{9,11}$), 4.48 (s, 2H, H_{14}), 3.11 (s, 3H, H_{13}); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 167.5, 163.9, 140.2, 131.9, 129.0, 128.5, 54.5, 21.3; **^{15}N NMR** (61 MHz, $CDCl_3$): δ 385.5, 244.6, 73.4; **IR (cm^{-1})**: 2918, 2200, 2100, 1611, 1434, 1399, 1365, 1347, 1295, 1261, 1201, 1179, 1089, 1037, 1015, 956, 938, 892, 837, 795, 713, 643, 626, 587, 560; **LC-MS**: t_R = 7.2 min, calcd. for $C_{10}H_{10}N_7$: 228.10 $[M+H]^+$, found: 227.10; **HRMS (ESI$^+$)**:

[639] Ryu, J. S.; Lee, Y. WO2021137665A1, July 8, **2021**.
[640] Chen, G.; Zhou, Y.; Cai, C.; Lu, J.; Zhang, X. *Molecules* **2014**, *19* (5), 5674–5691.

calcd. for $C_{10}H_{10}N_7$: 228.0998 $[M+H]^+$, found: 228.0995; **Analytical HPLC**: t_R = 31.3 min (PB/EtOH 66/34; λ_{max} = 266.1 nm).

Alternative: The residue was also purified by chromatography on silica gel using *n*-pentane / AcOEt from 50/01 to 50/50 as eluant.

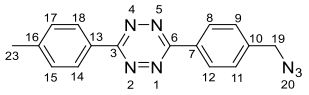
4-Azidobutanenitrile [21994-40-1][641,642,643,644] (69)



Chemical Formula: $C_4H_6N_4$
Exact Mass: 110.0592
Molecular Weight (g/mol): 110.1200

In a 50 mL round-bottom flask, 4-bromobutanenitrile **67** (1.2 g, 8.4 mmol), sodium azide (3.3 g, 50.9 mmol) and potassium iodide (0.7 g, 4.5 mmol) were stirred in acetone (50 mL) at 30 °C for 15 h. The residue was purified by Buchner filtration through a No. 4 frit on DCM at 0 ° C and FlashPad on silica 15 g using DCM as eluant at 0 °C to give the product **69** as white powder (0.9 g, 97% yield). **Rf**: 0.51 (*n*-pentane/DCM 60/40); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 3.50 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H_4), 2.47 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H_6), 1.95 – 1.88 (m, 2H, H_5); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 118.6, 49.3, 24.9, 14.3; **IR (cm^{-1})**: 2096, 1425, 1349, 1292, 1255, 882; **LC-MS**: calcd. for $C_4H_7N_4$: 111.07 $[M+H]^+$, found: 111.07; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_4H_7N_4$: 111.0671 $[M+H]^+$, found: 111.0674.

3-(4-(Azidomethyl)phenyl)-6-(*p*-tolyl)-1,2,4,5-tetrazine (71)

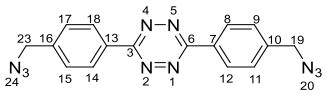


Chemical Formula: $C_{16}H_{13}N_7$
Exact Mass: 303.1232
Molecular Weight (g/mol): 303.3290

In a 100 mL round-bottom flask, nitrile **70** (1 mL, 6.4 mmol), 3-mercaptopropionic acid (0.5 mL, 6.3 mmol), *p*-tolunitrile **20** (1 mL, 7.4 mmol), hydrazine monohydrate (50%, 6 mL, 101.1 mmol) in ethanol (1 mL, 21.4 mmol) were stirred at 40 °C for 21 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure at 40 °C. Sodium nitrite (2.2 g, 31.3 mmol) in water (50 mL) was added at 0 °C, then hydrochloric acid (37%, 5.3 mL, 64.0 mmol) diluted in water (200 mL) was carefully added dropwise over 10 min at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 5 min. After extraction with AcOEt (5 x 20 mL), the organic phase was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 40 °C. The residue was purified by chromatography on silica gel using *n*-pentane / DCM from 80/10 to 0/100 as eluant to give the product **71** as a red powder (0.1 g, 8%). **Rf**: 0.28 (*n*-pentane/DCM 60/40); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.70 – 8.61 (m, 2H, $H_{8, 12}$), 8.57 – 8.49 (m, 2H, $H_{14, 18}$), 7.60 – 7.53 (m, 2H, $H_{9, 11}$), 7.46 – 7.37 (m, 2H, $H_{15, 17}$), 4.54 – 4.41 (m, 2H, H_{19}), 2.48 (d, *J* = 9.0 Hz, 3H, H_{23}); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 143.9, 140.5, 132.8, 131.9, 131.0, 130.3, 129.0, 128.6, 128.5, 128.1, 54.5, 21.9; **LC-MS**: calcd. for $C_{16}H_{14}N_7$: 304.14 $[M+H]^+$, found: 304.14; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{16}H_{14}N_7$: 304.1311 $[M+H]^+$, found: 304.1368.

[641] Yuan, H.; Silverman, R. B. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (5), 1331–1338.
[642] Díez-González, S.; Nolan, S. P. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2008**, *47* (46), 8881–8884.
[643] Colombano, G.; Travelli, C.; Galli, U.; Caldarelli, A.; Chini, M. G.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Bifulco, G.; Tron, G. C.; Genazzani, A. A. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (2), 616–623.
[644] Xu, X.; Zhong, Y.; Xing, Q.; Gao, Z.; Gou, J.; Yu, B. *Org. Lett.* **2020**, *22* (13), 5176–5181.

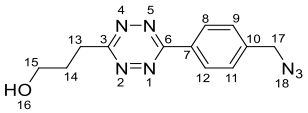
3,6-Bis(4-(azidomethyl)phenyl)-1,2,4,5-tetrazine (72)



Chemical Formula: $C_{16}H_{12}N_{10}$
Exact Mass: 344.1246
Molecular Weight (g/mol): 344.3420

In a 100 mL round-bottom flask, nitrile **70** (2 mL, 12.6 mmol), 3-mercaptopropionic acid (0.6 mL, 6.5 mmol), hydrazine monohydrate (50%, 6.3 mL, 101.1 mmol) in ethanol (1.3 mL, 21. 4 mmol) were stirred at 40 °C for 20 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure at 40 °C. Sodium nitrite (2.0 g, 28.8 mmol) in water (50 mL) was added at 0 °C, then hydrochloric acid (37%, 5.3 mL, 64.0mmol) diluted in water (200 mL) was carefully added dropwise over 10 min at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 5 min. After extraction with AcOEt (5 x 20 mL), the organic phase was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 40 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / DCM from 80/10 to 0/100 as eluant to give the product **72** as a red powder (1.2 g, 27%). **R**$_f$: 0.29 (*n*-pentane/DCM 60/40); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.68 (d, J = 8.1 Hz, 4H, $H_{8, 12, 14, 18}$), 7.58 (d, J = 8.1 Hz, 4H, $H_{9, 11, 15, 17}$), 4.50 (s, 4H, 2, $H_{19, 23}$); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 164.0 (s, 1H), 143.4 (s, 1H), 130.2 (s, 3H), 129.3 (s, 1H), 128.0 (s, 3H), 54.7 (s, 2H), 77.41 (s, 40H), 77.16 (s, 40H), 76.91 (s, 40H); **^{15}N NMR** (61 MHz, $CDCl_3$): δ 386.1, 248.5; **IR (cm^{-1})**: 2923, 2224, 2099, 1713, 1639, 1611, 1541, 1397, 1363, 1343, 1299, 1243, 1180, 1124, 1105, 1089, 1051, 1015, 915, 892, 822, 797, 713, 694, 639, 585, 561, 461; **LC-MS**: calcd. for $C_{16}H_{13}N_{10}$: 345.13 $[M+H]^+$, found: 345.13; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{16}H_{13}N_{10}$: 345.1324 $[M+H]^+$, found: 345.1324.

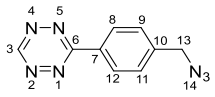
3-(6-(4-(Azidomethyl)phenyl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)propan-1-ol (73)



Chemical Formula: $C_{12}H_{13}N_7O$
Exact Mass: 271.1182
Molecular Weight (g/mol): 271.2840

In a 100 mL round-bottom flask, nitrile **70** (0.5 mL, 3.2 mmol), 3-mercaptopropionic acid (0.3 mL, 3.4 mmol), nitrile **53** (1.6 g, 19.0 mmol), hydrazine monohydrate (50%, 3.2 mL, 51.4 mmol) in ethanol (10 mL, 164.4 mmol) were stirred at 45 °C for 72 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure at 40 °C. Sodium nitrite (1.7 g, 24.1 mmol) in water (15 mL) was added at 0 °C, then hydrochloric acid (37%, 4 mL, 48.3 mmol) diluted in water (10 mL) was added carefully dropwise over 10 min at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 5 min. After extraction with DCM (6 x 10 mL), then AcOEt (3 x 10 mL), the organic phase was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 40 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / DCM from 80/20 to 0/100 as eluant to give the product **73** as a red powder (73.1 mg, 8%). R_f: 0.12 (*n*-pentane/DCM 60/40); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.61 (d, J = 8.1 Hz, 2H, $H_{8, 12}$), 7.58 (d, J = 8.1 Hz, 2H, $H_{9, 11}$), 4.48 (s, 2H, H_{17}), 4.45 (s, 1H, H_{16}), 3.85 – 3.80 (m, 2H, H_{15}), 3.52 – 3.47 (m, 2H, H_{13}), 2.27 – 2.25 (m, 2H, H_{14}); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 173.6, 166.6, 137.0, 130.9, 129.7, 129.1, 61.2, 51.3, 32.1, 30.5; **LC-MS**: calcd. for $C_{12}H_{13}N_7O$: 272.13 $[M+H]^+$, found: 272.13; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{12}H_{13}N_7O$: 272.1259 $[M+H]^+$, found: 272.1260.

3-(4-(Azidomethyl)phenyl)-1,2,4,5-tetrazine (75)

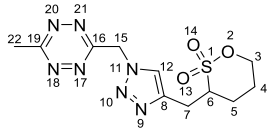


Chemical Formula: $C_9H_7N_7$
Exact Mass: 213.0763
Molecular Weight (g/mol): 213.2040

In a 50 mL round-bottom flask, nitrile **70** (0.4 mL, 2.6 mmol), 3-mercaptopropionic acid (0.2 mL, 2.6 mmol), formamidine acetate (1.3 g, 12.9 mmol), hydrazine monohydrate (50%, 2.6 mL, 41.7 mmol) in ethanol (0.5 mL, 8.7 mmol) were stirred at 45 °C for 17 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure at 40 °C. Sodium nitrite (0.9 g, 12.8 mmol) in water (15 mL) was added at 0 °C, then hydrochloric acid (37%, 5 mL, 62.1 mmol) diluted in water (10 mL) was carefully added dropwise over 10 min at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 5 min. After extraction with AcOEt (5 x 20 mL), the organic phase was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure at 40 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / DCM from 80/20 to 0/100 as eluant to give the product **75** as a red powder (67.3 mg, 12%). **R_f**: 0.31 (*n*-pentane/DCM 70/30); **Mp**: 56 – 58 °C; **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 10.21 (s, 1H, H_3), 8.60 (d, J = 8.3 Hz, 2H, $H_{8, 12}$), 7.52 (d, J = 8.3 Hz, 2H, $H_{9, 11}$), 4.46 (s, 2H, H_{13}); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 166.2, 158.0, 140.9, 131.6, 129.0, 128.9, 54.4; **LC-MS**: calcd. for $C_9H_8N_7$: 214.08 $[M+H]^+$, found: 214.08; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_9H_8N_7$: 214.0841 $[M+H]^+$, found: 214.0846; **Analytical HPLC**: t_R = 30.3 min (PB/EtOH 66/34; λ_{max} = 256.4 nm).

2.3.3. CuAAC reaction between azidotetrazines and propargyl sultone 15

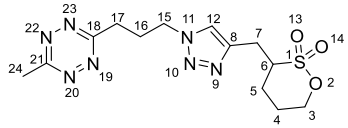
3-((1-((6-Methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide (76)



Chemical Formula: $C_{11}H_{15}N_7O_3S$
Exact Mass: 325.0957
Molecular Weight (g/mol): 325.3470

In a 250 mL round-bottom flask under nitrogen, tetrazine **64** (0.6 g, 4.1 mmol), propargylic sultone **15** (0.7 g, 4.2 mmol), copper (II) acetate (60.0m g, 0.5 mmol) and sodium ascorbate (90.0 mg, 0.4 mmol) were refluxed in acetone (5 mL) for 13 h. The mixture was concentrated under reduced pressure at 30 °C. The residue was solubilized in AcOEt (10 mL), filtered through Celite® 545 (10 g), washed with AcOEt (5 x 20 mL) and concentrated under reduced pressure at 30 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / AcOEt from 98/02 to 0/100 as eluant to give the product **76** as red powder (13.5 mg, <1%). **R_f**: 0.36 (*n*-pentane/Et_2O 50/50); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.50 (s, 1H, H_{12}), 5.62 (s, 2H, H_{15}), 4.59 – 4.50 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.50 – 4.42 (m, 1H, $H_{5'}$), 4.15 – 4.06 (m, 1H, $H_{3''}$), 3.53 – 3.46 (m, 1H, H_6), 3.44 – 3.38 (m, 1H, $H_{7'}$), 3.09 (s, 3H, H_{22}), 3.03 (dd, J = 15.2, 8.1 Hz, 1H, $H_{7''}$), 2.32 – 2.25 (m, 1H, $H_{5''}$), 1.95 – 1.81 (m, 2H, H_4); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 167.7, 163.7, 139.1, 122.8, 74.1, 59.2, 53.9, 28.7, 25.2, 24.0, 21.4; **LC-MS**: calcd. for $C_{11}H_{16}N_7O_3S$: 326.10 $[M+H]^+$, found: 326.10; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{11}H_{16}N_7O_3S$: 326.1035 $[M+H]^+$, found: 326.1035.

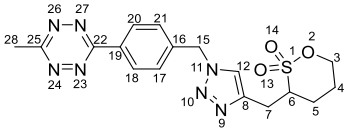
3-((1-(3-(6-Methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)propyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide (77)



Chemical Formula: $C_{13}H_{19}N_7O_3S$
Exact Mass: 353.1270
Molecular Weight (g/mol): 353.4010

In a 250 mL round-bottom flask under nitrogen, tetrazine **61** (1.0 mg, 6.6 µmol), propargylic sultone **15** (1.2 mg, 6.7 µmol), copper (II) acetate (0.1 g, 0.8 µmol) and sodium ascorbate (0.2 mg, 1.0 µmol) were refluxed in acetone (0.5 mL) for 13 h. The mixture was concentrated under reduced pressure at 30 °C. The residue was solubilized in AcOEt (10 mL), filtered through Celite® 545 (1 g), washed with AcOEt (5 x 2 mL) and concentrated under reduced pressure at 30 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / AcOEt from 98/02 to 0/100 as eluant to give the product **77** as red powder (<0.1 mg, <1%). **R_f**: 0.30 (*n*-pentane/Et_2O 50/50); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 10.22 (s, 1H, H_{12}), 4.55 – 4.48 (m, 2H, H_3), 3.49 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H_{15}), 3.42 – 3.39 (m, 2H, H_{17}), 3.26 – 3.20 (m, 1H, H_6), 3.06 (s, 3H, H_{24}), 3.00 – 2.94 (m, 1H, $H_{7'}$), 2.57 – 2.54 (m, 1H, $H_{5'}$), 2.51 – 2.48 (m, 1H, $H_{7''}$), 2.27 – 2.23 (m, 1H, $H_{5''}$), 2.12 – 2.10 (m, 1H, $H_{4''}$), 2.08 – 2.04 (m, 1H, $H_{4'}$), 1.95 – 1.89 (m, 2H, H_{16}); **LC-MS**: calcd. for $C_{13}H_{20}N_7O_3S$: 354.13 $[M+H]^+$, found: 354.13; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{13}H_{20}N_7O_3S$: 354.1348 $[M+H]^+$, found: 354.1351.

3-((1-(4-(6-Methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1,2-oxathiane 2,2-dioxide (78)



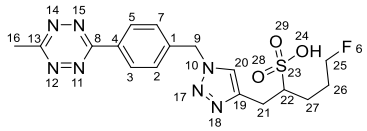
Chemical Formula: $C_{17}H_{19}N_7O_3S$
Exact Mass: 401.1270
Molecular Weight (g/mol): 401.4450

In a 250 mL round-bottom flask under nitrogen, tetrazine **65** (1.5 g, 6.5 mmol), propargylic sultone **15** (1.1 g, 6.5 mmol), copper (II) acetate (0.1 g, 0.6 mmol) and sodium ascorbate (0.1 g, 0.7 mmol) were refluxed in acetone (6 mL) for 2 h. The mixture was concentrated under reduced pressure at 30 °C. The residue was solubilized in AcOEt (10 mL), filtered through Celite® 545 (10 g), washed with AcOEt (5 x 20 mL) and concentrated under reduced pressure at 30 °C. The residue was purified by flash chromatography using *n*-pentane / AcOEt from 50/01 to 0/100 as eluant to give the product **78** as a red powder (1.3 g, 49%). **R_f**: 0.33 (AcOEt); 0.24 (*n*-pentane/AcOEt 20/80); **Mp**: 130 °C (Not sublimable); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.59 – 8.55 (m, 2H, $H_{18, 20}$), 7.50 (s, 1H, H_{12}), 7.46 – 7.42 (m, 2H, $H_{17, 21}$), 5.62 (s, 2H, H_{15}), 4.59 – 4.50 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.50 – 4.42 (m, 1H, $H_{3''}$), 3.53 – 3.46 (m, 1H, H_6), 3.44 – 3.38 (m, 1H, $H_{7'}$), 3.09 (s, 3H, H_{28}), 3.03 (dd, *J* = 15.2, 8.1 Hz, 1H, $H_{5'}$), 2.32 – 2.25 (m, 1H, $H_{7''}$), 2.07 – 1.95 (m, 1H, $H_{5''}$), 1.95 – 1.81 (m, 2H, H_4); **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_3CN): δ 8.56 – 8.45 (m, 2H, $H_{18, 20}$), 7.75 (s, 1H, H_{12}), 7.55 – 7.45 (m, 2H, $H_{17, 21}$), 5.66 (s, 2H, H_{15}), 4.53 – 4.42 (m, 2H, H_3), 3.56 – 3.44 (m, 1H, H_6), 3.35 (dd, *J* = 14.9, 5.0 Hz, 1H, $H_{7'}$), 3.01 (s, 3H, H_{28}), 2.96 (dd, *J* = 14.9, 9.2 Hz, 1H, $H_{5'}$), 2.20 – 2.10 (m, 1H, $H_{7''}$), 1.92 – 1.78 (m, 3H, 4, $H_{4, 5''}$); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 167.7, 163.7, 139.1, 132.4, 128.8, 128.8, 123.0, 122.8, 74.1, 59.2, 53.9, 28.7, 25.2, 24.0, 21.4; **IR (cm^{-1})**: 2948, 1738, 1612, 1465, 1407, 1350, 1217,

1168, 1129, 1115, 1091, 1058, 1015, 947, 921, 889, 862, 784, 695, 681, 641, 627, 599, 564, 537, 520, 499, 436, 413; **LC-MS**: t_R = 8.7 min, calcd. for $C_{17}H_{20}N_7O_3S$: 402.14 $[M+H]^-$, found: 401.88; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{17}H_{20}N_7O_3S$: 402.1348 $[M+H]^+$, found: 402.1345; **Analytical HPLC**: t_R = 20.3 min (PB/EtOH 66/34; λ_{max} = 265.2 nm); **Preparative HPLC**: t_R = 34-36 min (PB/EtOH 72/28; λ = 254.0 nm).

3. Ring opening of tetrazinesultone 78

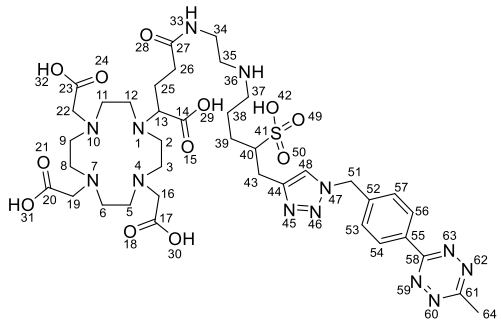
5-(Fluoro)-1-(1-(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)pentane-2-sulfonic acid (79)



Chemical Formula: $C_{17}H_{20}FN_7O_3S$
Exact Mass: 421.1332
Molecular Weight (g/mol): 421.4514

In a 2 mL reactivial® conical, under nitrogen, tetrazinesultone **78** (26.2 mg, 62.3 µmol) and cesium fluoride (8.8 mg, 58.0 µmol) in acetonitrile (1 mL) was refluxed for 30 min. The mixture was concentrated under reduced pressure at 40 °C. The residue was purified by flash chromatography using H_2O / CH_3CN / TFA: 7/3/0.1 as eluant to give the product **79** as a red powder (0.2 mg, <1%). **Rf**: 0.33 (CH_3OH); 0.31 (CH_3CN/TFA 98/02); 0.84 (CH_3CN/TFA 70/30); **Mp**: T > 190 °C (decomposition); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.60 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, $H_{3,5}$), 7.69 (s, 1H, H_{20}), 7.43 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, $H_{2,7}$), 5.60 (s, 2H, H_9), 4.44 – 4.24 (m, 2H, H_{25}), 3.44 – 3.36 (m, 1H, H_{22}), 3.13 – 3.01 (s, 3H, H_{16}), 3.01 – 2.92 (m, 2H, H_{21}), 2.49 (s, 1H, H_{24}), 2.05 – 1.82 (m, 2H, H_{27}), 1.76 – 1.64 (m, 2H, H_{26}); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 167.7, 163.7, 139.1, 132.4, 128.8, 128.8, 123.1, 122.8, 74.1, 59.2, 53.9, 28.7, 25.2, 24.0, 21.4; **^{19}F NMR** (471 MHz, $CDCl_3$): **-**218.7; **LC-MS**: t_R = 6.8 min, calcd. for $C_{17}H_{19}{}^{19}FN_7O_3S$: 420.12 $[M-H]^-$, found: 420.02; **HRMS (ESI$^-$)**: calcd. for $C_{17}H_{19}{}^{19}FN_7O_3S$: 420.1254 $[M-H]^-$, found: 420.1256; **Analytical HPLC**: t_R = 14.3 (new column) to 11.3 min (1.5-year column) (PB/EtOH 66/34; λ_{max} = 264.9 nm); **Preparative HPLC**: t_R = 28-29 min (PB/EtOH 72/28; λ = 254.0 nm); t_R = 31-32 min (CH_3CN/NH_4OAc (50 mM in H_2O) 20/80; λ = 254.0 nm); t_R = 16-17 min (CH_3CN/TFA (0.5% in H_2O) 40/60; λ = 254.0 nm).

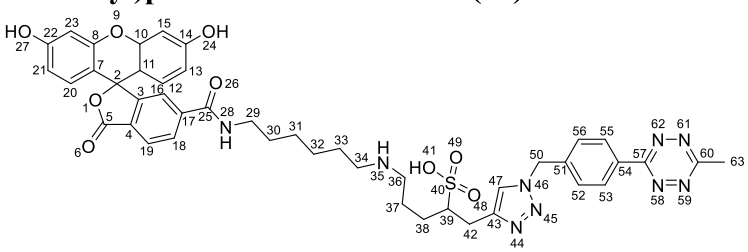
2,2',2''-(10-(1-Carboxy-4-((2-((5-(1-(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-4-sulfopentyl)amino)ethyl)amino)-4-oxobutyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid (80)



Chemical Formula: $C_{38}H_{57}N_{13}O_{12}S$
Exact Mass: 919.3970
Molecular Weight (g/mol): 920.0130

In a 4 mL conical reactivial® under nitrogen, tetrazinesultone **78** (1.0 mg, 2.5 µmol) and DOTA-GA-amine **81** (1.3 mg, 2.5 µmol) were stirred in acetonitrile (500 µL) at 20 °C. s-Collidine (0.7 µL, 5.0 µmol) was added. The mixture was stirred at 60 °C for 30 min then concentrated under reduced pressure at 40 °C to give the product **80** as red powder (1.3 mg, 6%). **LC-MS**: calcd. for $C_{38}H_{56}N_{13}O_{12}S$: 918.39 $[M-H]^-$, found: 918.39; **HRMS (ESI$^-$)**: calcd. for $C_{38}H_{56}N_{13}O_{12}S$: 918.3892 $[M-H]^-$, found: 918.3892.

5-((6-(3',6'-Dihydroxy-3-oxo-4a',9a'-dihydro-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthene]-6-carboxamido)hexyl)amino)-1-(1-(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)pentane-2-sulfonic acid (82)



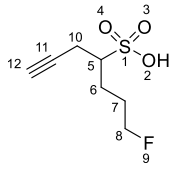
Chemical Formula: $C_{44}H_{45}N_9O_9S$
Exact Mass: 875.3061
Molecular Weight (g/mol): 875.9580

In a 4 mL conical reactivial® under nitrogen, tetrazinesultone **78** (1.0 mg, 2.5 µmol) and 6-FAM amine **83** (1.3 mg, 2.5 µmol) were stirred in acetonitrile (500 µL) at 20 °C. s-Collidine (0.6 µL, 4.9 µmol) was added. The mixture was stirred at 60 °C for 30 min then concentrated under reduced pressure at 40 °C to give the product **82** as red powder (0.3 mg, 12%). **LC-MS**: calcd. for $C_{44}H_{46}N_9O_9S$: 876.31 $[M+H]^+$, found: 876.31; **HRMS (ESI$^+$)**: calcd. for $C_{44}H_{46}N_9O_9S$: 876.3139 $[M+H]^+$, found: 876.3138.

4. Fluoration in two steps

4.1. Fluoration of propargylic sultone 15

7-(Fluoro)hept-1-yne-4-sulfonic acid [2261035-13-4][618] (84)

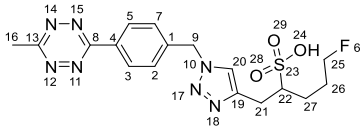


Chemical Formula: $C_7H_{11}FO_3S$
Exact Mass: 194.0413
Molecular Weight (g/mol): 194.2204

Cesium fluoride (4.4 mg, 29.0 µmol) and propargylic sultone **15** (5.0 mg, 28.5 µmol) in acetonitrile (1 mL) were refluxed for 30 min then cooled to 20 °C. The mixture was then concentrated under reduced pressure at 40 °C. The residue was solubilized in water (1 mL), filtered through Sep-Pak® Light QMA, washed with water (1 mL) and eluted with acetonitrile (3 x 0.5 mL). The filtrate was concentrated under reduced pressure at 40 °C to give the product **84** as a white powder (9.2 mg, 99%) which was used directly without further purification. **R**r: 0.01 (CH_3OH); 0.95 (CH_3CN/TFA 98/02); 0.01 (CH_3CN/TFA 70/30); **Mp**: T > 190 °C (decomposition); **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_3OD): δ 4.50 – 4.28 (m, 2H, H_8), 2.88 – 2.70 (m, 2H, H_{10}), 2.45 – 2.34 (m, 1H, H_5), 2.32 (t, *J* = 2.8 Hz, 1H, H_{12}), 2.00 – 1.87 (m, 4H, $H_{6, 7}$); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 4.46 – 4.19 (m, 2H, H_8), 2.78 – 2.61 (m, 2H, H_{10}), 2.44 – 2.30 (m, 1H, H_5), 2.00 – 1.92 (s, 1H, H_{12}), 1.91 – 1.70 (m, 3H, $H_{6', 7}$), 1.59 – 1.16 (m, 1H, $H_{6''}$); **^{13}C NMR** (126 MHz, CD_3OD): δ 86.1, 83.5, 81.5, 71.0, 58.0, 25.9, 20.6; **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 84.6, 83.3, 81.0, 70.1, 57.7, 25.3, 19.8; **^{19}F NMR** (471 MHz, $CDCl_3$): δ -215.3; **LC-MS**: t_R = 1.4 min, calcd. for $C_7H_{10}FO_3S$: 193.03 $[M-H]^-$, found: 193.20; calcd. for Cs: 132.90 $[Cs]^+$, found: 132.91; **HRMS (ESI$^-$)**: calcd. for $C_7H_{10}FO_3S$: 193.0335 $[M-H]^-$, found: 193.0342; **Analytical HPLC**: t_R = 8.6 min (PB/EtOH 66/34; λ_{max} = 222.4 nm); **Preparative HPLC**: t_R = 7-8 min (PB/EtOH 72/28; λ = 254.0 nm); t_R = 6-7 min (CH_3CN/NH_4OAc (50 mM in H_2O) 20/80; λ = 254.0 nm); t_R = 4-5 min (CH_3CN/TFA (0.5% in H_2O) 20/80; λ = 254.0 nm).

4.2. CuAAC reaction between propargylic fluorosulfonate 84 and azido tetrazine 65

5-(Fluoro)-1-(1-(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)pentane-2-sulfonic acid (79)



Chemical Formula: $C_{17}H_{20}FN_7O_3S$
Exact Mass: 421.1332
Molecular Weight (g/mol): 421.4514

In a 2 mL conical reactivial®, a solution of sodium ascorbate (30.5 mg, 0.1 mmol) in water (150 µL) was added to a solution copper (II) acetate (8.5 mg, 46.5 µmol) in water (100 µL). The mixture was stirred under continuous flow of nitrogen for 1 min (until a persistent yellow color appeared) then added to the vial containing a solution of sulfonate **84** (9.3 mg, 28.5 µmol). After 1 min of stirring, a solution of tetrazine **65** (5.2 mg, 22.8 µmol) solubilized in acetone (0.7 mL) was added under nitrogen flow. The mixture was refluxed for 30 min to obtain the intermediary **85**. A solution of sodium nitrite (30.0 mg, 0.4 mmol) in water (0.1 mL) was added dropwise over 5 min. Formic acid (20 µL, 0.5 mmol) diluted in water (0.1 mL) was added dropwise over 5 min. The mixture was stirred at 0 °C for 5 min, then diluted in water (10 mL). This mixture was filtered through preconditioned Sep-Pak® tC18 Plus Long Environmental. The tC18 was washed with water (10 mL), then eluted with ethanol (1 mL) and dried. The product eluted with ethanol was concentrated under reduced pressure at 40 °C. The residue was purified by semi-preparative HPLC (Phenomenex Gemini® C18 5 µm (250 x 10 nm) with SecurityGuard™, phosphate buffer solution at pH 2.1 / EtOH 72/28, 4.0 mL / min, λ = 254 nm, collection at 28-29 min). The fraction collected was concentrated under reduced pressure (20 °C), solubilized in water, filtered through Sep-Pak® tC18 Plus Long Environmental preconditioned to remove salts. The tC18 was washed with water (10 mL), then eluted with ethanol (1 mL) and dried. The eluted product was concentrated under reduced pressure to give the product **79** as a red powder (11.0 mg, 92%). **R_f**: 0.33 (CH_3OH); 0.31 (CH_3CN/TFA 98/02); 0.84 (CH_3CN/TFA 70/30); **Mp**: T > 190 °C (decomposition); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.60 (d, J = 8.0 Hz, 2H, $H_{3,5}$), 7.69 (s, 1H, H_{20}), 7.43 (d, J = 8.0 Hz, 2H, $H_{2,7}$), 5.60 (s, 2H, H_9), 4.44 – 4.24 (m, 2H, H_{25}), 3.44 – 3.36 (m, 1H, H_{22}), 3.13 – 3.01 (s, 3H, H_{16}), 3.01 – 2.92 (m, 2H, H_{21}), 2.49 (s, 1H, H_{24}), 2.05 – 1.82 (m, 2H, H_{27}), 1.76 – 1.64 (m, 2H, H_{26}); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 167.7, 163.7, 139.1, 132.4, 128.8, 128.8, 123.1, 122.8, 74.1, 59.2, 53.9, 28.7, 25.2, 24.0, 21.4; **^{19}F NMR** (471 MHz, $CDCl_3$): -218.7; **LC-MS**: t_R = 6.8 min, calcd. for $C_{17}H_{19}{}^{19}FN_7O_3S$: 420.12 $[M-H]^-$, found: 420.02; **HRMS (ESI$^-$)**: calcd. for $C_{17}H_{19}{}^{19}FN_7O_3S$: 420.1254 $[M-H]^-$, found: 420.1256; **Analytical HPLC**: t_R = 14.3 (new column) to 11.3 min (1.5-year column) (PB/EtOH 66/34; λ_{max} = 264.9 nm); **Preparative HPLC**: t_R = 28-29 min (PB/EtOH 72/28; λ = 254.0 nm); t_R = 31-32 min (CH_3CN/NH_4OAc (50 mM in H_2O) 20/80; λ = 254.0 nm); t_R = 16-17 min (CH_3CN/TFA (0.5% in H_2O) 40/60; λ = 254.0 nm).

5. Radiochemistry of [^{18}F]fluorosulfotetrazine [^{18}F]79

All the reagents were dried under reduced pressure (0.0010 mbar) at 20 °C using Christ Alpha 2-4LD plus series 16408 with secondary vacuum mode for around 14 hours. Solvents used were only anhydrous solvents (acetonitrile, *N,N*-dimethylformamide, 1,4-dioxane, toluene, tetrahydrofuran, dichloromethane and diethyl ether) were purchased from Sigma-Aldrich.

Pre-conditioned ABX Sep-Pak® Light QMA cartridge (polyethylene cartridge filled with a silica-based hydrophilic strong anion-exchanger with large pore size, K-920, 41 x ⌀19 mm) with K_2CO_3 solution 0.05 M (10 mL) then water (20 mL) for injection were used as received without conditioned. Water Sep-Pak® tC18 Plus Long Environmental Cartridges (900 mg of hydrophilic silica-based bonded phase, 1.4 mL hold up volume, 37 – 55 µm, 125 Å, 310 m²/g surface area, 18% carbon load, 37 x ⌀12 mm) were used after pre-conditioned treatment with EtOH (10 mL), dry with air for 1 min at 20 °C, milli-Q water (20 mL) and dry with air for 5 min at 20 °C.

5.1. Production of fluor-18

[^{18}F]Fluoride was produced via the ^{18}O[p,n]^{18}F nuclear reaction by irradiation of a ^{18}O-enriched water (97%, Eurisotop) with an 18 MeV proton beam from an IBA Cyclone® 18/9 cyclotron. At the end of bombardment, [^{18}F]fluoride was transferred to the target sterile Curium TC-ELU® vial and the initial activity was measured. For small radioactivity, radiosynthesis were performed under fume hood equipped with 5 cm lead-shielded wall and lead-shielded glass screens. Starting radioactivity of [^{18}F]fluoride was less than 10 mCi (370 MBq). For higher radioactivity, radiosynthesis were performed in hot cell using an automatic apparatus TRACER lab FX N Pro, starting radioactivity was up to 1 Ci (37 GBq).

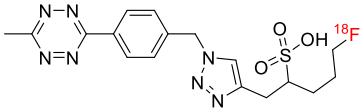
Figure 42 : Fume hood equipped with 5 cm lead-shielded (left) and hot cell (right).

Radioactivity measurement was carried out with a Medisystem MEDI-202 (for examples: conical Reactivial® and HPLC insert).

Note: 4-(fluoro)butane-1-sulfonic acid [372-01-0]; 4-(fluoro)butane-1-sulfonate [1202271-17-7]; potassium 4-(fluoro)butane-1-sulfonate [371-97-1]; sodium 4-(fluoro)butane-1-sulfonate [124536-08-9]; and tetrabutylammonium 4-(fluoro)butane-1-sulfonate [1202271-18-8] were used for reference.[645,646,647,648]

5.2. Radiofluoration of tetrazine sultone 78

5-([^{18}F]Fluoro)-1-(1-(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)pentane-2-sulfonic acid ([^{18}F]79)



Chemical Formula: $C_{17}H_{20}FN_7O_3S$
Molecular Weight (g/mol): 420.45

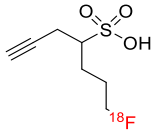
A solution of [^{18}F]fluoride (930 µCi ≈ 34.4 MBq) in water was trapped on a preconditioned ABX Sep-Pak® Light QMA then eluted with a mixture of potassium carbonate (0.5 mg, 3.6 µmol) solubilized in water (350 µL) and Kryptofix $K_{2,2,2}$ (10.5 mg, 27.9 µmol) solubilized in acetonitrile (450 µL). The eluted [^{18}F]F^- fluoride solution (805 µCi ≈ 29.8 MBq) was collected in a 2 mL conical Reactivial®. Water was removed azeotropically with acetonitrile (3 x 1 mL) under continuous nitrogen flow at 105 °C for 10 min. A solution of sublimated tetrazinesultone **78** (4.6 mg, 11.5 µmol) in anhydrous acetonitrile (1 mL) was added to the sealed reaction flask containing the dry residue of [^{18}F]KF/K_2CO_3/ $K_{2,2,2}$ (547 µCi ≈ 20.2 MBq). The mixture was refluxed for 30 min then cooled at 20 °C. The mixture (485 mCi ≈ 17.9 MBq) was oxidated for 5 min at 0 °C with nitrite sodium (31 mg, 46 µmol) and formic acid (10 µL, 46 µmol) solubilized in water (100 µL). Purification was performed by semi-preparative HPLC (Gemini®, PB / EtOH 72/28, at 3.3 mL / min, λ = 254 nm, collection from 28 to 29 min) to give the product **[^{18}F]79** (26 µCi ≈ 1.0 MBq, 5% Y, 7% DCY). **R_f**: 0.713 (CH_3CN/TFA 0.1% 98/02); **Analytical HPLC**: t_R = 14.3 min (PB/EtOH 66/34; λ_{max} = 264,9 nm).

[645] Berridge, M. S.; Franceschini, M. P.; Rosenfeld, E.; Tewson, T. J. *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (4), 1211–1217.
[646] Wasserscheid, P.; Paape, N.; Boesmann, A.; Schulz, P. WO2009152902A2, US8642778B2, December 23, **2009**.
[647] Helberger, J. H.; Manecke, G. DE895559, November 05, **1953**.
[648] Helberger, J. H.; Manecke, G.; Heyden, R. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1949**, *565* (1), 23–35.

5.3. Multi-step radiosynthesis of [^{18}F]fluorosulfotetrazine [^{18}F]79

5.3.1. Fluorination of propargyl sultone 15

7-([^{18}F]Fluoro)hept-1-yne-4-sulfonic acid ([^{18}F]84)

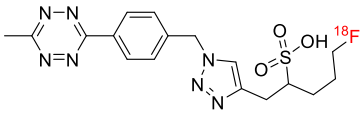


Chemical Formula: $C_7H_{11}FO_3S$
Molecular Weight (g/mol): 193.21

A solution of [^{18}F]fluoride (2.5 mCi ≈ 91.8 MBq) in water was trapped on a preconditioned ABX Sep-Pak® Light QMA then eluted with a mixture of potassium carbonate (0.9 mg, 6.6 µmol) in water (350 µL) and Kryptofix $K_{2,2,2}$ (16.6 mg, 44.0 µmol) in acetonitrile (400 µL). The eluted [^{18}F]F$^-$ fluoride solution (2.4 mCi ≈ 87.7 MBq) was collected in a 2 mL conical Reactivial®. Water was removed azeotropically with acetonitrile (3 x 1 mL) under continuous nitrogen flow at 105 °C for 10 min. A solution of sublimated propargylic sultone **15** (3.8 mg, 22.0 µmol) in anhydrous acetonitrile (1 mL) was added to the sealed reaction flask containing the dry residue of [^{18}F]KF/K_2CO_3/ $K_{2,2,2}$ (2.4 mCi ≈ 87.7 MBq). The mixture was refluxed for 30 min then cooled at 20 °C. The crude mixture (2.3 mCi ≈ 84.7 MBq) was purified by semi-preparative HPLC (Gemini®, PB / EtOH 72/28, at 4 mL / min) to give the product **[^{18}F]84** (2.3 mCi ≈ 84.7 MBq, 59% Y, 92% DCY). **R$_f$**: 0.233 (CH_3CN/TFA 0.1% 98/02); **Analytical HPLC**: t_R = 8.6 min (PB/EtOH 66/34; λ_{max} = 210.6 nm).

5.3.2. CuAAC with azidotétrazine 65

5-([^{18}F]Fluoro)-1-(1-(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)pentane-2-sulfonic acid ([^{18}F]79)



Chemical Formula: $C_{17}H_{20}FN_7O_3S$
Molecular Weight (g/mol): 420.45

A solution of [^{18}F]fluoride (2.5 mCi ≈ 91.8 MBq) in water was trapped on a preconditioned ABX Sep-Pak® Light QMA then eluted with a mixture of potassium carbonate (0.9 mg, 6.6 µmol) solubilized in water (350 µL) and Kryptofix $K_{2,2,2}$ (16.6 mg, 44.0 µmol) solubilized in acetonitrile (400 µL). The eluted [^{18}F]F^- fluoride solution (2.4 mCi ≈ 87.7 MBq) was collected in a 2 mL conical Reactivial®. Water was removed azeotropically with acetonitrile (3 x 1 mL) under continuous nitrogen flow at 105 °C for 10 min. A solution of sublimated propargylic sultone **15** (3.8 mg, 22.0 µmol) in anhydrous acetonitrile (1 mL) was added to the sealed reaction flask containing the dry residue of [^{18}F]KF/K_2CO_3/ $K_{2,2,2}$ (2.4 mCi ≈ 87.7 MBq). The mixture was refluxed for 30 min then cooled at 20 °C. The mixture (1.2 mCi ≈ 44.9 MBq) in acetonitrile was passed onto a Sep-Pak® Light QMA. The acetonitrile was removed under a continuous flow of nitrogen at 50 °C for 7 min with the addition of acetone (3 x 1 mL). The dry residue (1.2 mCi ≈ 44.9 MBq) was solubilized in 0.3 mL of acetone. Sodium ascorbate (30.0 mg, 0.1 mmol) in water (150 µL) was added to a solution of copper (II) acetate (8.1 mL, 32.5 µmol) in water (150 µL). The mixture was stirred under nitrogen for 1 min (until a persistent yellow color appeared), then added to the ^{18}F-fluorosulfonate previously prepared **[^{18}F]84**. After 1 min of stirring, the sublimated tetrazine **65** (5.0 mg, 22.0 µmol) in acetone (400 µL) was added under nitrogen. The mixture was stirred under nitrogen at 60 °C for 30 min then cooled to 20 °C to give the dihydrotetrazinesulfonate **[^{18}F]85** (1.2 mCi ≈ 44.8 MBq, 79% Y, 99% DCY). **Rf**: 0.4 (CH_3CN/TFA 0.1% 98/02); **Analytical HPLC**: t_R = 11.0 (new column) to 8.9 min (1.5-year column) (PB/EtOH 66/34; λ_{max} = 264.9 nm).

Sodium nitrite (30.5 mg, 0.4 mmol) in water (300 µL) was added in a 2 mL conical reactivial® containing dihydrotetrazinesulfonate **[^{18}F]85** (1.2 mCi ≈ 44.8 MBq) in acetone / water mixture (7/3). Formic acid (100 µL, 2.6 mmol) in water (1 mL) was carefully added dropwise over 5 min. The mixture was stirred at 20 °C for 5 min. After dilution in water (10 mL), the mixture was passed through preconditioned Sep-Pak® tC18 Plus Long Environmental washing with water (10 mL) allowed to remove ^{18}F impurities (62.1 µCi ≈ 2.3 MBq). The product **[^{18}F]79** was eluted with EtOH (1.0 mL). The eluted ethanol fraction (863.9 µCi ≈ 32.0 MBq) was diluted with milli-Q water (2 mL) and was injected into semi-preparative HPLC (Phenomenex Gemini® C18, PB / EtOH 72/28, at 3.3 mL / min, λ = 254 nm, collection from 28 to 29 min). Tetrazine **[^{18}F]79** (811.4 µCi ≈ 30.0 MBq) was formulated for iv injection by addition of sodium bicarbonate in physiological saline (Lavoisier $NaHCO_3$ (0.4 mL, 1.4%) and Baxter NaCl Viaflo (4.5 mL, 0.9%) in water for injection). After production, tetrazine **[^{18}F]79** was obtained in a formulated solution ready to be injected (corrected activity 800.6 µCi ≈ 29.6 MBq, uncorrected yield 18% Y, decay corrected yield for disintegration 63% DCY, volume

activity ≈ 25 µCi / mL ≈ 920 kBq / mL, total volume ≈ 9 mL, total synthesis time 3 h, EtOH ≈ 9.9%, pH ≈ 6.8). Formulated tetrazine **[^{18}F]79** demonstrated radiochemical purity of 92% and chemical purity of 85%. **R$_f$**: 0.713 (CH_3CN/TFA 0.1% 98/02); **Analytical HPLC**: t_R = 14.3 (new column) to 11.3 min (1.5-year column) (PB/EtOH 66/34; λ_{max} = 264,9 nm); Log P (*n*-octanol / milli-Q water + 4 µCi at 20 °C): -1.28 ± 0.02 (n = 3 x 3 x 2); Log D (*n*-octanol / PBS + 4 µCi at 20 °C): -1.73 ± 0.05 (n = 3 x 3 x 2).

5.3.3. Automated total radiosynthesis of [^{18}F]fluorosulfotetrazine [^{18}F]79

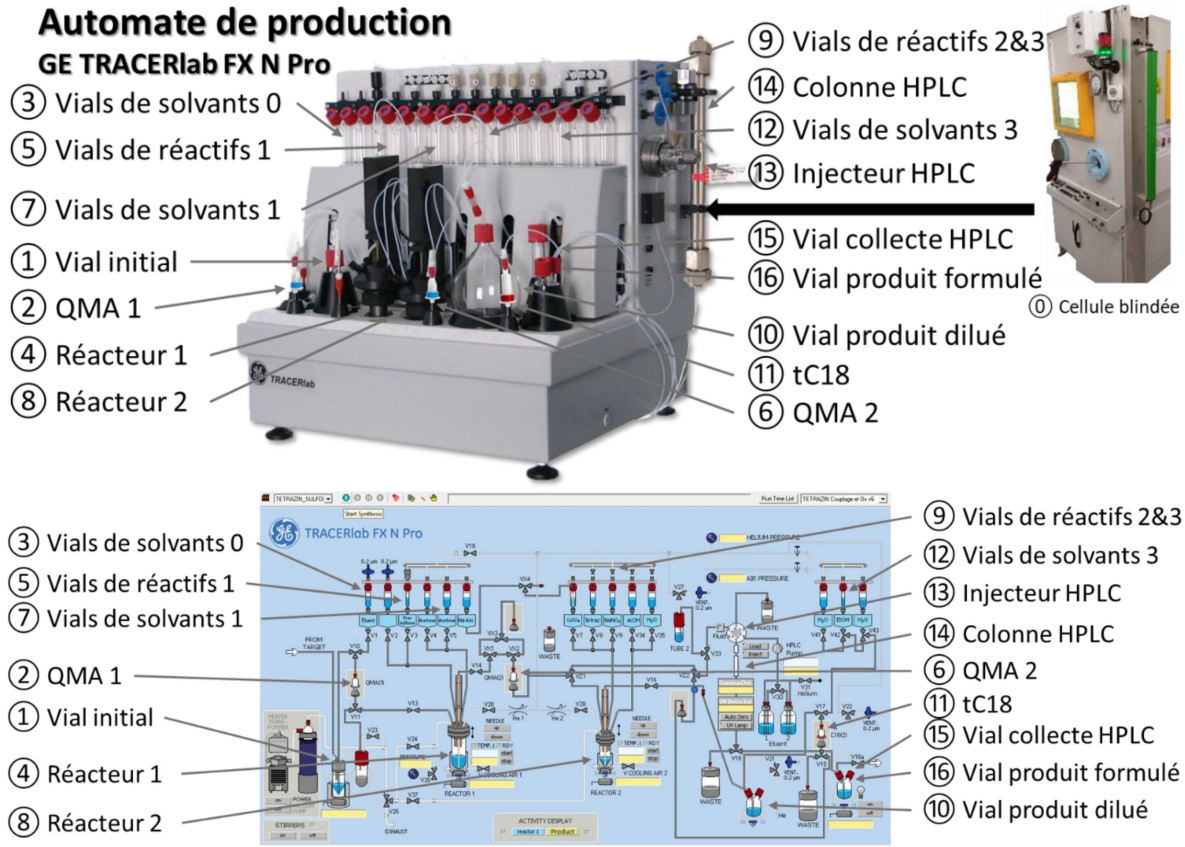


Figure 43: TRACER lab FX N Pro module.

The fully automated synthesis on TRACER lab FX N Pro module for the preparation of [^{18}F]fluorosulfotetrazine **[^{18}F]79** was depicted in table.

Vial n°	Contents	Quantities
1	K_{222} / CH_3CN K_2CO_3 / H_2O	10.5 mg / 1 mL 0.5 mg / 500 µL
2	CH_3CN	450 µL
3	Sultone precursor **15** / CH_3CN	5 mg / 1.6 mL
4	Acetone	1.6 mL
5	Acetone	1.6 mL
6	Sodium ascorbate / H_2O	30.0 mg / 150 µL
7	$Cu(OAc)_2$ / H_2O	8.4 mg / 150 µL
8	Azido tetrazine **65** / acetone	5.2 mg / 350 µL
9	$NaNO_2$ / H_2O	30.5 mg / 300 µL
10	Formic acid	100 µL
11	H_2O	10 mL
12	H_2O	10 mL
13	EtOH	1.5 mL
14	Phosphate buffer (pH = 2.1) in water	3.5 mL
15	$NaHCO_3$ (1.4% in water, Lavoisier) NaCl (0.9% in water, Baxter Viaflo)	0.8 mL 9.2 mL

Tableau 45 : List of consumables.

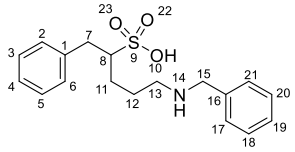
A cyclotron produced solution of [^{18}F]fluoride in ^{15}O-enriched water was trapped on a pre-conditioned Sep-Pak® Light QMA. [^{18}F]fluoride was eluted with a solution of potassium carbonate (0.5 mg) and Kryptofix K_{222} (10.5 mg) in water/acetonitrile (500 µL/1 mL, vial 1). The resulting [^{18}F]KF/K_2CO_3/K_{222} solution was recovered into the reactor 1, and was concentrated under reduced pressure (0.04 kPa) at 95 °C for 9 min. The reactor 1 was cooled down to 70 °C and the solution of sublimated propargylic sultone **15** (5.0 mg) in CH_3CN (1.6 mL, vial 3) was added. After heating at 110 °C for 15 min then cooling to 50 °C, the mixture was concentrated under reduced pressure (0.04 kPa) at 50 °C for 4 min. Acetone (1.6 mL, vial 4) was added into reactor 1 and the resulting mixture was passed onto Sep-Pak® Light QMA. The eluate was recovered into reactor 2 and was concentrated under reduced pressure (0.04 kPa) at 50 °C for 4 min. A second addition of acetone (1.6 mL, vial 5) into reactor 1 was realized, and the resulting mixture was passed onto Sep-Pak® Light QMA. The mixture was concentrated at 40 °C under reduced pressure (0.04 kPa) for 30 s in order to recover about 350 µL of solution in reactor 2. An aqueous sodium ascorbate solution (30.0 mg in 150 µL H_2O, vial 6) was added on an aqueous copper acetate solution (8.4 mg in 150 µL H_2O, vial 7). The mixture in vial 7 was stirred under helium flow for 43 s (until a persistent yellow color appears), then added to reactor 2. After stirring for 20 s, sublimated tetrazine **65** (5.2 mg) in acetone (350 µL, vial 8) was added to reactor 2. Reactor 2 was heated at 60 °C for 25 min then cooled to 30 °C. A solution of sodium nitrite (30.5 mg) in H_2O (300 µL, vial 9) was added to reactor 2, then immediately after, formic acid (100 µL, vial 10) was introduced. The mixture was stirred at 20 °C under helium for 5 min, then transferred into the vial for dilution. Dilution was performed by addition of water (2 x 5 mL, vial 11). The resulting mixture was transferred onto a pre-conditioned Sep-Pak® tC18 Plus Long Environmental. After washing with water (10 mL, vial 12), Sep-Pak® tC18 was eluted with EtOH (1.5 mL, vial 13). The ethanolic solution was recovered into HPLC vial. Phosphate buffer (3.5 mL, pH = 2.1, vial 14) was added into HPLC vial, and the final mixture was injected into semi-preparative reverse phase HPLC (Phenomenex Gemini® C18 column, 5 µm, 250 x 10 mm, phosphate buffer (pH 2.1) / EtOH 72/28 as eluent, 3.3 mL/min flow rate, λ = 254 nm). The [^{18}F]fluorosulfotetrazine **[^{18}F]79** was collected from 28 to 29 min after injection, then formulated by addition of sodium bicarbonate in physiological serum (Lavoisier $NaHCO_3$ (0.8 mL, 1.4%) and Baxter NaCl Viaflo (9.2 mL, 0.9%), vial 15). The [^{18}F]fluorosulfotetrazine **[^{18}F]79** (67 mCi ≈ 2,4 GBq) was obtained in formulated solution ready for injection in 29% decay-corrected yield, with a molar activity of about 158.7 MBq/µmol (4.3 mCi/µmol), within 90-95 min total time synthesis starting from about 16 GBq (430 mCi) of cyclotron produced [^{18}F]fluoride.

The quality control was carried out by analytical HPLC of formulated [^{18}F]fluorosulfotetrazine **[^{18}F]79** aliquot (Phenomenex Gemini® C18 column, 5 µm, 250 x 4.6 mm, phosphate buffer (pH 2.1) / EtOH 66/34 as eluent, 0.6 mL/min flow rate, λ = 254 nm, t_R = 13.2 min), and displayed a > 97% radiochemical purity and > 91% chemical purity.

6. Valorization of sultone tetrazines for other imaging modalities

6.1. Ring opening of the model benzylsultone 5 by amines

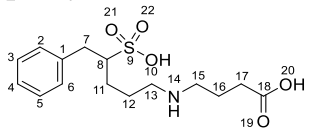
5-(Benzylamino)-1-phenylpentane-2-sulfonic acid (88)



Chemical Formula: $C_{18}H_{23}NO_3S$
Exact Mass: 333.1399
Molecular Weight (g/mol): 333.4460

In a 4 mL conical reactivial® under nitrogen, benzylsultone **5** (2.1 gm, 9.1 µmol) and benzylamine (4.4 mg, 41.2 µmol) were stirred in acetonitrile (0.5 mL) at 60 °C for 30 min. Concentration under reduced pressure at 40 °C afforded the product **88** as a white powder (2.5 mg, 82%). **R**$_f$: 0.01 (*n*-pentane/Et_2O 50/50); **Mp**: T > 190 °C (decomposition); **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_3CN): δ 7.58 – 7.37 (m, 8H, $H_{2, 3, 5, 6, 17, 18, 20, 21}$), 7.31 – 7.11 (m, 4H, $H_{4, 19}$), 4.03 (s, 3H, $H_{14, 15}$), 3.76 – 3.60 (m, 1H, $H_{13'}$), 3.45 – 3.31 (m, 1H, $H_{7'}$), 3.12 – 2.96 (m, 1H, $H_{11'}$), 2.71 – 2.58 (m, 2H, H_{12}), 2.58 – 2.45 (m, 1H, $H_{11''}$), 2.11 – 2.05 (m, 1H, $H_{13''}$), 2.05 – 1.93 (m, 1H, H_8), 1.91 – 1.75 (m, 1H, $H_{7''}$); **^{13}C NMR** (126 MHz, CD_3CN): δ 138.1, 137.6, 136.4, 130.4, 129.9, 129.8, 129.8, 129.8, 129.0, 129.0, 60.4, 51.9, 45.8, 44.7, 36.6, 28.2, 28.0; **LC-MS**: calcd. for $C_{18}H_{22}NO_3S$: 332.13 $[M-H]^-$, found: 332.13; **HRMS (ESI$^-$)**: calcd. for $C_{18}H_{22}NO_3S$: 332.1320 $[M-H]^-$, found: 332.1318.

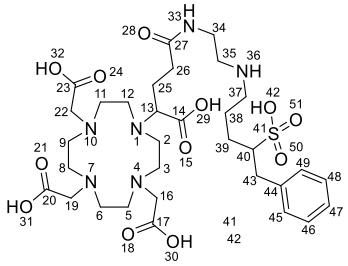
4-((5-Phenyl-4-sulfopentyl)amino)butanoic acid (89)



Chemical Formula: $C_{15}H_{23}NO_5S$
Exact Mass: 329.1297
Molecular Weight (g/mol): 329.4110

In a 4 mL conical reactivial® under nitrogen, benzylsultone **5** (51.3 mg, 0.2 mmol), γ-aminobutyric acid (23.2 mg, 0.2 mmol) and sodium hydride (11.8 mg, 0.5 mmol) were stirred in anhydrous THF (4 mL) at 85 °C for 17 h. Concentration under reduced pressure at 40 °C afforded the product **89** as a white powder (60.7 mg, 81%). **R**$_f$: 0.07 (*n*-pentane/Et_2O 50/50); **Mp**: T > 190 °C (decomposition); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.27 – 7.21 (m, 2H, $H_{3, 5}$), 7.20 – 7.14 (m, 3H, $H_{2, 4, 6}$), 4.43 – 4.31 (m, 4H, $H_{7, 17}$), 3.37 – 3.29 (m, 1H, H_8), 3.25 (dd, J = 13.7, 4.8 Hz, 1H, $H_{11'}$), 2.69 (dd, J = 13.8, 9.8 Hz, 1H, $H_{11''}$), 1.92 – 1.82 (m, 2H, H_{13}), 1.79 – 1.72 (m, 2H, H_{12}), 1.73 – 1.66 (m, 4H, $H_{15, 16}$); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ 135.9, 129.4, 129.0, 127.3, 73.9, 60.7, 34.1, 27.5, 24.1; **LC-MS**: calcd. for $C_{15}H_{22}NO_5S$: 328.12 $[M-H]^-$, found: 328.12; **HRMS (ESI$^-$)**: calcd. for $C_{15}H_{22}NO_5S$: 328.1219 $[M-H]^-$, found: 328.1218.

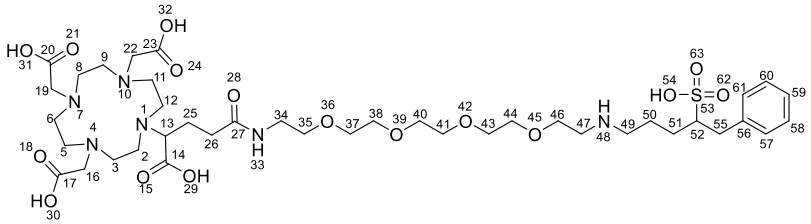
2,2',2''-(10-(1-Carboxy-4-oxo-4-((2-((5-phenyl-4-sulfopentyl)amino)ethyl)amino)butyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid (90)



Chemical Formula: $C_{32}H_{52}N_6O_{12}S$
Exact Mass: 744.3364
Molecular Weight (g/mol): 744.8580

In a 4 mL conical reactivial® under nitrogen, benzylsultone **5** (10.1 mg, 44.6 µmol) and DOTA-GA-amine **81** (23.1 mg, 44.6 µmol) were stirred in acetonitrile (0.5 mL) at 20 °C. s-Collidine (12 µL, 89.3 µmol) was added. The mixture was stirred at 60 °C for 30 min then concentrated under reduced pressure at 40 °C to give the product **90** as white powder (13.3 mg, 40%). **LC-MS**: calcd. for $C_{32}H_{51}N_6O_{12}S$: 743.33 $[M-H]^-$, found: 743.33; **HRMS (ESI$^-$)**: calcd. for $C_{32}H_{51}N_6O_{12}S$: 743.3286 $[M-H]^-$, found: 743.3285.

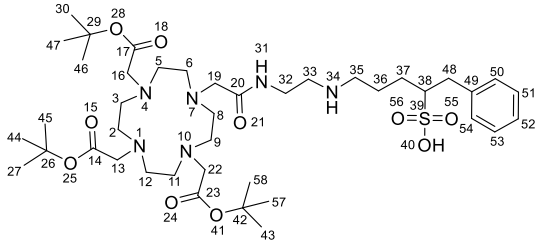
2,2',2''-(10-(1-Carboxy-4-oxo-25-phenyl-24-sulfo-8,11,14,17-tetraoxa-5,20-diazapentacosyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid (91)



Chemical Formula: $C_{40}H_{68}N_6O_{16}S$
Exact Mass: 920.4413
Molecular Weight (g/mol): 921.0700

In a 4 mL conical reactivial® under nitrogen, benzylsultone **5** (9.9 mg, 43.7 µmol) and DOTA-GA-PEG$_4$-amine **86** (30.4 mg, 43.7 µmol) were stirred in acetonitrile (0.5 mL) at 20 °C. s-Collidine (11 µL, 87.5 µmol) was added. The mixture was stirred at 60 °C for 30 min then concentrated under reduced pressure at 40 °C to give the product **91** as white powder (14.9 mg, 37%). **LC-MS**: calcd. for $C_{40}H_{67}N_6O_{16}S$: 919.43 $[M-H]^-$, found: 919.43; **HRMS (ESI$^-$)**: calcd. for $C_{40}H_{67}N_6O_{16}S$: 919.4334 $[M-H]^-$, found: 919.4334.

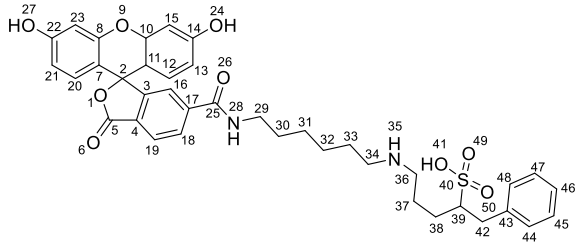
1-Phenyl-5-((2-(2-(4,7,10-tris(2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)acetamido)ethyl)amino)pentane-2-sulfonic acid (92)



Chemical Formula: $C_{41}H_{72}N_6O_{10}S$
Exact Mass: 840.5031
Molecular Weight (g/mol): 841.1190

In a 4 mL conical reactivial® under nitrogen, benzylsultone **5** (10.3 mg, 45.5 µmol) and DO3AtBu-*N*-(2-aminoethyl)ethanamide **87** (28.0 mg, 45.5 µmol) were stirred in acetonitrile (0.5 mL) at 20 °C. s-Collidine (12 µL, 91.0 µmol) was added. The mixture was stirred at 60 °C for 30 min then concentrated under reduced pressure at 40 °C to give the product **92** as white powder (15.3 mg, 40%). **LC-MS**: calcd. for $C_{41}H_{71}N_6O_{10}S$: 840.49 $[M-H]^-$, found: 840.49; **HRMS (ESI$^-$)**: calcd. for $C_{41}H_{71}N_6O_{10}S$: 840.4952 $[M-H]^-$, found: 840.4927.

5-((6-(3',6'-Dihydroxy-3-oxo-4a',9a'-dihydro-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthene]-6-carboxamido)hexyl)amino)-1-phenylpentane-2-sulfonic acid (93)

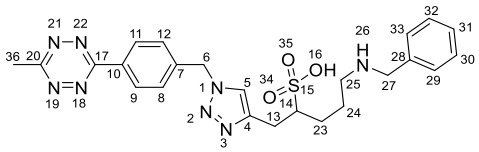


Chemical Formula: $C_{38}H_{42}N_2O_9S$
Exact Mass: 702.2611
Molecular Weight (g/mol): 702.8190

In a 4 mL conical reactivial® under nitrogen, benzylsultone **5** (10.0 mg, 44.2 µmol) and 6-FAM-amine **83** (22.6 mg, 44.2 µmol) were stirred in acetonitrile (0.5 mL) at 20 °C. s-Collidine (11 µL, 88.4 µmol) was added dropwise over 5 min at 0 °C. The mixture was stirred at 60 °C for 30 min then concentrated under reduced pressure at 40 °C to give the product **93** as yellow powder (12.4 mg, 40%). **LC-MS**: calcd. for $C_{38}H_{41}N_2O_9S$: 701.25 $[M-H]^-$, found: 701.25; **HRMS (ESI$^-$)**: calcd. for $C_{38}H_{41}N_2O_9S$: 701.2533 $[M-H]^-$, found: 701.2532.

6.2. Ring opening of tetrazine sultone 78 by amines

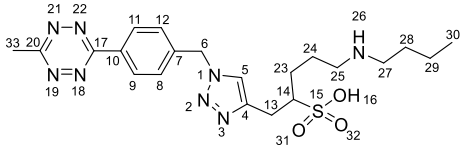
5-(Benzylamino)-1-(1-(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)pentane-2-sulfonic acid (94)



Chemical Formula: $C_{24}H_{28}N_8O_3S$
Exact Mass: 508.2005
Molecular Weight (g/mol): 508.6010

In a 4 mL conical reactivial® under nitrogen, tetrazinesultone **78** (1.0 mg, 2.5 µmol) and benzylamine (0.3 mg, 2.5 µmol) were stirred in acetonitrile (0.5 mL) at 20 °C. Potassium carbonate (0.7 mg, 5.1 µmol) was added. The mixture was stirred at 60 °C for 30 min then concentrated under reduced pressure at 40 °C to give the product **94** as red powder (<0.1 mg, 4%).

5-(Butylamino)-1-(1-(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)pentane-2-sulfonic acid (95)

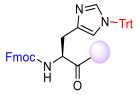
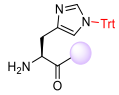
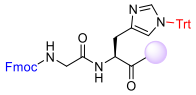
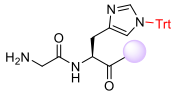
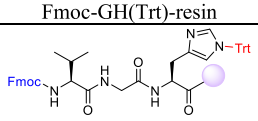
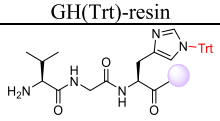
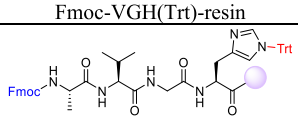
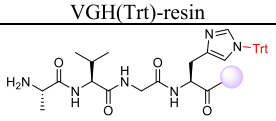
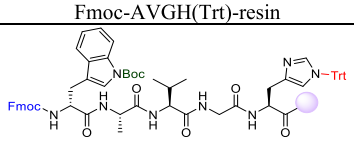
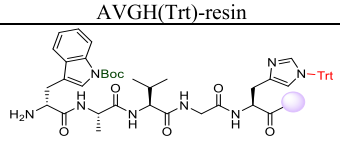
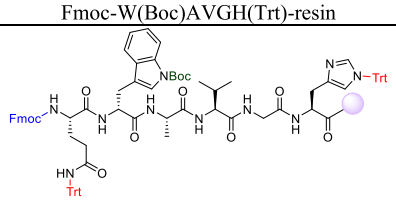
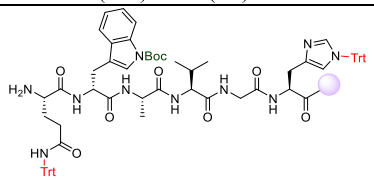
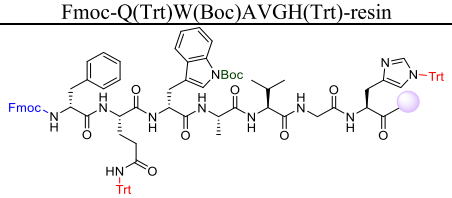
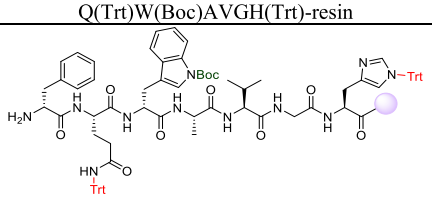
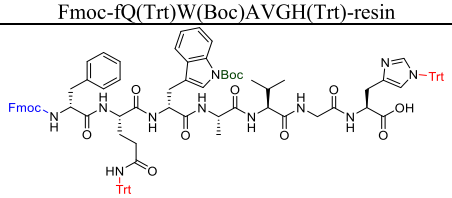
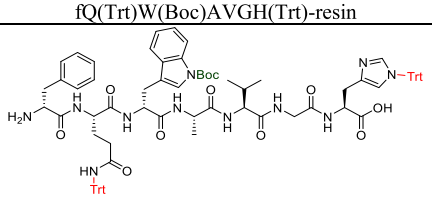
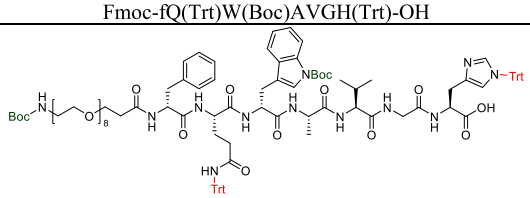
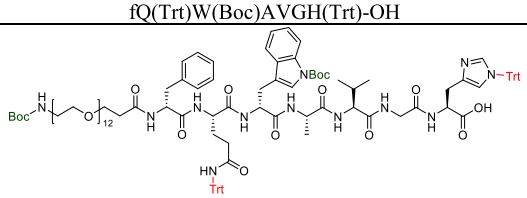


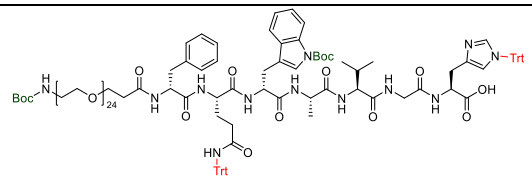
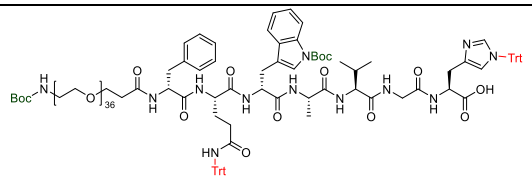
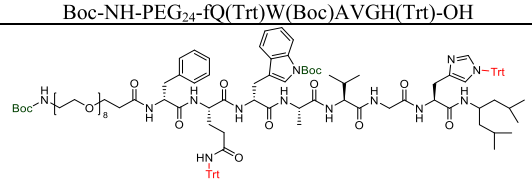
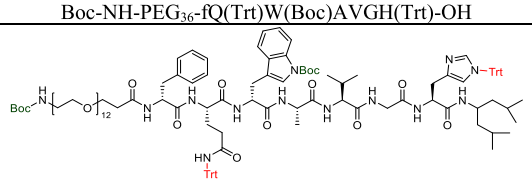
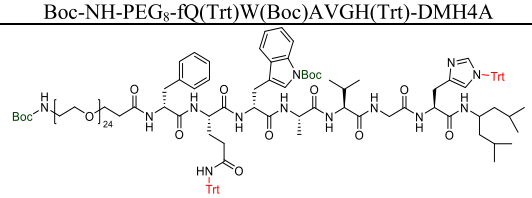
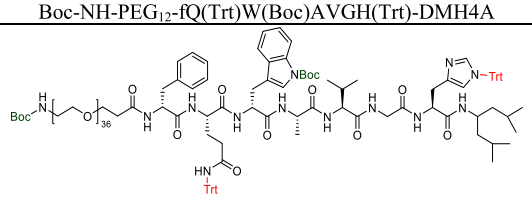
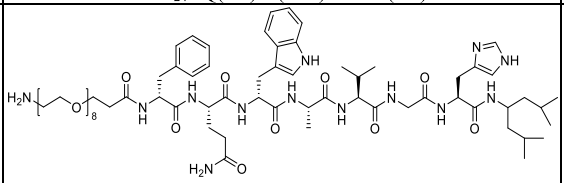
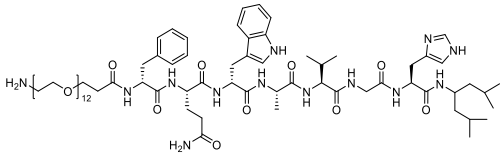
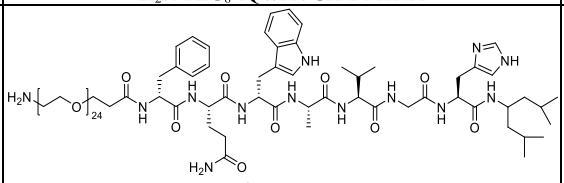
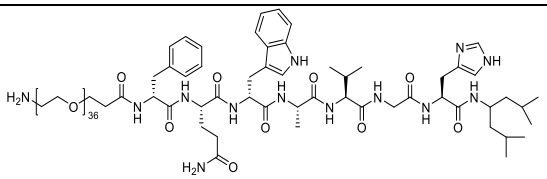
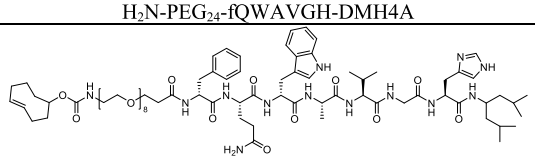
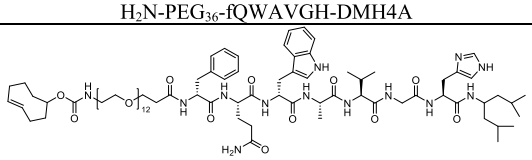
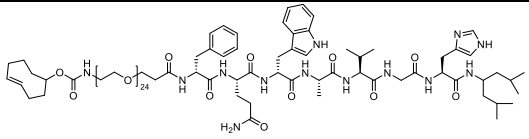
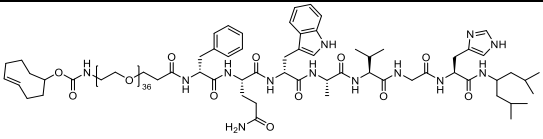
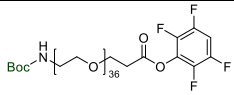
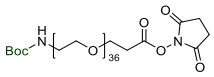
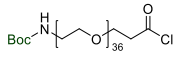
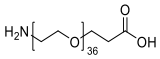
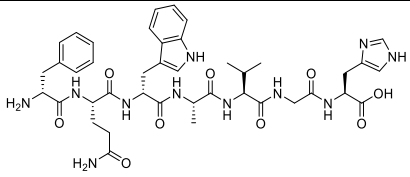
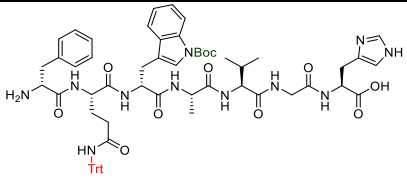
Chemical Formula: $C_{21}H_{30}N_8O_3S$
Exact Mass: 474.2162
Molecular Weight (g/mol): 474.5840

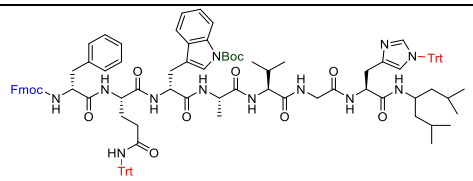
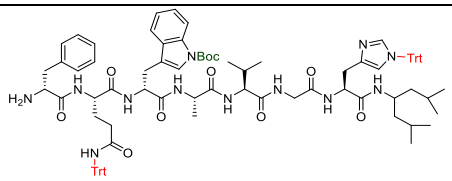
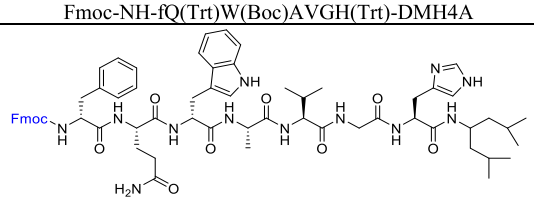
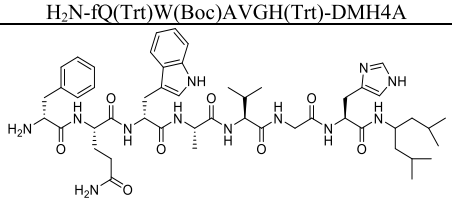
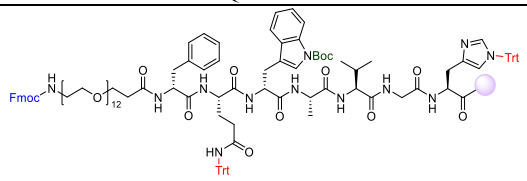
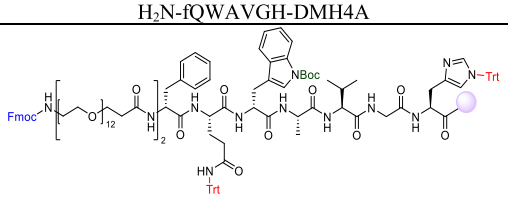
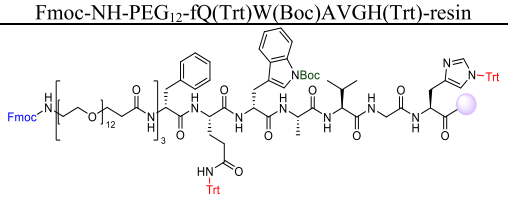
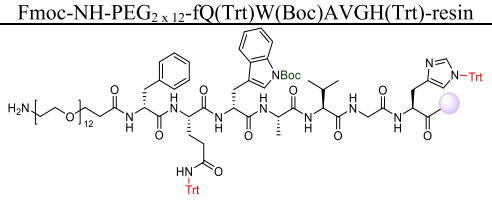
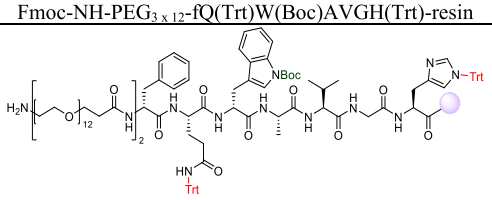
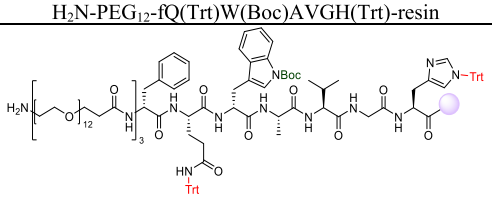
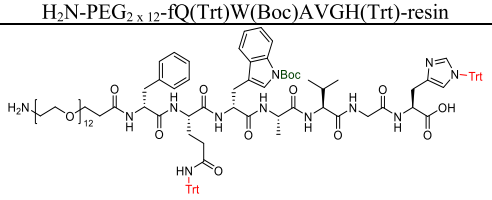
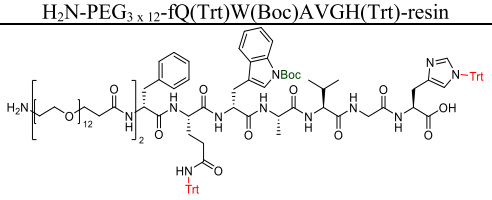
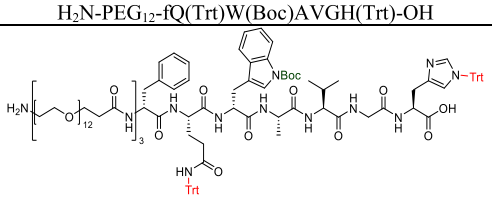
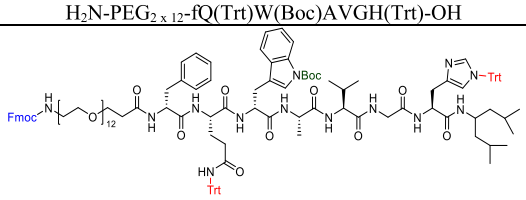
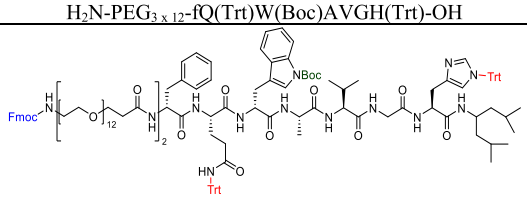
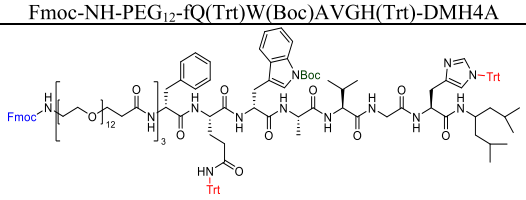
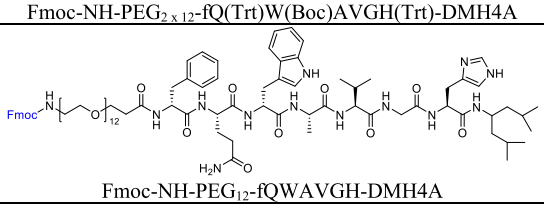
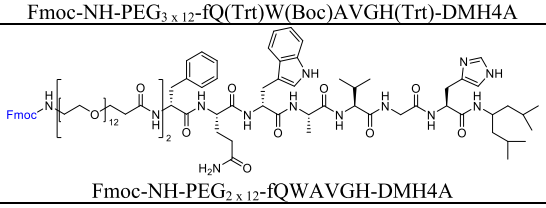
In a 4 mL conical reactivial® under nitrogen, tetrazinesultone **78** (23.7 mg, 59.0 µmol) and *n*-butylamine (50 µL, 500 µmol) were stirred in acetonitrile (500 µL) at 20 °C. s-Collidine (10 µL, 75.7 µmol) was added. The mixture was refluxed for 7 h then concentrated under reduced pressure at 40 °C to give the product **95** as red powder (3.0 mg, 12%). **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_3CN): δ 8.55 – 8.46 (m, 2H, $H_{9, 11}$), 7.76 (s, 1H, H_5), 7.52 – 7.44 (m, 2H, $H_{8, 12}$), 5.66 (s, 2H, H_6), 4.54 – 4.42 (m, 2H, H_{25}), 3.58 – 3.44 (m, 1H, H_{14}), 3.41 – 3.27 (m, 1H, $H_{13''}$), 3.01 (s, 3H, H_{33}), 3.00 – 2.91 (m, 1H, $H_{13'}$), 2.20 – 2.03 (m, 2H, H_{23}), 1.92 – 1.76 (m, 4H, H_{24}), 1.58 – 1.40 (m, 1H, $H_{27''}$), 1.38 (d, J = 2.5 Hz, 2H, H_{28}), 0.86 – 0.85 (m, 6H, $H_{16, 27', 29, 30}$); **^{13}C NMR** (126 MHz, CD_3CN): δ 167.9, 165.6, 146.1, 136.9, 130.0, 129.8, 129.7, 125.3, 58.9, 53.4, 49.8, 49.5, 32.6, 28.4, 26.5, 26.5, 21.8, 20.7, 14.1; **LC-MS**: calcd. for $C_{21}H_{29}N_8O_3S$: 473.21 $[M-H]^-$, found: 473.21; **HRMS (ESI$^-$)**: calcd. for $C_{21}H_{29}N_8O_3S$: 473.2083 $[M-H]^-$, found: 473.2083.

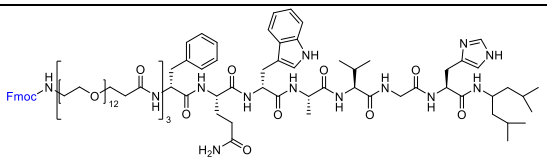
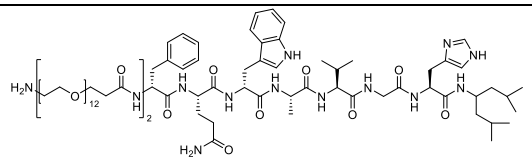
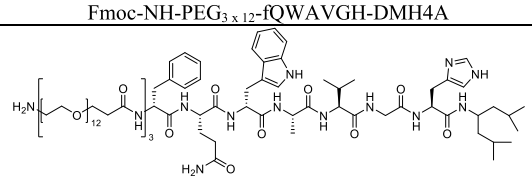
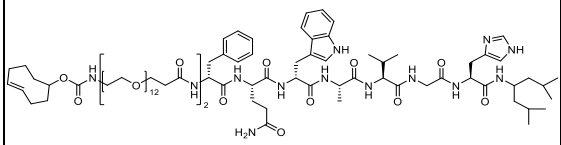
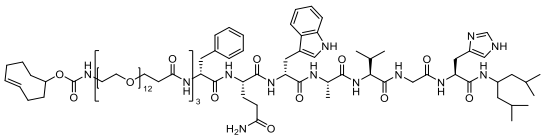
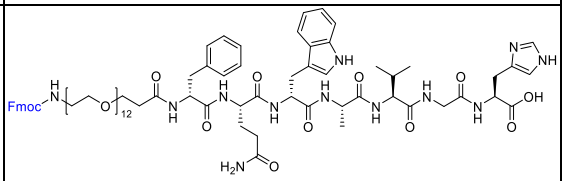
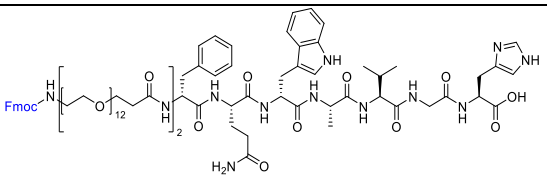
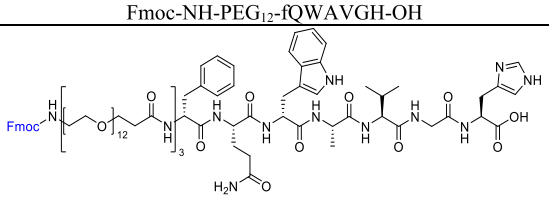
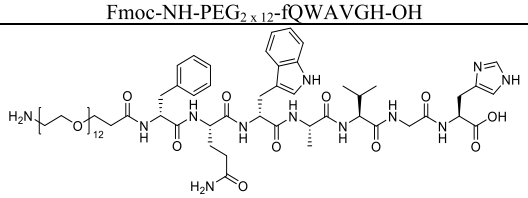
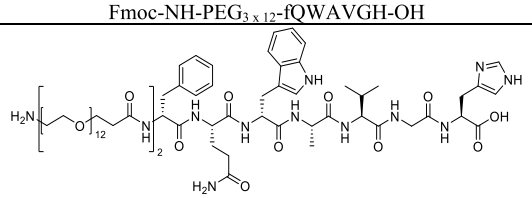
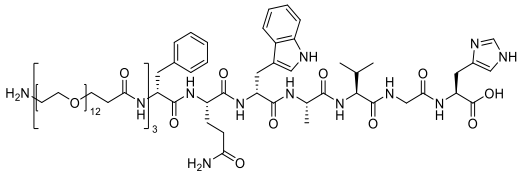
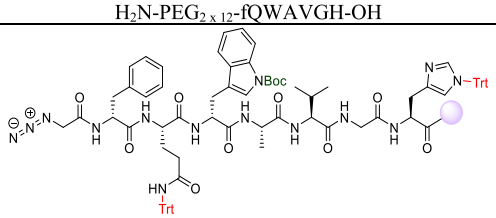
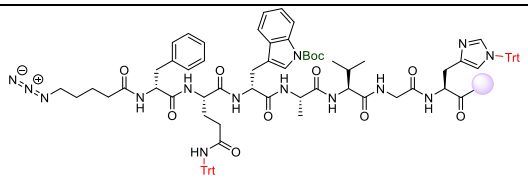
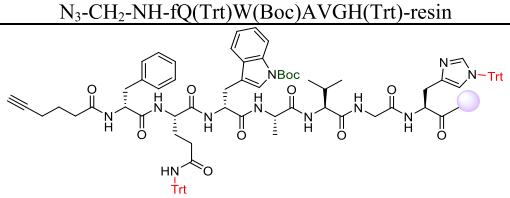
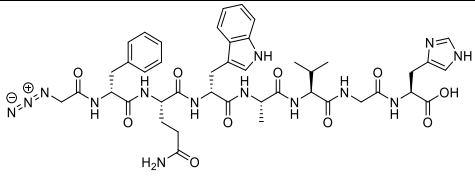
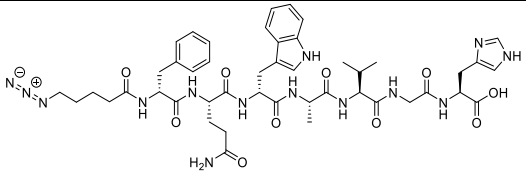
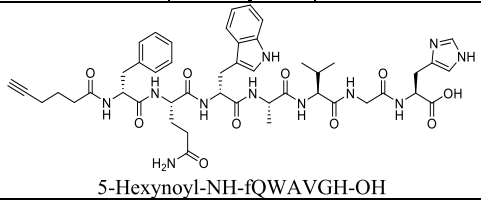
Partie expérimentale du chapitre 4

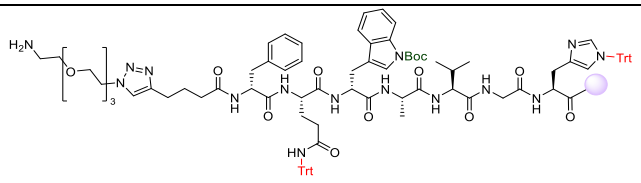
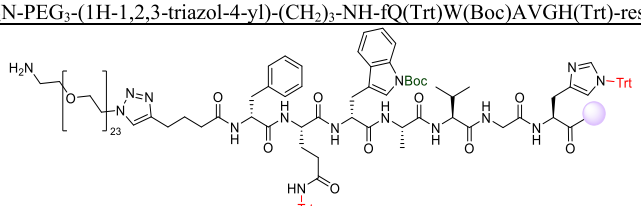
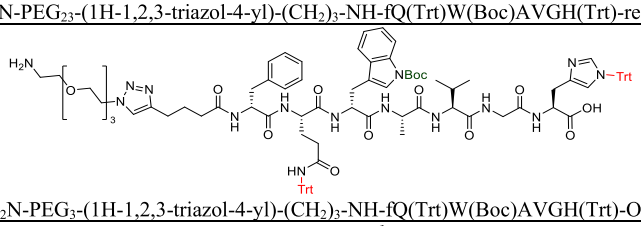
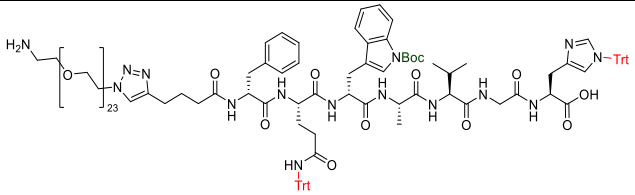
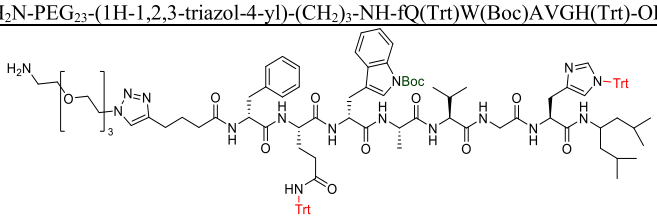
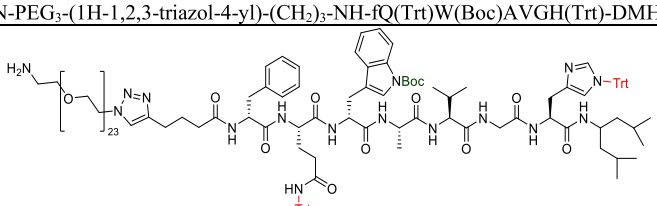
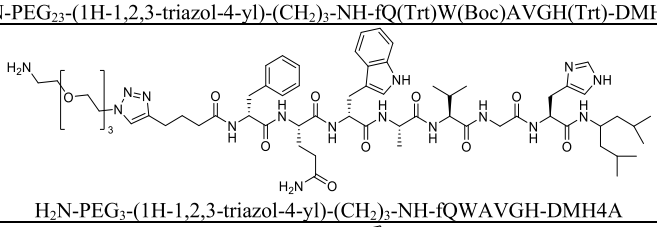
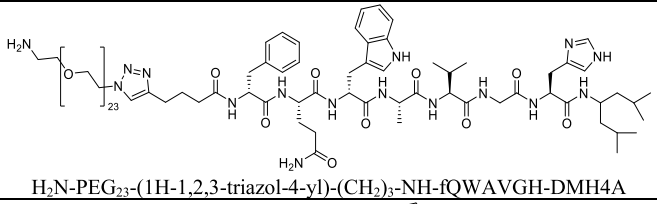
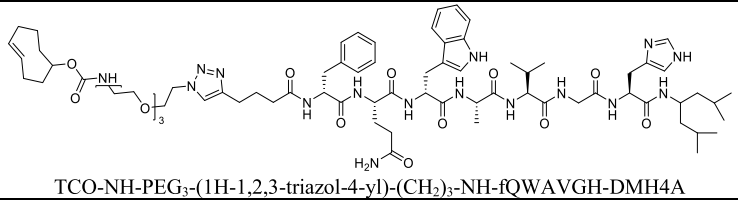
A. Synthesized compound list

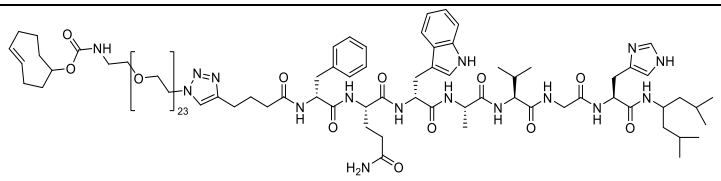
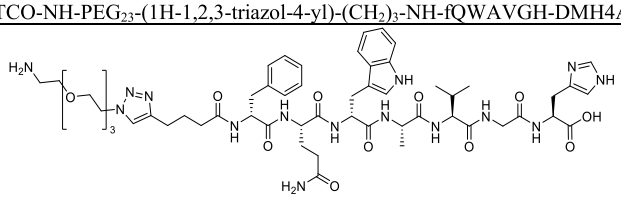
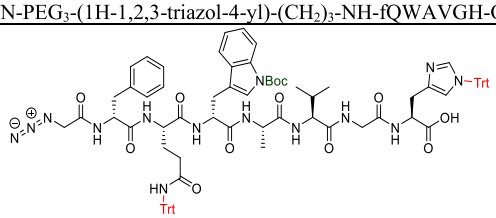
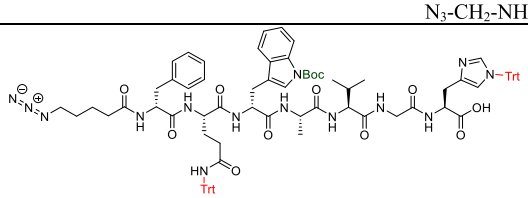
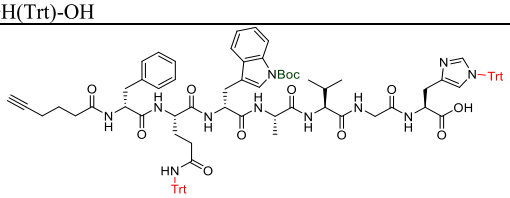
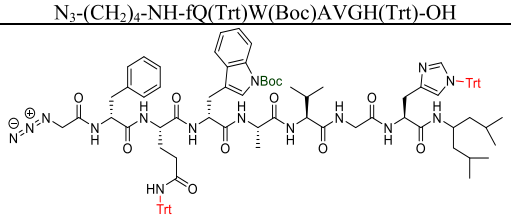
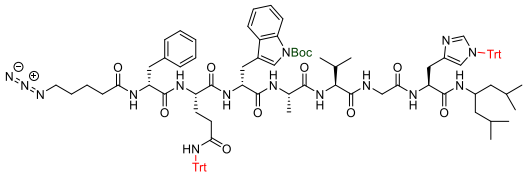
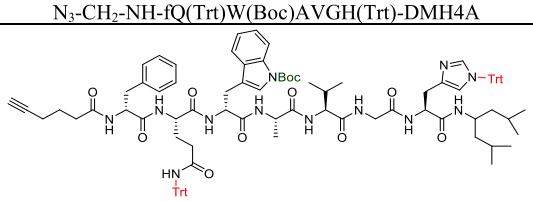
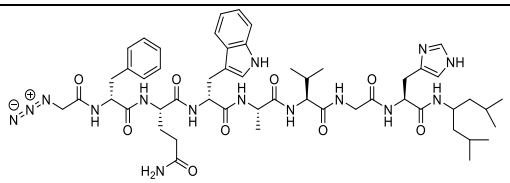
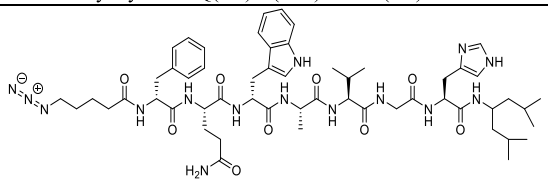
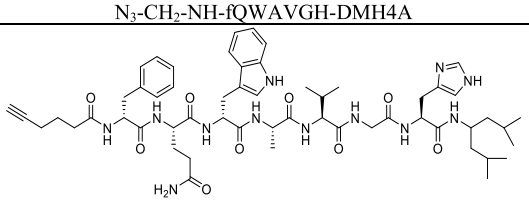
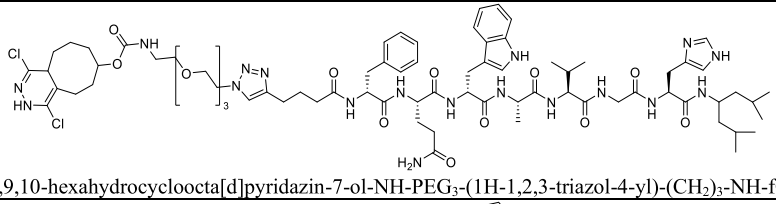
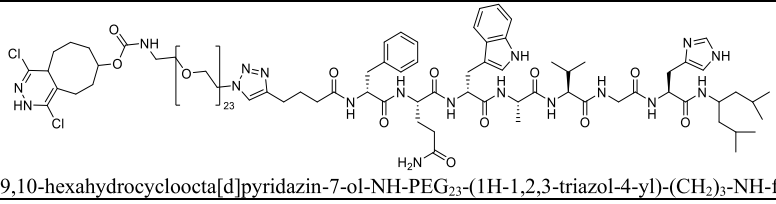
N°	Synthesized compound	Page	N°	Synthesized compound	Page
96	 Fmoc-H(Trt)-resin	323	**97**	 H(Trt)-resin	323
98	 Fmoc-GH(Trt)-resin	323	**99**	 GH(Trt)-resin	323
100	 Fmoc-VGH(Trt)-resin	324	**101**	 VGH(Trt)-resin	324
102	 Fmoc-AVGH(Trt)-resin	324	**103**	 AVGH(Trt)-resin	324
104	 Fmoc-W(Boc)AVGH(Trt)-resin	324	**105**	 W(Boc)AVGH(Trt)-resin	325
106	 Fmoc-Q(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin	325	**107**	 Q(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin	325
108	 Fmoc-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin	325	**109**	 fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin	326
110	 Fmoc-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH	324	**111**	 fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH	326
112	 Boc-NH-PEG$_8$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH	326	**113**	 Boc-NH-PEG$_{12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH	327

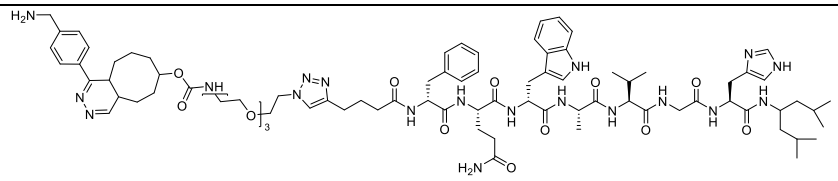
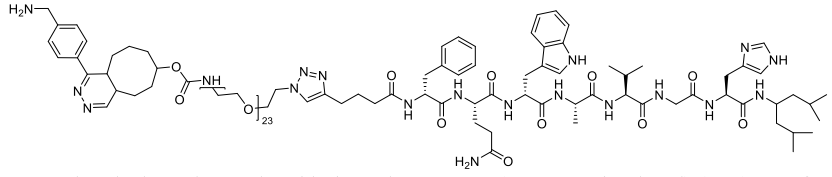
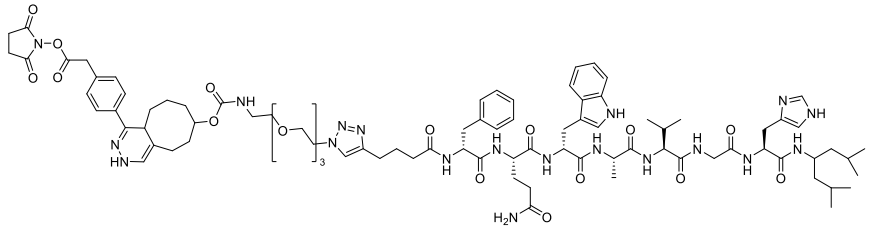
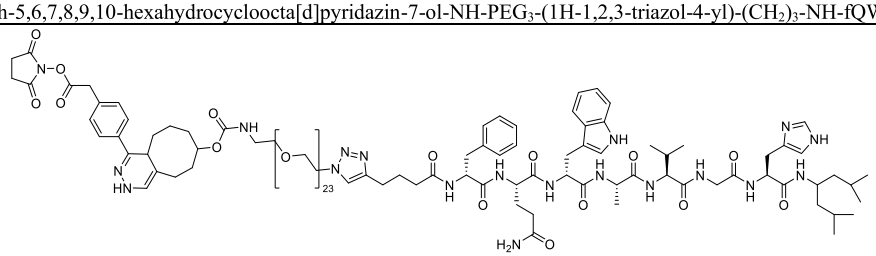
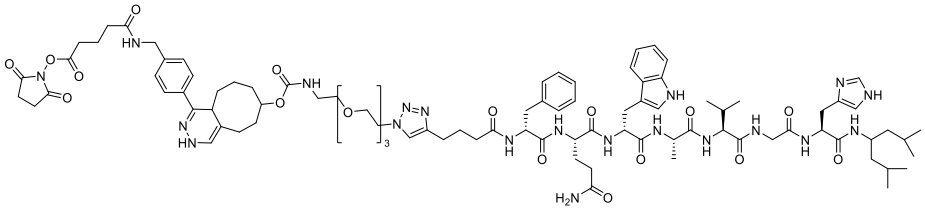
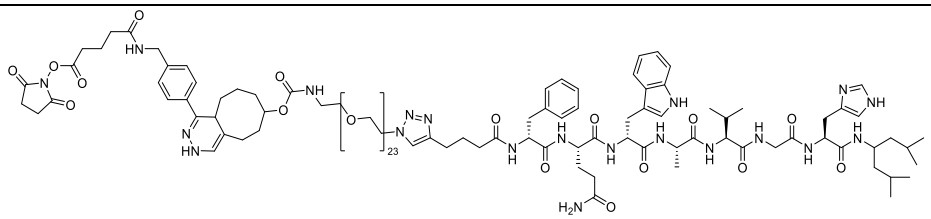
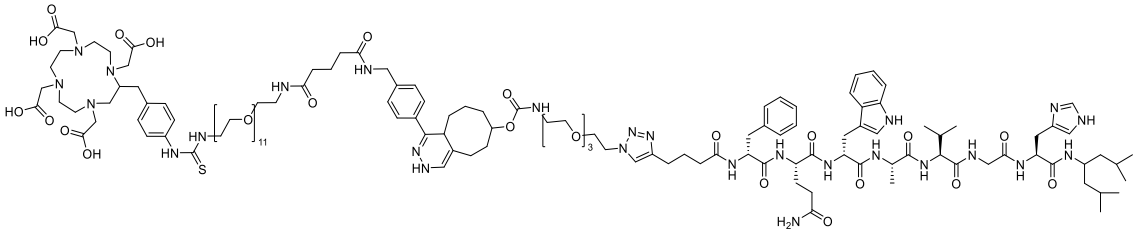
114	 Boc-NH-PEG$_{24}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH	327	**115**	 Boc-NH-PEG$_{36}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH	327
116	 Boc-NH-PEG$_{8}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A	328	**117**	 Boc-NH-PEG$_{12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A	328
118	 Boc-NH-PEG$_{24}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A	328	**119**	 Boc-NH-PEG$_{36}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A	328
120	 H_2N-PEG$_{8}$-fQWAVGH-DMH4A	329	**121**	 H_2N-PEG$_{12}$-fQWAVGH-DMH4A	329
122	 H_2N-PEG$_{24}$-fQWAVGH-DMH4A	329	**123**	 H_2N-PEG$_{36}$-fQWAVGH-DMH4A	329
124	 TCO-NH-PEG$_{8}$-fQWAVGH-DMH4A	330	**125**	 TCO-NH-PEG$_{12}$-fQWAVGH-DMH4A	330
126	 TCO-NH-PEG$_{24}$-fQWAVGH-DMH4A	330	**127**	 TCO-NH-PEG$_{36}$-fQWAVGH-DMH4A	330
128	 Boc-NH-PEG$_{36}$-CO-TFP	331	**129**	 Boc-NH-PEG$_{36}$-CO-NHS	331
131	 H_2N-PEG$_{36}$-CO-Cl	331	**132**	 H_2N-PEG$_{36}$-CO_2H	332
133	 fQWAVGH-OH	332	**134**	 fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH	332

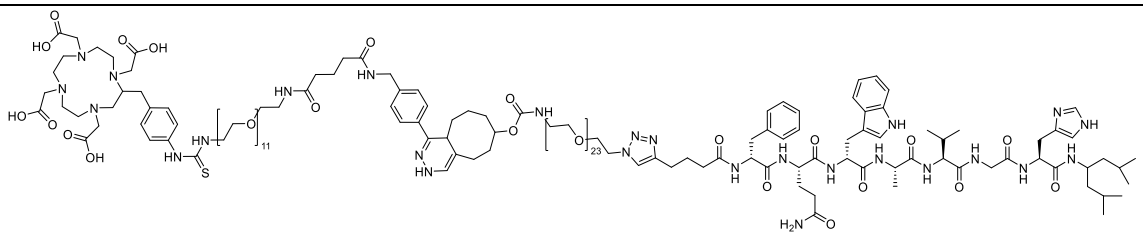
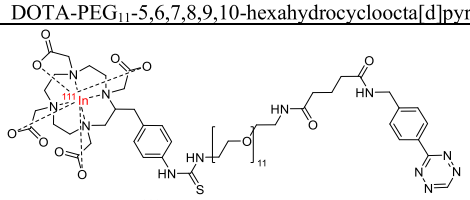
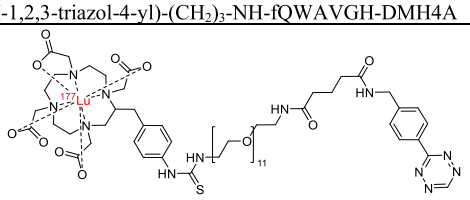
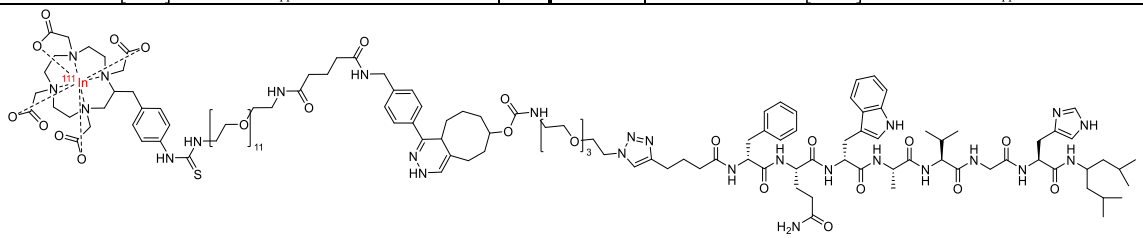
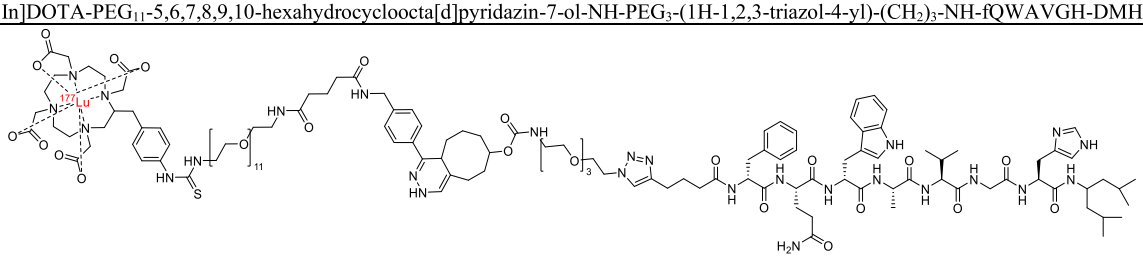
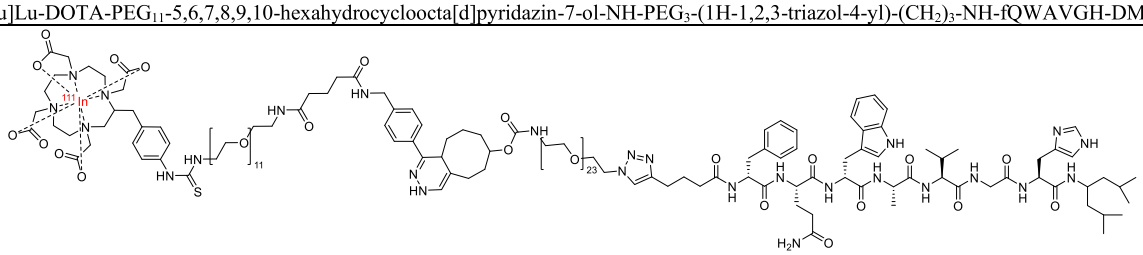
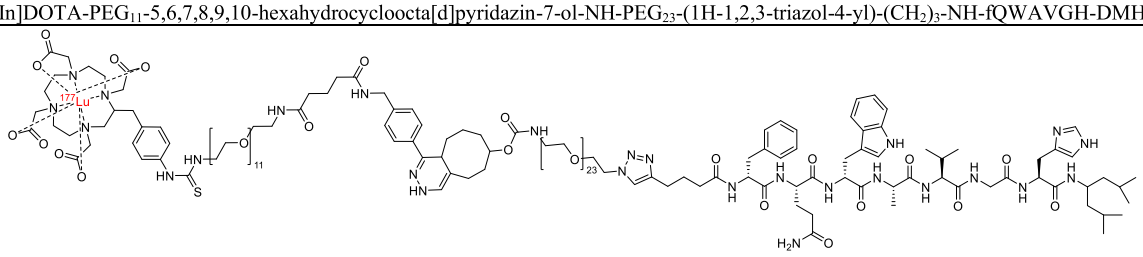
135	 Fmoc-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A	332	**136**	 H_2N-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A	333
137	 Fmoc-NH-fQWAVGH-DMH4A	333	**138**	 H_2N-fQWAVGH-DMH4A	333
139	 Fmoc-NH-PEG_{12}-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin	333	**140**	 Fmoc-NH-$PEG_{2\ x\ 12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin	334
141	 Fmoc-NH-$PEG_{3\ x\ 12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin	334	**142**	 H_2N-PEG_{12}-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin	334
143	 H_2N-$PEG_{2\ x\ 12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin	334	**144**	 H_2N-$PEG_{3\ x\ 12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin	335
145	 H_2N-PEG_{12}-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH	335	**146**	 H_2N-$PEG_{2\ x\ 12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH	335
147	 H_2N-$PEG_{3\ x\ 12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH	336	**148**	 Fmoc-NH-PEG_{12}-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A	336
149	 Fmoc-NH-$PEG_{2\ x\ 12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A	336	**150**	 Fmoc-NH-$PEG_{3\ x\ 12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A	336
151	 Fmoc-NH-PEG_{12}-fQWAVGH-DMH4A	337	**152**	 Fmoc-NH-$PEG_{2\ x\ 12}$-fQWAVGH-DMH4A	337

153	 Fmoc-NH-PEG$_{3\ x\ 12}$-fQWAVGH-DMH4A	337	**154**	 H_2N-PEG$_{2\ x\ 12}$-fQWAVGH-DMH4A	337
155	 H_2N-PEG$_{3\ x\ 12}$-fQWAVGH-DMH4A	338	**156**	 TCO-NH-PEG$_{2\ x\ 12}$-fQWAVGH-DMH4A	338
157	 TCO-NH-PEG$_{3\ x\ 12}$-fQWAVGH-DMH4A	338	**158**	 Fmoc-NH-PEG$_{12}$-fQWAVGH-OH	338
159	 Fmoc-NH-PEG$_{2\ x\ 12}$-fQWAVGH-OH	339	**160**	 Fmoc-NH-PEG$_{3\ x\ 12}$-fQWAVGH-OH	339
161	 H_2N-PEG$_{12}$-fQWAVGH-OH	339	**162**	 H_2N-PEG$_{2\ x\ 12}$-fQWAVGH-OH	339
163	 H_2N-PEG$_{3\ x\ 12}$-fQWAVGH-OH	340	**164**	 N_3-CH_2-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin	340
165	 N_3-$(CH_2)_4$-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin	340	**166**	 5-Hexynoyl-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin	340
167	 N_3-CH_2-NH-fQWAVGH-OH	341	**168**	 N_3-$(CH_2)_4$-NH-fQWAVGH-OH	341
169	 5-Hexynoyl-NH-fQWAVGH-OH				341

170	 H_2N-PEG_3-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin	341
171	 H_2N-PEG_{23}-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin	342
172	 H_2N-PEG_3-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH	342
173	 H_2N-PEG_{23}-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH	342
174	 H_2N-PEG_3-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A	343
175	 H_2N-PEG_{23}-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A	343
176	 H_2N-PEG_3-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A	343
177	 H_2N-PEG_{23}-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A	343
178	 TCO-NH-PEG_3-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A	344

179	 TCO-NH-PEG$_{23}$-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-(CH$_2$)$_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A	344
180	 H$_2$N-PEG$_3$-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-(CH$_2$)$_3$-NH-fQWAVGH-OH	344
181	 N$_3$-CH$_2$-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH	344
182	 N$_3$-(CH$_2$)$_4$-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH	345
183	 5-Hexynoyl-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH	345
184	 N$_3$-CH$_2$-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A	345
185	 N$_3$-(CH$_2$)$_4$-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A	345
186	 5-Hexynoyl-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A	346
187	 N$_3$-CH$_2$-NH-fQWAVGH-DMH4A	346
188	 N$_3$-(CH$_2$)$_4$-NH-fQWAVGH-DMH4A	346
189	 5-Hexynoyl-NH-fQWAVGH-DMH4A	346
190	 1,4-Dichloro-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG$_3$-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-(CH$_2$)$_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A	347
191	 1,4-Dichloro-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG$_{23}$-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-(CH$_2$)$_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A	347

192	 H_2N-CH_2-Ph-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG_3-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A	347
193	 H_2N-CH_2-Ph-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG_{23}-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A	347
194	 NHS-CO_2-CH_2-Ph-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG_3-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A	348
195	 NHS-CO_2-CH_2-Ph-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG_{23}-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A	348
196	 NHS-CO_2-$(CH_2)_3$-CONH-CH_2-Ph-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG_3-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A	348
197	 NHS-CO_2-$(CH_2)_3$-CONH-CH_2-Ph-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG_{23}-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A	349
199	 DOTA-PEG_{11}-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG_3-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A	349

200	 DOTA-PEG$_{11}$-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG$_{23}$-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-(CH$_2$)$_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A	349
[^{111}In] 201	 [^{111}In]DOTA-PEG$_{11}$-Tz	350
[^{177}Lu] 202	 [^{177}Lu]Lu-DOTA-PEG$_{11}$-Tz	350
[^{111}In] 204	 [^{111}In]DOTA-PEG$_{11}$-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG$_3$-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-(CH$_2$)$_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A	350
[^{177}Lu] 205	 [^{177}Lu]Lu-DOTA-PEG$_{11}$-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG$_3$-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-(CH$_2$)$_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A	351
[^{111}In] 206	 [^{111}In]DOTA-PEG$_{11}$-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG$_{23}$-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-(CH$_2$)$_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A	351
[^{177}Lu] 207	 [^{177}Lu]Lu-DOTA-PEG$_{11}$-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG$_{23}$-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-(CH$_2$)$_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A	351

B. General methods

The labeled compounds have been named according to the conventions defined by Coenen *et al.*[613]

1. Reagents and solvents

Unless otherwise indicated, all reagents used were purchased from Advanced Chem Tech (CreoSalus), Bachem, BroadPharm, Carl Roth GmbH, Click Chemistry Tools, Iris Biotech GmbH, Merck Millipore and Sigma-Aldrich and were used as received without purification. Anhydrous solvents tetrahydrofuran, dichloromethane, diethyl ether, acetonitrile and *N,N*-dimethylformamide were purchased from Sigma-Aldrich and were used directly without purification. All deuterated solvents were purchased from Sigma-Aldrich. HPLC or LC-MS UHPLC quality solvents were purchased from Carl Roth GmbH or Sigma-Aldrich Supelco.

2. General equipment

All small-scale reactions were stirred by an Eppendorf ThermoMixer® C with Eppendorf SmartBlock™ Eppendorf's safe-lock tubes®. All normal or large-scale reactions were stirred by Heidoph MR Hei-Tec magnetic stirrers in 25- or 50-mL round-bottom glass flasks with a white septum (Stopper sleeve). If reaction was heated, then a Heidolph Heat-On Block™ and a Heidolph Findenser™ were also used. All SPPS reactions were carried out manually on resin. All SPPS reactions were stirred by Heidolph Rotamax 120 shakers in peptide synthesis vessels (Chemglass Life Sciences). A Bandelin electronic RK 510 ultrasonic bath and a Heidolph Reax top mixer with 5 mm shaking orbit were used to solubilize all powders in solution. A Heidolph Hei-VAP Advantage motor lift (ML) / G3 XL Vertical rotary evaporators was used to concentrate all crude mixtures under reduced pressure (5 mbar, 40 °C, 10 to 50 min) or (500 mtors = 0.7 mbar, r. t., 4 h). All small-scale centrifugations were performed with Eppendorf miniSpin® plus (45°, 60.07 mm, 14485 rpm, r. t., 1 to 2 min). In a normal or large scale, centrifugations were performed with Eppendorf high-speed centrifuge 5430 R (45°, 104.81 mm, 7000 rpm, 0 °C, 20 to 30 min). The Labconco FreeZone® 4.5 L Benchtop Freeze Dryers with 12-Port Stainless Steel Drying Chambers (0.026 mbar, -84 °C, overnight) was used to lyophilize all products after HPLC purification.

Radioactivity in the reaction mixture was measured with Veenstra Instruments dose calibrator VDC-404 (NaI scintillator detector with photomultiplier). The reaction mixture was heated with Grant Instruments (Cambridge) Ltd type QBT1. Centrifugations were performed with Eppendorf microcentrifuge 5415 R.

3. Ultraviolet (UV) spectrophotometry

The Ultraviolet (UV) spectra were recorded on a ThermoFisher Scientific NanoDrop™ One^{C} Microvolume UV-Vis spectrophotometer with quartz glass cell (Hellma® Analytics Quartz Suprasil high precision) at 254, 271, 289 and 301 nm. Peaks were given versus DMF without unit.

4. Mass spectrometry (MS)

Low resolution mass spectra were recorded on an Agilent LC/MSD XT positive or negative electrospray ionization (ESI) mode between 100 and 3000 m/z. Low-resolution mass analyses were monitored after ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) on the Agilent Infinity 1260 with an Agilent InfinityLab Poroshell EC-C18 column (100 x ⌀3.0 mm, 2.7 µm, 120 Å) (solvent A: milli-Q water + 0.1% formic acid; solvent B: CH_3CN + 0.1% formic acid). The sample was diluted in H_2O/CH_3CN (50/50) and was eluted with a linear gradient of 5% to 100% B in A from 0 to 5 min, an isocratic 100% B from 5 to 8 min, with a flow rate of 0.5 mL/min.

5. pH

pH was measured either by using Merck Millipore Supelco MQuant® pH-indicator strips (pH 0 – 14 universal indicator) or a VWR pHenomenal® pH/mV/°C 1100 L meter bench.

6. Chromatography

6.1. TLC

Thin layer chromatography (TLC) was ran on plates of silica gel Merck 60 F_{254} deposited on aluminum plates.

For each labelling, the radio-TLC was performed after heating. Aliquot (2 µL) was deposited on glass microfiber chromatography paper impregnated with silica gel (Agilent Technologies radio-TLC-SG, 100 x 5 mm). Radio-TLCs was eluted with a sodium citrate solution (0.1 M, 250.0 µL, pH 5). Radio-TLCs were analyzed on a Brightspec NV/SA bSCAN-V3 scanner and bScan software.

6.2. Column chromatography on silica

Column chromatography purifications were carried out on silica gel (Sigma-Aldrich Supelco 60 F_{254}, 40-63 µm).

6.3. Sep-Pak chromatography

Sep-Pak C18 3 cc Vac cartridge (500 mg) was conditioned with CH_3OH (2 x 5 mL) and H_2O (2 x 10 mL). Sample in H_2O (0.5 mL) was passed through the Sep-Pak, washed with H_2O (10 x 5 mL) and eluted with CH_3OH (5 mL). All fractions were collected and concentrated under reduced pressure (5 mbar, 20 °C, 1 h).

7. High-performance liquid chromatography (HPLC)

High performance liquid chromatography (HPLC) purifications were performed on an Agilent Infinity 1290 system. Eluents used were: solvent A: milli-Q water + 0.1% formic acid; solvent B: CH_3CN + 0.1% formic acid. The sample was diluted in H_2O/CH_3CN (50/50) and eluted according to the following conditions:

- Conditions 1: Agilent InfinityLab Pursuit XRs EC-C18 Prep column (50 x ⌀21.2 mm, 5 µm, 100 Å) with a linear gradient of 35 to 40% to 47% B in A from 0 to 2 to 5 min, an isocratic 47% B from 5 to 7 min, a linear gradient of 47% to 60% to 75% to 100% B in A from 7 to 10 to 14 to 16 min with a flow rate of 10 mL/min.
- Conditions 2: Phenomenex Luna® EC-C18 column (250 x ⌀10 mm, 5 µm, 100 Å) with a linear gradient of 37% to 52% B in A from 0 to 25 min, an isocratic 52% B from 25 to 27 min, a linear gradient of 52% to 73% to 77% to 100% B in A from 27 to 34 to 35 min with a flow rate of 3 mL/min.

Radio-HPLC analyses were carried out on a Waters alliance e2695 separation module coupled with a Waters 2998 diode array detector (190-500 nm, 1.2 nm, 10 p/s) and a Berthold LB 500 Herm 0.05 id 35144 radioactivity detector interfaced by Waters e-SAT/IN. This equipment was used with an eluent system (solvent A: milli-Q water + 0.01% TFA; solvent B: CH_3CN + 0.01% TFA). The sample (10 µL) was diluted in H_2O/CH_3CN (50/50) to complete at 100 µL, injected into HPLC (50 µL):

- Conditions 3: Phenomenex Gemini® LC EC-C18 column (250 x ⌀4.6 nm, 5 µm, 110 Å) with an isocratic 5% B from 0 to 3 min, a linear gradient of 5% to 40% B in A from 3 to 13 min, an isocratic 40% B from 13 to 16 min with a flow rate of 1 mL/min.
- Conditions 4: Waters Symmetry LC C18 column (250 x ⌀4.6 mm, 5 µm, 100 Å) with an isocratic 5% B from 0 to 3 min, a linear gradient of 5% to 50% B in A from 3 to 20 min, an isocratic 50% B from 20 to 23 min, a linear gradient of 50% to 95% B in A from 23 to 26 min, an isocratic 95% B from 26 to 29 min with a flow rate of 1 mL/min.

The 2D chromatogram (λ = 254 nm) was recorded with a resolution of 4.8 mm while the analog signal e-SAT/IN (60 Hz) was directly used.

Radioactive high performance liquid chromatography (HPLC) purifications were developed on a Waters alliance e2695 separation module coupled with a Waters 2998 diode array detector (190-500 nm, 1.2 nm, 10 p/s) and a Berthold LB 500 Herm 0.05 id 35144

radioactivity detector interfaced by Waters e-SAT/IN. Semi-preparative HPLC column (conditions 5) was used a Phenomenex Gemini® LC EC-C18 column (250 x ⌀10 mm, 5 µm, 110 Å) (solvent A: milli-Q water + 0.01% TFA; B: CH_3CN + 0.01% TFA). The sample was diluted in H_2O/CH_3CN (50/50), injected into HPLC (1 mL) and was eluted with an isocratic 5% B from 0 to 3 min, a linear gradient of 5% to 50% B in A from 3 to 20 min, an isocratic 50% B from 20 to 23 min, a linear gradient of 50% to 95% B in A from 23 to 26 min, an isocratic 95% B from 26 to 29 min with a flow rate of 1 mL / min. Radioactivity of collected product was measured with PerkinElmer® Wizard² 2480-0010 SW 2.1 automatic gamma counter. The identity of the radiolabeled compound was determined by comparing its retention time with that of the non-radiolabeled compound by HPLC.

8. General protocols of synthesis

8.1. General protocol to measure loading capacity

According to Aaptec Technical Support Information Bulletin 1198,[649] resin aliquots (10 mg) was washed with DCM (3 x 500 µL) and diethyl ether (3 x 500 µL), filtered under reduced pressure (5 mbar, r. t., 10 min), weighted and swelled in DMF (800 µL) for 20 min. After filtration, 4-methylpiperidine (200 µL) in DMF (800 µL) was added. The resin was agitated for 20 min and filtered. Filtrate (20 µL) was diluted in DMF (480 µL) in quartz glass cell. The absorbance at 301 nm ($A_{301\ nm}$) versus a DMF blank was measured by UV-visible spectrophotometry. The filtrate volume was adjusted to obtain absorbent at 301 nm between 0 and 1. Loading capacity (L) was calculated by the Beer-Lambert formula $L = (A_{301\ nm} . V . d) / (E_c . w . m)$ with the following parameters: the diluted factor (d) = 25, the total volume (V) = 1 mL, the molar extinction coefficient (E_c) = 7800 mL/mmol.cm, the optical path length (w) = 1 cm and the weight (m) of the resin sample. 4 to 5 resin aliquots of different weights was measured with this protocol to decrease the measurement error by linear regression.

8.2. General protocol for Kaiser test

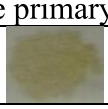
Sigma-Aldrich Kaiser test kit was used following Aaptec Technical Support Information Bulletin 1198.[650,651,652,653] A resin aliquot (1 mg), KCN solution (in H_2O and pyridine, 3 drops), ninhydrin solution (6% in ethanol, 3 drops) and phenol solution (80% in ethanol, 3 drops) were added in test tube. Tube was heated at 120 °C for 3 min and washed with CH_3OH (3 x 1 mL). The resin beads remain their color and the solution stays yellow when no free primary amine was present. Blue color was observed when free primary amine was detected in the solution and/or on beads.

[649] Aaptec, *Technical Support Information Bulletin 1198* (see 01/02/2021).
[650] Aaptec, *Technical Support Information Bulletin 1188* (see 01/02/2021).
[651] Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. *Anal. Biochern.* **1970**, *34* (2), 595–598.
[652] Sarin, V. K.; Kent, S. B. H.; Tam, J. P.; Merrifield, R. B. *Anal. Biochern.* **1981**, *117* (1), 147–157.
[653] Wellings, D. A.; Atherton, E. *Meth. Enzymol.* **1997,** *289* (1), 44–67.

Free primary amine	No free primary amine

8.3. General protocol for TNBS test

According to TNBS protocol,[654,655,656] a resin aliquot (1 mg, some pearls), *N,N*-diisopropylethylamine (10% in DMF, 3 drops), picrylsulfonic acid (1 M in DMF, 3 drops) were added in a test tube. The reaction mixture was stirred at r. t. for 10 min and washed with CH_3OH (3 x 1 mL). The resin beads remain their color and the solution stays light-yellow when no free primary amine was present. Orange color was observed when free primary amine was detected in the solution and/or on beads.

Free primary amine	No free primary amine
	

8.4. General protocol of solid phase peptide synthesis (SPPS)

All amino acids used in the procedures described below were used N_α-protected by a Boc or a Fmoc, and with a Trt or a Boc on the side chain when necessary. The list of amino acids used were: Fmoc-H(Trt)-OH, Fmoc-G-OH, Fmoc-V-OH, Fmoc-A-OH, Fmoc-W(Boc)-OH, Fmoc-Q(Trt)-OH and Fmoc-f-OH.

8.4.1. Swelling

In a SPPS reactor (100 mL), a 2-chlorotrityl chloride resin (100-200 mesh, 1.6 mmol/g) was stirred in anhydrous DCM (10 mL) at r. t. for 1 h. The resin was filtered under reduced pressure (5 mbar, r. t., 1 min) and washed with anhydrous DCM (2 x 15 mL). The resin was filtered under reduced pressure (5 mbar, r. t., 1 min).

8.4.2. Loading

First amino acid (4 equiv.) was solubilized in DCM (15 mL). *N,N*-Diisopropylethylamine (10 equiv.) was diluted in DCM (15 mL) and added to the amino acid solution. This solution was added to the resin and stirred at r. t. for 4 h. The resin was filtered under reduced pressure (5 mbar, r. t., 1 min), washed with DCM (5 x 20 mL) and weighted. Following protocol 8.1, the loading capacity was measured.

[654] Satake, K.; Okuyama, T.; Ohashi, M.; Shinoda, T. *J. Biochem.* **1960**, *47* (5), 654–660.
[655] Snyder, S. L.; Sobocinski, P. Z. *Anal. Biochem.* **1975**, *64* (1), 284–288.
[656] Fields, R. *Meth. Enzymol.* **1972**, *25* (1), 464–468.

8.4.3. Capping

N,N-Diisopropylethylamine (3 mL) and CH_3OH (9 mL) were diluted in DCM (48 mL). This solution was added onto the resin and the reaction mixture was stirred at r. t. for 3 x 5 min. The resin was filtered under reduced pressure (5 mbar, r. t., 1 min), washed with CH_3OH (2 x 10 mL) and DCM (2 x 10 mL) and weighted. The resin was washed with DMF (3 x 20 mL) and filtered under reduced pressure.

8.4.4. Fmoc deprotection

4-Methylpiperidine (8 equiv.) was diluted in DMF (16 mL) at 20% (volume), homogenized by vortex (r. t., 1 min) and added to the resin. The reaction mixture was stirred at r. t. for 5 min. The resin was filtered under reduced pressure (5 mbar, r. t., 1 min), washed with DMF (10 mL). This step was repeated five times, and the resin was weighted. Then, it was washed with CH_3OH (2 x 20 mL), DCM (3 x 20 mL) and DMF (6 x 10 mL). Kaiser (protocol 8.2) and TNBS (protocol 8.3) tests were performed. Filtrate was measured at 301 nm versus a DMF blank to follow kinetics of Fmoc deprotection.

8.4.5. Amino acid coupling

HBTU (4 equiv.) and OxymaPure 1 (4 equiv.) was solubilized in DMF (24 mL). *N,N*-Diisopropylethylamine (10 equiv.) in DMF (21 mL) was added. Amino acid (4 equiv.) was solubilized in HBTU/OxymaPure solution and DIPEA solution. This solution was added to the resin and stirred at r. t. for 2 h. The resin was filtered and weighted. Then, it was washed with DCM (3 x 10 mL) and DMF (3 x 10 mL). Kaiser (protocol 8.2) and TNBS (protocol 8.3) tests were carried out.

8.4.6. Cleavage without deprotection (for LC-MS analysis)

Formic acid (FA) (10 µL), 2,2,2-trifluoroethanol (10 µL) and triisopropylsilane (10 µL) were diluted in DCM (70 µL). In a 1.5 mL Eppendorf's safe-lock tube®, a resin aliquot (1.6 mmol/g, 15 mg) was stirred in FA/TFE/TIPS/DCM solution at r. t. for 3 min. The resin was filtered and washed with DCM (3 x 100 µL). The filtrate was concentrated under an air flow, washed with cold diethyl ether (3 x 100 µL) and centrifuged (14485 rpm, r. t., 1 min). pH was approximately 2. The crude product was concentrated under reduced pressure (40 °C, 5 mbar, 10 min) and weighted.

8.4.7. Cleavage without deprotection (for all batch)

Formic acid (300 µL), 2,2,2-trifluoroethanol (300 µL) and triisopropylsilane (300 µL) were diluted in DCM (2 mL). In a 1.5 mL Eppendorf's safe-lock tube®, the resin (1.6 mmol/g, 1 equiv.) was stirred in FA/TFE/TIPS/DCM solution at r. t. for 3 x 3 min. The resin was filtered and washed with DCM (3 x 1 mL). The filtrate was concentrated under an air flow, washed with cold diethyl ether (10 + 3 x 1 mL) and centrifuged (7000 rpm, 4 °C, 20 min). pH was approximately 2. The crude product was concentrated under reduced pressure (40 °C, 5 mbar, 10 min) and weighted.

8.4.8. Cleavage and deprotection (for LC-MS analysis)

Trifluoroacetic acid (95.0%) and triisopropylsilane (2.5%) in water (2.5%) were homogenized by vortex at r. t. for 1 min and added to the resin. The reaction mixture was stirred at r. t. for 4 h. The resin was filtered and washed with DCM (6 x 100 µL). The filtrate was concentrated under an air flow, washed with cold diethyl ether (3 x 100 µL) and centrifuged (14485 rpm, r. t., 1 min). pH was lower than 1. The crude product was concentrated under reduced pressure (40 °C, 5 mbar, 10 min) and weighted.

8.5. General protocol of C-Term coupling with 2,6-dimethylheptan-4-amine with PyBOP

In a 50 mL round-bottom flask, 2,6-dimethylheptan-4-amine hydrochloride (2.5 equiv.) and PyBOP (2.5 equiv.) were solubilized in DCM (6 mL). *N,N*-diisopropylethylamine (5 equiv.) in DCM (6 mL) was added. Peptide (1 equiv.) in DCM (2 mL) was added to the reagent mixture and the reaction mixture was stirred at r. t. for 5 h. The crude product was concentrated under reduced pressure, washed with cold diethyl ether (3 x 5 mL) and centrifuged (7000 rpm, 4 °C, 20 min). pH was approximately 10. The product was concentrated under reduced pressure (40 °C, 5 mbar, 10 min) and weighted.

8.6. General protocol of C-Term coupling with 2,6-dimethylheptan-4-amine with HBTU

In a 50 mL round-bottom flask, 2,6-dimethylheptan-4-amine hydrochloride (2 equiv.), HBTU (4 equiv.) and OxymaPure (4 equiv.) were solubilized in DCM (6 mL). *N,N*-diisopropylethylamine (8 equiv.) in DCM (6 mL) was added. Peptide (1 equiv.) in DCM (2 mL) was added to the reagent mixture and the reaction mixture was stirred at r. t. for 2 h. The crude product was concentrated under reduced pressure, washed with cold diethyl ether (3 x 5 mL) and centrifuged (7000 rpm, 4 °C, 20 min). pH was approximately 10. The product was concentrated under reduced pressure (40 °C, 5 mbar, 10 min) and weighted.

8.7. General protocol of coupling in solution

In a 1.5 mL Eppendorf's safe-lock tube®, Boc-NH-PEG_n-CO_2H (2 equiv.), TBTU (4 equiv.), TSTU (4 equiv.) and OxymaPure 1 (4 equiv.) were solubilized in DMF (100 µL). *N,N*-Diisopropylethylamine (8 equiv.) in DMF (100 µL) was added to the PEG_n solution. Peptide (1 equiv.) in DMF (100 µL) was added to the reagent mixture and the reaction mixture was stirred at r. t. for 8 h. The crude product was concentrated under reduced pressure, washed with cold diethyl ether (3 x 5 mL) and centrifuged (7000 rpm, 4 °C, 20 min). pH was approximately 10. The crude product was concentrated under reduced pressure (40 °C, 5 mbar, 10 min) and weighted.

8.8. General protocol of Fmoc deprotection in solution

In a 1.5 mL Eppendorf's safe-lock tube®, 4-methylpiperidine (9 equiv.) was diluted in DCM (2.4 mL), homogenized by vortex (r. t., 1 min) and added to the peptide (1 equiv.) in DCM (1 mL). The reaction mixture was stirred at r. t. for 3 min. The crude product was concentrated under reduced pressure, washed with cold diethyl ether (3 x 10 mL) and centrifuged (7500 rpm, 0 °C, 15 min). Crude pH was approximately 10. The crude product was concentrated under reduced pressure (r. t., 500 mtors = 0.7 mbar, 4 h) and weighted.

8.9. Side chains deprotection in solution

Trifluoroacetic acid (95.0%) and triisopropylsilane (2.5%) were diluted in water (2.5%), homogenized by vortex (r. t., 1 min) and added to the peptide solution (1 equiv.) in DCM (1 mL). The reaction mixture was stirred at r. t. for 4 h. The crude product was concentrated under an air flow, washed with cold diethyl ether (3 x 5 mL) and centrifuged (7000 rpm, 4 °C, 20 min). pH was lower than 1. The crude product was concentrated under reduced pressure (40 °C, 5 mbar, 10 min), weighted and purified by HPLC.

8.10. TCO-NHS coupling

The peptide after HPLC purification and freeze dryer was solubilized in H_2O, passed through the Sep-Pak following the general procedure 6.3 and weighted. The crude product was washed with cold diethyl ether (3 x 1 mL) and centrifuged (7000 rpm, 5 °C, 5 min). The crude product was concentrated under reduced pressure (30 °C, 5 mbar, 30 min) and weighted.

In a 10 mL round-bottom glass flask, *N,N*-diisopropylethylamine (10 equiv.) was diluted in acetonitrile and water (v/v: 1/1). A mixture of the peptide (1 equiv., $7 \leq pH \leq 8$) and TCO-NHS ester (2 equiv.) in acetonitrile and water (v/v: 1/1) under nitrogen gas was added. Crude pH was $9 \leq pH \leq 10$. The reaction mixture was stirred at r. t. for 4 h under nitrogen gas. The crude product was concentrated under reduced pressure (16 °C, 5 mbar, 30 min), weighted and purified by HPLC.

8.11. CuAAC

In a 10 mL round-bottom glass flask, copper(II) sulfate pentahydrate (0.15 equiv.) and sodium L-ascorbate (1.50 equiv.) were solubilized in water (500 µL) under nitrogen gas. A mixture of alkynes-peptide (1 equiv.) and azido-PEG_n-amine (2 equiv.) in DMF (1 mL) was added. Crude pH was approximately 7. The reaction mixture was stirred at r. t. for 16 h. The crude product was concentrated under reduced pressure (40 °C, 5 mbar, 10 min) and weighted.

8.12. IEDDA coupling

In a 1.5 mL Eppendorf's safe-lock tube®, TCO-peptide (1 equiv.) in PBS (100 µL) / water (0.9 mL) and tetrazine (1 equiv.) in acetonitrile (50 µL) were stirred at 37 °C for 1 min. Crude pH was approximately 7.

8.13. Direct labelling protocol

In a Mobi-tech reactor (140 µL), a mixture of ascorbic acid (50 mM, 10 µL), sodium acetate (2.5 M, 1 µL), L-methionine (50.0 mM, 10.0 µL), chelated peptide (1 mM, 1 nmol) and [^{111}In]$InCl_3$ or [^{177}Lu]$LuCl_3$ (10 to 20 MBq, 0.6 MBq/µL) in water was heated to 90 °C for 20 min. After radio-TLC analysis, diethylenetriaminepentaacetic acid [DTPA, 12 mg in 3 mL of NaCl (0.9%)] (4.0 M, 5 µL) was added. The radioactivity was measured. A crude aliquot (5 µL, 0.2 MBq) in H_2O (95 µL) was injected (5 µL) on analytic HPLC (conditions 3 and conditions 4).

8.14. Pre-targeting labelling protocol

8.14.1. Step 1: Preparation of labelled tetrazine solution

In a Mobi-tech reactor (140 µL), a mixture of ascorbic acid (50.0 mM, 10.0 µL), sodium acetate (2.5 M, 1.0 µL), DOTA-PEG_{11}-Tz (1 mM, 1 nmol) and [^{111}In]$InCl_3$ or [^{177}Lu]$LuCl_3$ (10 to 20 MBq, 0.6 MBq/µL) in water was stirred at r. t. for 1 min. After radio-TLC analysis, diethylenetriaminepentaacetic acid [DTPA, 12 mg in 3 mL of NaCl (0.9%)] (4.0 M, 5 µL) was added. The radioactivity was measured. A crude aliquot (5 µL, 0.2 MBq) in H_2O (95 µL) was injected (5 µL) on analytic HPLC (conditions 3 and conditions 4). If RCP < 98%, the reaction mixture (135 µL) was purified on semi-preparative HPLC (conditions 5). An aliquot collected product was injected (5 µL) on analytic HPLC.

8.14.2. Step 2: IEDDA reaction

In a Mobi-tech reactor (140 µL), TCO-peptide (1.00 mM, 1.00 µL, 1.00 nmol) and PBS (19.00 µL) were added to the labelled tetrazine solution (135 µL). The reaction mixture was stirred at 37 °C for 5 min. The radioactivity was re-measured. A crude aliquot (5 µL, 0.20 MBq) in H_2O (95 µL) was injected (5 µL) on analytic HPLC (conditions 3 and conditions 4).

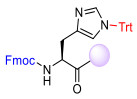
8.15. Biological evaluations: *In vitro* test on membrane

TCO-PEG_{23}-fQWAVGH-DMH4A (13.4 mM, 3.1 mg, 1339.2 nmol, 2314.8 g/mol) in H_2O (100 µL) was homogenized by vortex (30 s). TCO-PEG_{23}-fQWAVGH-DMH4A solution A (13.4 mM, 0.75 µL, 10 nmol) was diluted in H_2O (99.25 µL) and homogenized. TCO-PEG_{23}-fQWAVGH-DMH4A solution B (10^{-4} M, 1 µL, 0.1 nmol) was diluted in H_2O (99 µL) and homogenized to obtain final solution C (10^{-6} M, 100 µL, 0.1 nmol).

Kolliphor in PBS solution (100 µL, 0.06 mg/mL) were precoated the plate for 1 h at r. t. with, filtered through (vacuum), diluted membranes (1.5 µg/well) in Kolliphor in PBS solution, mixed with TCO-PEG_{23}-fQWAVGH-DMH4A solution C and incubated for 1 h at 37 °C. [^{111}In]tetrazine was added, incubated for 30 min at 37 °C (250 µL in well), filtered through and washed with ice cold PBS (10 x 200 µL). Collected filters and some collected 'unused' filters was measured in Gamma counter.

C. Synthesis

Fmoc-H(Trt)-resin (96)



Chemical Formula: $C_{40}H_{33}N_3O_4$
Exact Mass: 619.2471
Molecular Weight: 619.7210

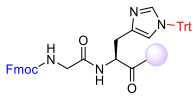
Fmoc-H(Trt)-OH (11.9 g, 19.2 mmol) was fixed on 2-chlorotrityl chloride resin **0** (1.6 mmol/g, 3.1 g, 5.0 mmol) to give the product **96** as a light-yellow resin (6.2 g, 99%) following general procedures 8.4.1, 8.4.2 and 8.4.3. The resin **96** was colorless for Kaiser test (procedure 8.2) and TNBS test (procedure 8.3). Following the general procedure 8.1, loading capacity calculated was 1.6 mmol/g. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.5 min, calcd. for $C_{40}H_{34}N_3O_4$: 620.25 $[M+H]^+$, found: 620.60.

H(Trt)-resin (97)

Chemical Formula: $C_{25}H_{23}N_3O_2$
Exact Mass: 397.1790
Molecular Weight: 397.4780

The compound **97** was obtained as a light-yellow resin (5.0 g, <99%) from the resin **96** (6.2 g, 5.0 mmol) following the general procedure 8.4.4. The resin **97** was blue for Kaiser test (procedure 8.2) and orange for TNBS test (procedure 8.3). **LC-MS** (ESI^-): t_R = 4.1 min, calcd. for $C_{25}H_{22}N_3O_2$: 396.17 $[M-H]^-$, found: 396.20.

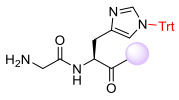
Fmoc-GH(Trt)-resin (98)



Chemical Formula: $C_{42}H_{36}N_4O_5$
Exact Mass: 676.2686
Molecular Weight: 676.7730

The compound **98** was obtained as a light-yellow resin (6.4 g, 99%) from the resin **97** (5.0 g, 5.0 mmol) and Fmoc-G-OH (5.7 g, 19.3 mmol) following the general procedure 8.4.5. The resin **98** was colorless for Kaiser test (procedure 8.2) and TNBS test (procedure 8.3). **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.4 min, calcd. for $C_{42}H_{37}N_4O_5$: 677.28 $[M+H]^+$, found: 677.60.

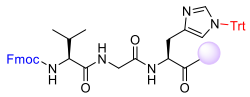
GH(Trt)-resin (99)



Chemical Formula: $C_{27}H_{26}N_4O_3$
Exact Mass: 454.2005
Molecular Weight: 454.5300

The compound **99** was obtained as a light-yellow resin (5.3 g, <99%) from the resin **98** (6.4 g, 4.8 mmol) following the general procedure 8.4.4. The resin **99** was blue for Kaiser test (procedure 8.2) and orange for TNBS test (procedure 8.3). **LC-MS** (ESI^+): t_R = 3.8 min, calcd. for $C_{27}H_{27}N_4O_3$: 455.21 $[M+H]^+$, found: 455.40.

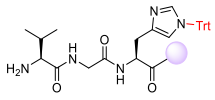
Fmoc-VGH(Trt)-resin (100)



Chemical Formula: $C_{47}H_{45}N_5O_6$
Exact Mass: 775.3370
Molecular Weight: 775.9060

The compound **100** was obtained as a light-yellow resin (6.8 g, 99%) from the resin **99** (5.3 g, 4.8 mmol) and Fmoc-V-OH (6.3 g, 18.7 mmol) following the general procedure 8.4.5. The resin **100** was colorless for Kaiser test (procedure 8.2) and TNBS test (procedure 8.3). **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.5 min, calcd. for $C_{47}H_{46}N_5O_6$: 776.34 $[M+H]^+$, found: 776.60.

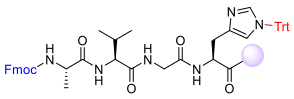
VGH(Trt)-resin (101)



Chemical Formula: $C_{32}H_{35}N_5O_4$
Exact Mass: 553.2689
Molecular Weight: 553.6630

The compound **101** was obtained as a light-yellow resin (5.7 g, <99%) from the resin **100** (6.8 g, 4.8 mmol) following the general procedure 8.4.4. The resin **101** was blue for Kaiser test (procedure 8.2) and orange for TNBS test (procedure 8.3). **LC-MS** (ESI^+): t_R = 3.8 min, calcd. for $C_{32}H_{36}N_5O_4$: 554.28 $[M+H]^+$, found: 554.40.

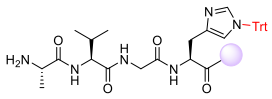
Fmoc-AVGH(Trt)-resin (102)



Chemical Formula: $C_{50}H_{50}N_6O_7$
Exact Mass: 846.3741
Molecular Weight: 846.9850

The compound **102** was obtained as a light-yellow resin (6.8 g, 95%) from the resin **101** (5.7 g, 4.7 mmol) and Fmoc-A-OH (5.7 g, 18.3 mmol) following the general procedure 8.4.5. The resin **102** was colorless for Kaiser test (procedure 8.2) and TNBS test (procedure 8.3). **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.4 min, calcd. for $C_{50}H_{51}N_6O_7$: 847.38 $[M+H]^+$, found: 847.80.

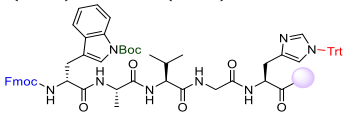
AVGH(Trt)-resin (103)



Chemical Formula: $C_{35}H_{40}N_6O_5$
Exact Mass: 624.3060
Molecular Weight: 624.7420

The compound **103** was obtained as a light-yellow resin (5.8 g, <99%) from the resin **102** (6.8 g, 4.3 mmol) following the general procedure 8.4.4. The resin **103** was blue for Kaiser test (procedure 8.2) and orange for TNBS test (procedure 8.3). **LC-MS** (ESI^+): t_R = 3.9 min, calcd. for $C_{35}H_{41}N_6O_5$: 625.31 $[M+H]^+$, found: 625.60.

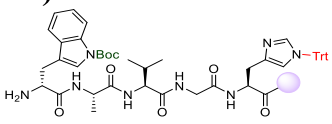
Fmoc-W(Boc)AVGH(Trt)-resin (104)



Chemical Formula: $C_{66}H_{68}N_8O_{10}$
Exact Mass: 1132.5058
Molecular Weight: 1133.3160

The compound **104** was obtained as a light-yellow resin (7.4 g, 93%) from the resin **103** (5.8 g, 4.3 mmol) and Fmoc-W(Boc)-OH (8.8 g, 16.7 mmol) following the general procedure 8.4.5. The resin **104** was colorless for Kaiser test (procedure 8.2) and TNBS test (procedure 8.3). **LC-MS** (ESI^+): t_R = 6.2 min, calcd. for $C_{66}H_{69}N_8O_{10}$: 1133.51 $[M+H]^+$, found: 1133.80.

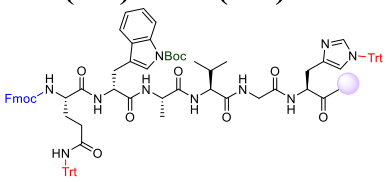
W(Boc)AVGH(Trt)-resin (105)



Chemical Formula: $C_{51}H_{58}N_8O_8$
Exact Mass: 910.4378
Molecular Weight: 911.0730

The compound **105** was obtained as a light-yellow resin (6.5 g, <99%) from the resin **104** (7.4 g, 3.8 mmol) following the general procedure 8.4.4. The resin **105** was blue for Kaiser test (procedure 8.2) and orange for TNBS test (procedure 8.3). **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.5 min, calcd. for $C_{51}H_{59}N_8O_8$: 911.45 $[M+H]^+$, found: 911.80.

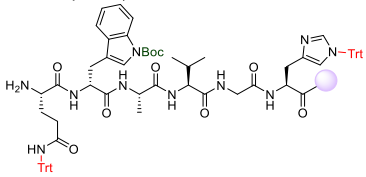
Fmoc-Q(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin (106)



Chemical Formula: $C_{90}H_{90}N_{10}O_{12}$
Exact Mass: 1502.6740
Molecular Weight: 1503.7680

The compound **106** was obtained as a light-yellow resin (8.3 g, 95%) from the resin **105** (6.5 g, 3.7 mmol) and Fmoc-Q(Trt)-OH (8.8 g, 14.5 mmol) following the general procedure 8.4.5. The resin **106** was colorless for Kaiser test (procedure 8.2) and TNBS test (procedure 8.3). **LC-MS** (ESI^+): t_R = 7.1 min, calcd. for $C_{90}H_{91}N_{10}O_{12}$: 752.85 $[M+2H]^{2+}$, 1503.68 $[M+H]^+$, found: 753.60 and 1504.60.

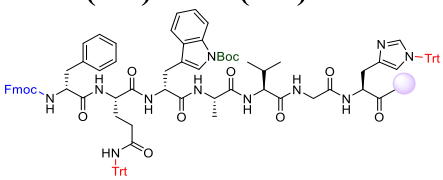
Q(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin (107)



Chemical Formula: $C_{75}H_{80}N_{10}O_{10}$
Exact Mass: 1280.6059
Molecular Weight: 1281.5250

The compound **107** was obtained as a light-yellow resin (7.5 g, <99%) from the resin **106** (8.3 g, 3.4 mmol) following the general procedure 8.4.4. The resin **107** was blue for Kaiser test (procedure 8.2) and orange for TNBS test (procedure 8.3). **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.0 min, calcd. for $C_{75}H_{81}N_{10}O_{10}$: 641.81 $[M+2H]^{2+}$, 1281.61 $[M+H]^+$, found: 642.60 and 1282.80.

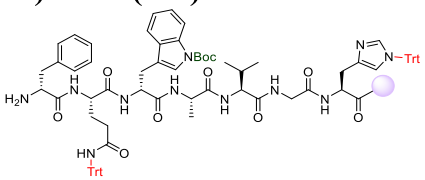
Fmoc-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin (108)



Chemical Formula: $C_{99}H_{99}N_{11}O_{13}$
Exact Mass: 1649.7424
Molecular Weight: 1650.9450

The compound **108** was obtained as a light-yellow resin (8.5 g, 95%) from the resin **107** (7.5 g, 3.4 mmol) and Fmoc-f-OH (5.1 g, 13.1 mmol) following the general procedure 8.4.5. The resin **108** was colorless for Kaiser test (procedure 8.2) and TNBS test (procedure 8.3). **Preparative HPLC** (Conditions 1): t_R = 19.9 min; **LC-MS** (ESI^+): t_R = 6.9 min, calcd. for $C_{99}H_{100}N_{11}O_{13}$: 826.38 $[M+2H]^{2+}$, 1650.75 $[M+H]^+$, found: 827.60 and 1651.80.

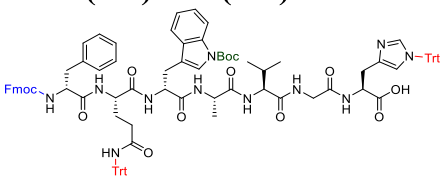
fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin (109)



Chemical Formula: $C_{84}H_{89}N_{11}O_{11}$
Exact Mass: 1427.6743
Molecular Weight: 1428.7020

The compound **109** was obtained as a light-yellow resin (2.7 g, 98%) from the resin **108** (3.0 g, 1.1 mmol) following the general procedure 8.4.4. The resin **109** was blue for Kaiser test (procedure 8.2) and orange for TNBS test (procedure 8.3). **Preparative HPLC** (Conditions 1): t_R = 8.7 min; **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.5 min, calcd. for $C_{84}H_{90}N_{11}O_{11}$: 1428.68 $[M+H]^+$, found: 1428.80.

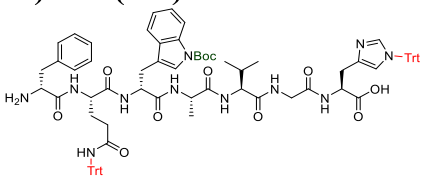
Fmoc-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH (110)



Chemical Formula: $C_{99}H_{99}N_{11}O_{13}$
Exact Mass: 1649.7424
Molecular Weight: 1650.9450

The compound **110** was purified by short silica column chromatography with a linear gradient of 100% $CHCl_3$ to $CHCl_3/CH_3CN/CH_3OH$ 140/60/2 and isolated as a white powder (1.7 g, 90%) from the resin **108** (3.0 g, 1.1 mmol) following the general procedure 8.4.7. **Preparative HPLC** (Conditions 1): t_R = 19.9 min; **LC-MS** (ESI^+): t_R = 6.9 min, calcd. for $C_{99}H_{100}N_{11}O_{13}$: 826.38 $[M+2H]^{2+}$, 1650.75 $[M+H]^+$, found: 827.60 and 1651.80.

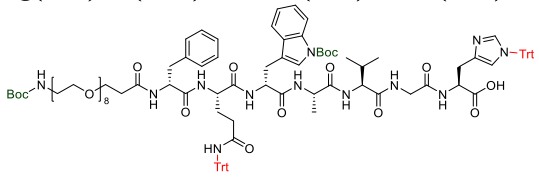
fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH (111)



Chemical Formula: $C_{84}H_{89}N_{11}O_{11}$
Exact Mass: 1427.6743
Molecular Weight: 1428.7020

The compound **111** was purified by short silica column chromatography with a linear gradient of 100% $CHCl_3$ to $CHCl_3/CH_3CN/CH_3OH$ 140/60/2 and isolated as a white powder (1.7 mg, 90%) from the resin **109** (3.0 mg, 1.3 µmol) following the general procedure 8.4.7. **Preparative HPLC** (Conditions 1): t_R = 8.7 min; **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.5 min, calcd. for $C_{84}H_{90}N_{11}O_{11}$: 1428.68 $[M+H]^+$, found: 1428.80.

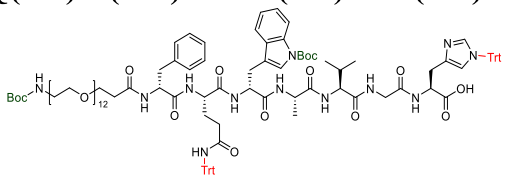
Boc-NH-PEG$_8$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH (112)



Chemical Formula: $C_{108}H_{134}N_{12}O_{22}$
Exact Mass: 1950.9736
Molecular Weight: 1952.3220

The compound **112** was obtained as a white powder (76.1 mg, 99%) from the resin **109** (90.0 mg, 39.4 µmol), NHS (18.1 mg, 157.6 µmol) and Boc-NH-PEG$_8$-CO_2H (85.4 mg, 157.6 µmol) following general procedures 8.4.5 and 8.4.7. The resin after the general procedure 8.4.5 was colorless for Kaiser test (procedure 8.2) and TNBS test (procedure 8.3). **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.4 min, calcd. for $C_{108}H_{135}N_{12}O_{22}$: 976.49 $[M+2H]^{2+}$, 1951.98 $[M+H]^+$, found: 977.80.

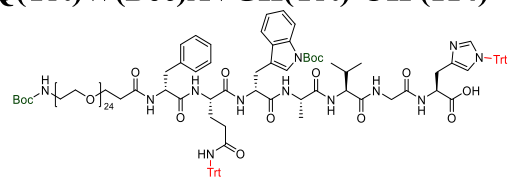
Boc-NH-PEG$_{12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH (113)



Chemical Formula: $C_{116}H_{150}N_{12}O_{26}$
Exact Mass: 2127.0784
Molecular Weight: 2128.5340

The compound **113** was obtained as a white powder (83.0 mg, 99%) from the resin **109** (90.0 mg, 39.4 µmol), NHS (18.1 mg, 157.6 µmol) and Boc-NH-PEG$_{12}$-CO_2H (113.1 mg, 157.6 µmol) stirred for 10 h following general procedures 8.4.5 and 8.4.7. The resin after the general procedure 8.4.5 was colorless for Kaiser test (procedure 8.2) and TNBS test (procedure 8.3). **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.1 min, calcd. for $C_{116}H_{151}N_{12}O_{26}$: 710.03 $[M+3H]^{3+}$, 1064.55 $[M+2H]^{2+}$, found: 708.50 and 1063.50.

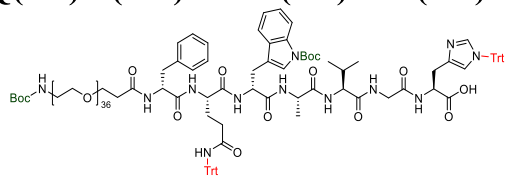
Boc-NH-PEG$_{24}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH (114)



Chemical Formula: $C_{140}H_{198}N_{12}O_{38}$
Exact Mass: 2655.3930
Molecular Weight: 2657.1700

The compound **114** was obtained as a white powder (5.2 mg, 5%) from the resin **109** (90.0 mg, 39.4 µmol), NHS (18.1 mg, 157.6 µmol) and Boc-NH-PEG$_{24}$-CO_2H (196.4 mg, 157.6 µmol) stirred for 10 h following general procedures 8.4.5 and 8.4.7. The resin after the general procedure 8.4.5 was colorless for Kaiser test (procedure 8.2) and TNBS test (procedure 8.3). **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.8 min, calcd. for $C_{140}H_{199}N_{12}O_{38}$: 886.14 $[M+3H]^{3+}$, 1328.70 $[M+2H]^{2+}$, 2656.40 $[M+H]^+$, found: 887.90 and 1329.00.

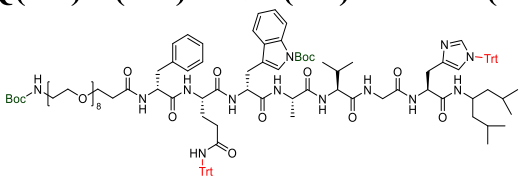
Boc-NH-PEG$_{36}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH (115)



Chemical Formula: $C_{164}H_{246}N_{12}O_{50}$
Exact Mass: 3183.7076
Molecular Weight: 3185.8060

The compound **115** was obtained as a white powder (5.0 mg, 4%) from the resin **109** (90.0 mg, 39.4 µmol), NHS (18.1 mg, 157.6 µmol) and Boc-NH-PEG$_{36}$-CO_2H (279.8 mg, 157.6 µmol) stirred for 10 h following the general procedure 8.4.5. The resin after the general procedure 8.4.5 was colorless for Kaiser test (procedure 8.2) and TNBS test (procedure 8.3). The peptide was stirred in HFIP solution at 20% in DCM for 1 h following the general procedure 8.4.7. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.8 min, calcd. for $C_{164}H_{246}N_{12}O_{50}$: 1061.91 $[M+3H]^{3+}$, 1592.36 $[M+2H]^{2+}$, 3183.71 $[M+H]^+$, found: 1061.89 and 1591.50.

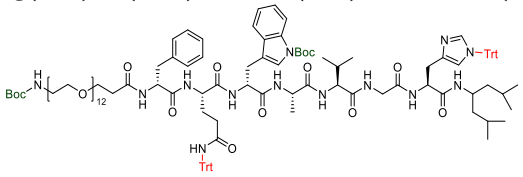
Boc-NH-PEG$_8$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A (116)



Chemical Formula: $C_{117}H_{153}N_{13}O_{21}$
Exact Mass: 2076.1304
Molecular Weight: 2077.5810

The compound **116** was obtained as a white powder (14.8 mg, 89%) from the peptide **112** (25.0 mg, 12.8 µmol) following the general procedure 8.6. **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 5.2 min, calcd. for $C_{117}H_{154}N_{13}O_{21}$: 693.05 $[M+3H]^{3+}$, 1039.07 $[M+2H]^{2+}$, 2077.14 $[M+H]^+$, found: 693.00 and 1039.00.

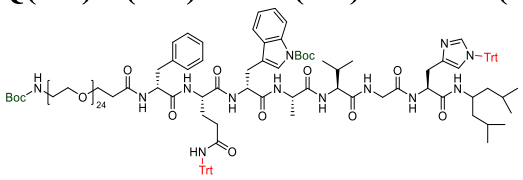
Boc-NH-PEG$_{12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A (117)



Chemical Formula: $C_{125}H_{169}N_{13}O_{25}$
Exact Mass: 2252.2353
Molecular Weight: 2253.7930

The compound **117** was obtained as a white powder (15.7 mg, 87%) from the peptide **113** (27.2 mg, 12.8 µmol) following the general procedure 8.6. **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 5.1 min, calcd. for $C_{125}H_{170}N_{13}O_{25}$: 751.75 $[M+3H]^{3+}$, 1127.12 $[M+2H]^{2+}$, 2253.24 $[M+H]^+$, found: 751.80, 1127.80 and 2253.40.

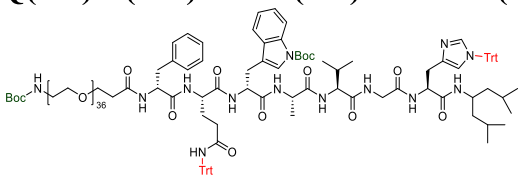
Boc-NH-PEG$_{24}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A (118)



Chemical Formula: $C_{149}H_{217}N_{13}O_{37}$
Exact Mass: 2780.5498
Molecular Weight: 2782.4290

The compound **118** was obtained as a white powder (19.4 mg, 87%) from the peptide **114** (34.0 mg, 12.8 µmol) following the general procedure 8.6. **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 5.1 min, calcd. for $C_{149}H_{218}N_{13}O_{37}$: 927.86 $[M+3H]^{3+}$, 1391.28 $[M+2H]^{2+}$, 2781.56 $[M+H]^+$, found: 970.60 and 1393.40.

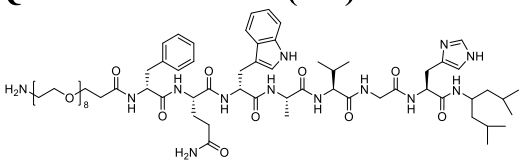
Boc-NH-PEG$_{36}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A (119)



Chemical Formula: $C_{173}H_{265}N_{13}O_{49}$
Exact Mass: 3308.8644
Molecular Weight: 3311.0650

The compound **119** was obtained as a white powder (21.5 mg, 81%) from the peptide **115** (40.8 mg, 12.8 µmol) following the general procedure 8.6. **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 5.1 min, calcd. for $C_{173}H_{266}N_{13}O_{49}$: 1103.96 $[M+3H]^{3+}$, found: 1106.80.

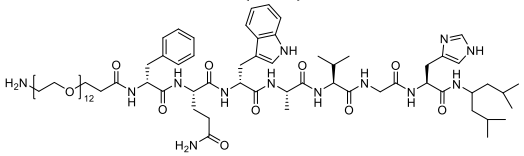
H_2N-NH-PEG_8-fQWAVGH-DMH4A (120)



Chemical Formula: $C_{69}H_{109}N_{13}O_{17}$
Exact Mass: 1391.8064
Molecular Weight: 1392.7050

The compound **120** was obtained as a white powder (16.8 mg, 99%) from the peptide **116** (25.3 mg, 12.2 µmol) following the general procedure 8.9. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.5 min, calcd. for $C_{69}H_{110}N_{13}O_{17}$: 464.94 $[M+3H]^{3+}$, 696.91 $[M+2H]^{2+}$, 1392.81 $[M+H]^+$, found: 464.60, 696.90 and 1392.80.

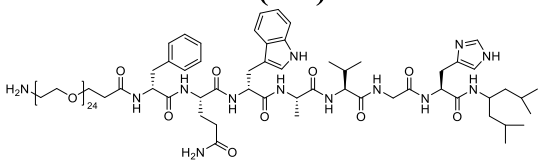
H_2N-PEG_{12}-fQWAVGH-DMH4A (121)



Chemical Formula: $C_{77}H_{125}N_{13}O_{21}$
Exact Mass: 1567.9113
Molecular Weight: 1568.9170

The compound **121** was obtained as a white powder (18.9 mg, 99%) from the peptide **117** (27.5 mg, 12.2 µmol) following the general procedure 8.9. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.1 min, calcd. for $C_{77}H_{126}N_{13}O_{21}$: 523.64 $[M+3H]^{3+}$, 784.96 $[M+2H]^{2+}$, 1568.92 $[M+H]^+$, found: 522.60, 784.60 and 1568.80.

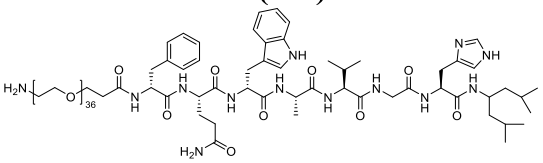
H_2N-PEG_{24}-fQWAVGH-DMH4A (122)



Chemical Formula: $C_{101}H_{173}N_{13}O_{33}$
Exact Mass: 2096.2259
Molecular Weight: 2097.5530

The compound **122** was obtained as a white powder (25.3 mg, 99%) from the peptide **118** (33.9 mg, 12.2 µmol) following the general procedure 8.9. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.5 min, calcd. for $C_{101}H_{174}N_{13}O_{33}$: 525.06 $[M+4H]^{4+}$, 699.75, $[M+3H]^{3+}$,1049.12 $[M+2H]^{2+}$, 2097.23 $[M+H]^+$, found: 525.40, 700.20 and 1049.80.

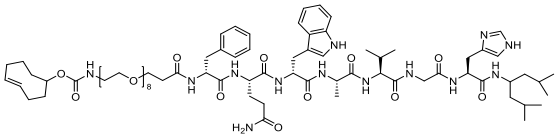
H_2N-PEG_{36}-fQWAVGH-DMH4A (123)



Chemical Formula: $C_{125}H_{221}N_{13}O_{45}$
Exact Mass: 2624.5405
Molecular Weight: 2626.1890

The compound **123** was obtained as a white powder (31.7 mg, 99%) from the peptide **119** (40.4 mg, 12.2 µmol) following the general procedure 8.9. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.5 min, calcd. for $C_{125}H_{222}N_{13}O_{45}$: 292.62 $[M+9H]^{9+}$, 329.07 $[M+8H]^{8+}$, 375.94 $[M+7H]^{7+}$, 438.43 $[M+6H]^{6+}$, 525.92 $[M+5H]^{5+}$, 657.14 $[M+4H]^{4+}$, 875.85 $[M+3H]^{3+}$, 1313.28 $[M+2H]^{2+}$, 2625.55 $[M+H]^+$, found: 292.20, 329.10, 376.20, 439.30, 527.40, 657.40, 876.10 and 1314.00.

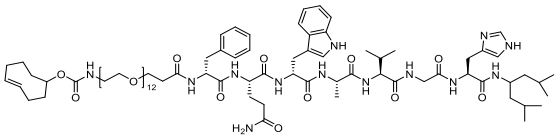
TCO-NH-PEG$_8$-fQWAVGH-DMH4A (124)



Chemical Formula: $C_{78}H_{121}N_{13}O_{19}$
Exact Mass: 1543.8902
Molecular Weight: 1544.8980

The compound **124** was purified by preparative HPLC (Conditions 1) and isolated as a white powder (1.6 mg, 70%) from the peptide **120** (2.1 mg, 1.5 µmol) following the general procedure 8.10. **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 5.5 min, calcd. for $C_{78}H_{122}N_{13}O_{19}$: 772.95 $[M+2H]^{2+}$, 1544.90 $[M+H]^+$, found: 773.20 and 1544.90.

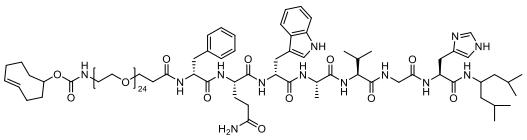
TCO-NH-PEG$_{12}$-fQWAVGH-DMH4A (125)



Chemical Formula: $C_{86}H_{137}N_{13}O_{23}$
Exact Mass: 1719.9950
Molecular Weight: 1721.1100

The compound **125** was purified by preparative HPLC (Conditions 1) and isolated as a white powder (1.6 mg, 61%) from the peptide **121** (2.4 mg, 1.5 µmol) following the general procedure 8.10. **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 5.2 min, calcd. for $C_{86}H_{138}N_{13}O_{23}$: 861.00 $[M+2H]^{2+}$, 1721.00 $[M+H]^+$, found: 861.10 and 1722.60.

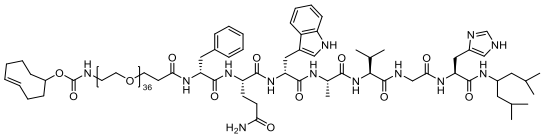
TCO-NH-PEG$_{24}$-fQWAVGH-DMH4A (126)



Chemical Formula: $C_{110}H_{185}N_{13}O_{35}$
Exact Mass: 2248.3096
Molecular Weight: 2249.7460

The compound **126** was purified by preparative HPLC (Conditions 1) and isolated as a white powder (0.1 mg, 4%) from the peptide **122** (3.1 mg, 1.5 µmol) following the general procedure 8.10. **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 4.2 min, calcd. for $C_{110}H_{186}N_{13}O_{35}$: 322.19 $[M+7H]^{7+}$, 375.73 $[M+6H]^{6+}$, 450.67 $[M+5H]^{5+}$, 563.08 $[M+4H]^{4+}$, 750.44 $[M+3H]^{3+}$, 1125.16 $[M+2H]^{2+}$, 2249.32 $[M+H]^+$, found: 323.20, 377.40, 564.60, 751.60 and 1126.00.

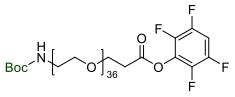
TCO-NH-PEG$_{36}$-fQWAVGH-DMH4A (127)



Chemical Formula: $C_{134}H_{233}N_{13}O_{47}$
Exact Mass: 2776.6242
Molecular Weight: 2778.3820

The compound **127** was purified by preparative HPLC (Conditions 1) and isolated as a white powder (0.1 mg, 2%) from the peptide **123** (3.9 mg, 1.5 µmol) following the general procedure 8.10. **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 3.4 min, calcd. for $C_{134}H_{234}N_{13}O_{47}$: 463.78 $[M+6H]^{6+}$, 556.33 $[M+5H]^{5+}$, 695.16 $[M+4H]^{4+}$, 926.55 $[M+3H]^{3+}$, 1389.32 $[M+2H]^{2+}$, 2777.63 $[M+H]^+$, found: 464.30, 696.40, 928.10 and 1391.10.

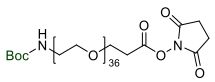
Boc-NH-PEG$_{36}$-CO-TFP (128)



Chemical Formula: $C_{86}H_{159}F_4NO_{40}$
Exact Mass: 1922.0375
Molecular Weight: 1923.1786

In a 10 mL round-bottom flask, Boc-NH-dPEG$_{36}$-CO$_2$H (12.6 mg, 7.1 µmol) and 2,3,5,6-tetrafluorophenol (19 µL, 92.1 µmol) in DMF (0.2 mL) were stirred at r. t. for 1 min. *N,N*-Diisopropylcarbodiimide (10 µL, 127.8 µmol) and 4-(*N,N*-dimethylaminopyridine) (30 µL, 127.8 µmol) in DMF (0.2 mL) was added dropwise at 0 °C. The reaction mixture was stirred at r. t. for 5 h. The crude product was concentrated under reduced pressure to give the product **128** as a white powder (13.4 mg, 98% estimated by LC-MS) which was used directly without further purification. **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 5.4 min, calcd. for $C_{81}H_{152}F_4NO_{38}$: 456.50 $[M+4H]^{4+}$, 608.34 $[M+3H]^{3+}$, 912.00 $[M+2H]^{2+}$, 1822.99 $[M+H]^+$, found: 419.20, 608.50, 912.20 and 1824.10.

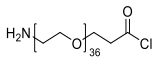
Boc-NH-PEG$_{36}$-CO-NHS (129)



Chemical Formula: $C_{84}H_{162}N_2O_{42}$
Exact Mass: 1871.0602
Molecular Weight: 1872.1920

In a 10 mL round-bottom flask, Boc-NH-dPEG$_{36}$-CO$_2$H (12.8 mg, 7.1 µmol) and *N*-hydroxysuccinimide (10.9 mg, 94.7 µmol) in DMF (0.2 mL) were stirred at r. t. for 1 min. *N,N*-Diisopropylcarbodiimide (10 µL, 127.8 µmol) and 4-(*N,N*-dimethylaminopyridine) (30 µL, 127.8 µmol) in DMF (0.2 mL) was added dropwise at 0 °C. The reaction mixture was stirred at r. t. for 2 h. The crude product was concentrated under reduced pressure to give the product **129** as a white powder (13.2 mg, 98% estimated by LC-MS) which was used directly without further purification. **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 4.8 min, calcd. for $C_{79}H_{155}N_2O_{40}$: 443.76 $[M+4H]^{4+}$, 591.34 $[M+3H]^{3+}$, 886.51 $[M+2H]^{2+}$, 1772.02 $[M+H]^+$, found: 443.80, 591.50, 886.70 and 1773.80.

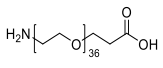
H$_2$N-PEG$_{36}$-CO-Cl (131)



Chemical Formula: $C_{75}H_{150}ClNO_{37}$
Exact Mass: 1691.9575
Molecular Weight: 1693.4450

In a 1.5 mL Eppendorf's safe-lock tube®, Boc-NH-dPEG$_{36}$-CO$_2$H (7.0 mg, 3.9 µmol) and thionyl chloride (7.3 µL, 97.5 µmol) in anhydrous DCM (100 µL) were stirred at r. t. for 2 h. The crude product was concentrated under reduced pressure to give the product **131** as a white powder (6.5 mg, 98% estimated by LC-MS) which was used directly without further purification. **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 4.1 min, calcd. for $C_{75}H_{151}ClNO_{37}$: 846.99 $[M+2H]^{2+}$, 1692.97 $[M+H]^+$, found: 847.20 and 1693.80.

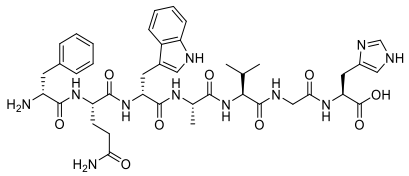
H_2N-PEG_{36}-CO_2H (132)



Chemical Formula: $C_{75}H_{151}NO_{38}$
Exact Mass: 1673.9914
Molecular Weight: 1675.0020

The compound **132** was obtained as a white powder (1.0 mg, 99%) from a Boc-NH-$dPEG_{36}$-CO_2H (1 mg, 0.6 µmol) following the general procedure 8.9. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 3.9 min, calcd. for $C_{75}H_{152}NO_{38}$: 419.51 $[M+4H]^{4+}$, 559.00 $[M+3H]^{3+}$, 838.00 $[M+2H]^{2+}$, 1675.00 $[M+H]^+$, found: 419.80, 559.40, 838.60 and 1675.20.

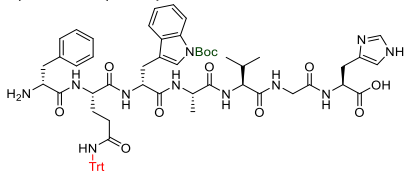
fQWAVGH-OH (133)



Chemical Formula: $C_{41}H_{53}N_{11}O_9$
Exact Mass: 843.9430
Molecular Weight: 843.9430

The compound **133** was obtained as a white powder (3.5 mg, 99%) from the peptide **109** (9.6 mg, 4.2 µmol) following the general procedure 8.4.8. **Preparative HPLC** (Conditions 1): t_R = 7.7 min; **LC-MS** (ESI^+): t_R = 3.2 min, calcd. for $C_{41}H_{54}N_{11}O_9$: 423.21 $[M+2H]^{2+}$, 844.41 $[M+H]^+$, found: 422.80 and 844.40.

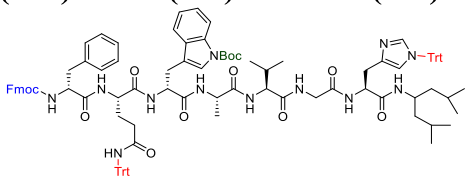
fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH (134)



Chemical Formula: $C_{65}H_{75}N_{11}O_{11}$
Exact Mass: 1185.5648
Molecular Weight: 1186.3810

1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) (20 µL) were diluted in DCM (80 µL). In a 1.5 mL Eppendorf's safe-lock tube®, the resin **109** (4.9 mg, 2.1 µmol) was stirred in HFIP solution at r. t. for 1 h. The resin was filtered and washed with DCM (3 x 100 µL). The filtrate was concentrated under air flow, washed with cold diethyl ether (3 x 100 µL) and centrifuged (14485 rpm, r. t., 1 min). The crude product was concentrated under reduced pressure (40 °C, 5 mbar, 10 min) to give the product **134** as a white powder (2.0 mg, 79%). **Preparative HPLC** (Conditions 1): t_R = 8.1 min; **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.0 min, calcd. for $C_{65}H_{76}N_{11}O_{11}$: 594.29 $[M+2H]^{2+}$, 1186.57 $[M+H]^+$, found: 594.20 and 1186.80.

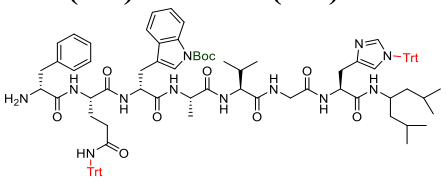
Fmoc-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A (135)



Chemical Formula: $C_{108}H_{118}N_{12}O_{12}$
Exact Mass: 1774.9920
Molecular Weight: 1776.2040

The compound **135** was obtained as a white powder (1.9 g, 98%) from the peptide **108** (1.7 g, 1.1 mmol) following the general procedure 8.5 stirred for 2 h. **Preparative HPLC** (Conditions 1): t_R = 12.4 min; **LC-MS** (ESI^+): t_R = 6.6 min, calcd. for $C_{108}H_{119}N_{12}O_{12}$: 888.96 $[M+2H]^{2+}$, 1775.91 $[M+H]^+$, found: 888.60 and 1775.90.

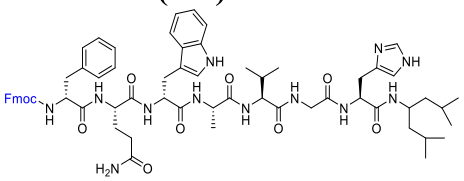
H_2N-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A (136)



Chemical Formula: $C_{93}H_{108}N_{12}O_{10}$
Exact Mass: 1552.8311
Molecular Weight: 1553.9610

The compound **136** was obtained as a white powder (866.1 mg, 90%) from the peptide **135** (1.1 g, 619.3 µmol) following the general procedure 8.8. **Preparative HPLC** (Conditions 1): t_R = 5.6 min; **LC-MS** (ESI^+): t_R = 6.1 min, calcd. for $C_{93}H_{109}N_{12}O_{10}$: 311.57 $[M+5H]^{5+}$, 389.22 $[M+4H]^{4+}$, 518.62 $[M+3H]^{3+}$, 777.93 $[M+2H]^{2+}$, 1553.84 $[M+H]^+$, found: 311.10, 389.40, 518.20, 778.70 and 1554.00.

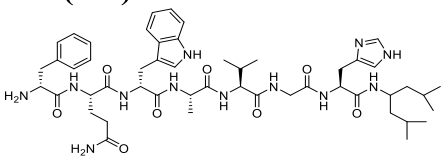
Fmoc-NH-fQWAVGH-DMH4A (137)



Chemical Formula: $C_{65}H_{82}N_{12}O_{10}$
Exact Mass: 1190.6277
Molecular Weight: 1191.4450

The compound **137** was obtained as a white powder (7.8 mg, 98%) from the peptide **135** (11.9 mg, 6.7 µmol) following the general procedure 8.9. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 6.0 min, calcd. for $C_{65}H_{83}N_{12}O_{10}$: 596.83 $[M+2H]^{2+}$, 1191.64 $[M+H]^+$, found: 596.60 and 1191.80.

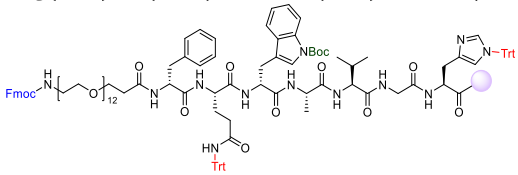
H_2N-fQWAVGH-DMH4A (138)



Chemical Formula: $C_{50}H_{72}N_{12}O_8$
Exact Mass: 968.5596
Molecular Weight: 969.2020

The compound **138** was obtained as a white powder (6.4 mg, 98%) from the peptide **135** (12.0 mg, 6.8 µmol) following the general procedure 8.9. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.2 min, calcd. for $C_{50}H_{73}N_{12}O_8$: 485.29 $[M+2H]^{2+}$, 969.57 $[M+H]^+$, found: 485.60 and 969.80.

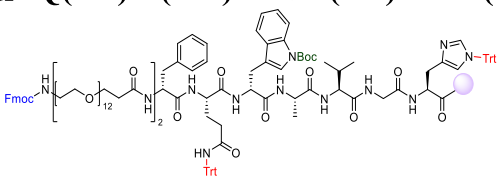
Fmoc-NH-PEG_{12}-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin (139)



Chemical Formula: $C_{126}H_{152}N_{12}O_{26}$
Exact Mass: 2249.0941
Molecular Weight: 2250.6600

The compound **139** was obtained as a light-yellow resin (31.9 mg, 82%) from the resin **109** (28.6 mg, 12.5 µmol) and Fmoc-NH-PEG_{12}-CO_2H (13.0 mg, 15.5 µmol) following the general procedure 8.4.5 optimized with HBTU replaced by TSTU (3.8 mg, 12.5 µmol) and TBTU (4.0 mg, 12.5 µmol). The resin **139** was colorless for Kaiser test (procedure 8.2) and TNBS test (procedure 8.3). **LC-MS** (ESI^+): t_R = 6.3 min, calcd. for $C_{126}H_{152}N_{12}O_{26}$: 750.70 $[M+3H]^{3+}$, 1125.55 $[M+2H]^{2+}$, 2250.1019 $[M+H]^+$, found: 750.80 and 1125.40.

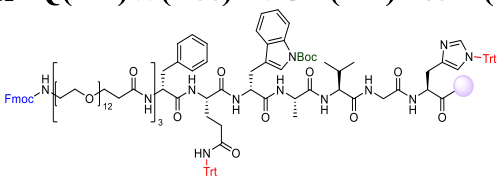
Fmoc-NH-PEG$_{2\ x\ 12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin (140)



Chemical Formula: $C_{153}H_{205}N_{13}O_{39}$
Exact Mass: 2848.4458
Molecular Weight: 2850.3750

The compound **140** was obtained as a light-yellow resin (163.5 mg, 77%) from the resin **142** (169.4 mg, 52.2 µmol) and Fmoc-NH-PEG$_{12}$-CO_2H (54.4 mg, 64.7 µmol) following the general procedure 8.4.5 optimized with HBTU replaced by TSTU (15.7 mg, 52.2 µmol) and TBTU (16.8 mg, 52.2 µmol). The resin **140** was colorless for Kaiser test (procedure 8.2) and TNBS test (procedure 8.3). **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 6.3 min, calcd. for $C_{153}H_{206}N_{13}O_{39}$: 950.49 $[M+3H]^{3+}$, 1425.23 $[M+2H]^{2+}$, 2848.45 $[M+H]^+$, found: 951.20 and 1426.00.

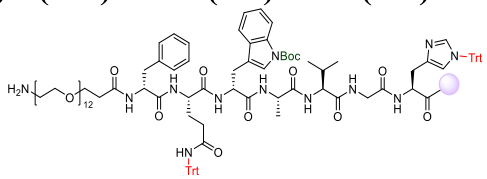
Fmoc-NH-PEG$_{3\ x\ 12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin (141)



Chemical Formula: $C_{180}H_{258}N_{14}O_{52}$
Exact Mass: 3447.7975
Molecular Weight: 3450.0900

The compound **141** was obtained as a light-yellow resin (45.0 mg, 70%) from the resin **143** (53.8 mg, 12.8 µmol) and Fmoc-NH-PEG$_{12}$-CO_2H (13.3 mg, 15.9 µmol) following the general procedure 8.4.5 optimized with HBTU replaced by TSTU (3.9 mg, 12.8 µmol) and TBTU (4.1 mg, 12.8 µmol). The resin **141** was colorless for Kaiser test (procedure 8.2) and TNBS test (procedure 8.3). **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 5.1 min, calcd. for $C_{180}H_{259}N_{14}O_{52}$: 862.96 $[M+4H]^{4+}$, 1150.27 $[M+3H]^{3+}$, 1724.91 $[M+2H]^{2+}$, 3448.81 $[M+H]^+$, found: 863.20 and 1727.20.

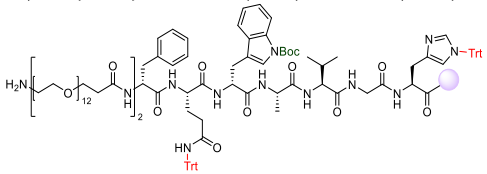
H_2N-PEG$_{12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin (142)



Chemical Formula: $C_{111}H_{142}N_{12}O_{24}$
Exact Mass: 2027.0260
Molecular Weight: 2028.4170

The compound **142** was obtained as a light-yellow resin (29.4 mg, 99%) from the resin **139** (31.7 mg, 8.8 µmol) following the general procedure 8.4.4. The resin **142** was blue for Kaiser test (procedure 8.2) and orange for TNBS test (procedure 8.3). **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 6.4 min, calcd. for $C_{111}H_{143}N_{12}O_{24}$: 676.68 $[M+3H]^{3+}$, 1014.52 $[M+2H]^{2+}$, 2028.03 $[M+H]^+$, found: 676.60, 1014.80 and 2028.00.

H_2N-PEG$_{2\ x\ 12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin (143)

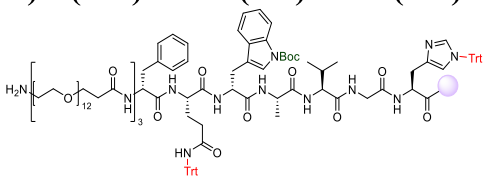


Chemical Formula: $C_{138}H_{195}N_{13}O_{37}$
Exact Mass: 2626.3777
Molecular Weight: 2628.1320

The compound **143** was obtained as a light-yellow resin (36.1 mg, 99%) from the resin **140** (31.7 mg, 8.8 µmol) following the general procedure 8.4.4. The resin **143** was blue for

Kaiser test (procedure 8.2) and orange for TNBS test (procedure 8.3). **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.3 min, calcd. for $C_{138}H_{196}N_{13}O_{37}$: 876.47 $[M+3H]^{3+}$, 1314.20 $[M+2H]^{2+}$, 2627.39 $[M+H]^+$, found: 877.20 and 1314.80.

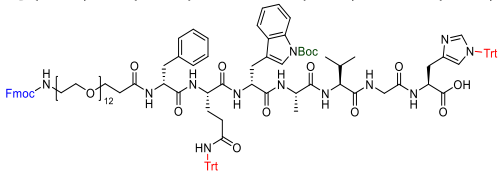
H_2N-$PEG_{3\ x\ 12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin (144)



Chemical Formula: $C_{165}H_{248}N_{14}O_{50}$
Exact Mass: 3225.7294
Molecular Weight: 3227.8470

The compound **144** was obtained as a light-yellow resin (43.0 mg, 99%) from the resin **141** (45.3 mg, 8.2 µmol) following the general procedure 8.4.4. The resin **144** was blue for Kaiser test (procedure 8.2) and orange for TNBS test (procedure 8.3). **LC-MS** (ESI^+): t_R = 6.2 min, calcd. for $C_{165}H_{249}N_{14}O_{50}$: 538.63 $[M+5H]^{5+}$, 646.15 $[M+5H]^{5+}$, 807.44 $[M+4H]^{4+}$, 1076.25 $[M+3H]^{3+}$, 1613.87 $[M+2H]^{2+}$, 3226.74 $[M+H]^+$, found: 538.40, 646.60, 807.80, 1076.80 and 1613.80.

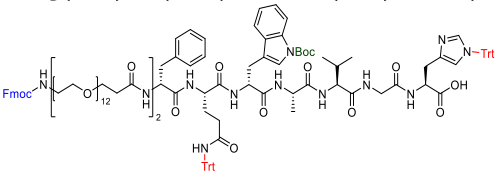
Fmoc-NH-PEG_{12}-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH (145)



Chemical Formula: $C_{126}H_{152}N_{12}O_{26}$
Exact Mass: 2249.0941
Molecular Weight: 2250.6600

The compound **145** was obtained as a white powder (19.7 mg, 99%) from the resin **139** (31.9 mg, 8.9 µmol) following general procedures 8.4.7. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 6.3 min, calcd. for $C_{126}H_{152}N_{12}O_{26}$: 750.70 $[M+3H]^{3+}$, 1125.55 $[M+2H]^{2+}$, 2250.1019 $[M+H]^+$, found: 750.80 and 1125.40.

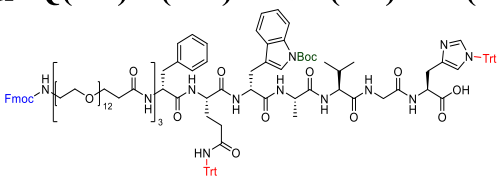
Fmoc-NH-$PEG_{2\ x\ 12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH (146)



Chemical Formula: $C_{153}H_{205}N_{13}O_{39}$
Exact Mass: 2848.4458
Molecular Weight: 2850.3750

The compound **146** was obtained as a white powder (101.2 mg, 99%) from the resin **140** (163.5 mg, 35.9 µmol) following general procedures 8.4.7. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 6.3 min, calcd. for $C_{153}H_{206}N_{13}O_{39}$: 950.49 $[M+3H]^{3+}$, 1425.23 $[M+2H]^{2+}$, 2848.45 $[M+H]^+$, found: 951.20 and 1426.00.

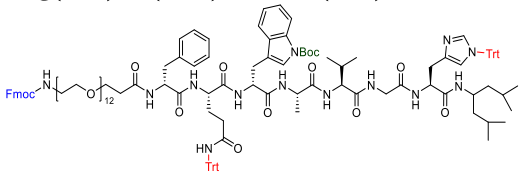
Fmoc-NH-PEG$_{3\ x\ 12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH (147)



Chemical Formula: $C_{180}H_{258}N_{14}O_{52}$
Exact Mass: 3447.7975
Molecular Weight: 3450.0900

The compound **147** was obtained as a white powder (27.8 mg, 99%) from the resin **141** (45.0 mg, 8.2 µmol) following general procedures 8.4.7. **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 5.1 min, calcd. for $C_{180}H_{259}N_{14}O_{52}$: 862.96 $[M+4H]^{4+}$, 1150.27 $[M+3H]^{3+}$, 1724.91 $[M+2H]^{2+}$, 3448.81 $[M+H]^+$, found: 863.20 and 1727.20.

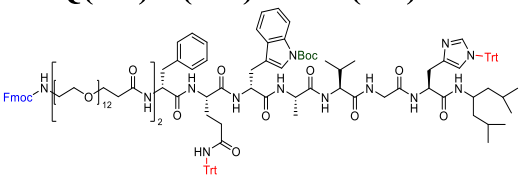
Fmoc-NH-PEG$_{12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A (148)



Chemical Formula: $C_{135}H_{171}N_{13}O_{25}$
Exact Mass: 2374.2509
Molecular Weight: 2375.9190

The compound **148** was obtained as a white powder (20.6 mg, 99%) from the peptide **145** (19.7 mg, 8.8 µmol) following the general procedure 8.5 . **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 4.4 min, calcd. for $C_{135}H_{172}N_{13}O_{25}$: 792.42 $[M+3H]^{3+}$, 1188.13 $[M+2H]^{2+}$, 2375.26 $[M+H]^+$, found: 792.60, 1187.80 and 2374.20.

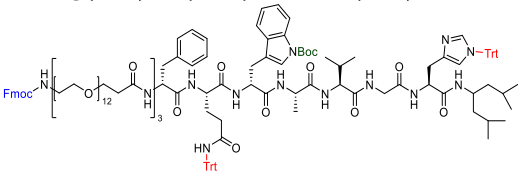
Fmoc-NH-PEG$_{2\ x\ 12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A (149)



Chemical Formula: $C_{162}H_{224}N_{14}O_{38}$
Exact Mass: 2973.6026
Molecular Weight: 2975.6340

The compound **149** was obtained as a white powder (104.6 mg, 99%) from the peptide **146** (101.2 mg, 35.5 µmol) following the general procedure 8.5. **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 5.2 min, calcd. for $C_{162}H_{225}N_{14}O_{38}$: 992.21 $[M+3H]^{3+}$, 1487.81 $[M+2H]^{2+}$, 2974.61 $[M+H]^+$, found: 992.20 and 1487.70.

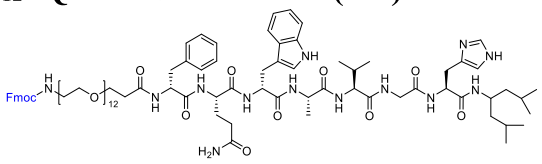
Fmoc-NH-PEG$_{3\ x\ 12}$-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A (150)



Chemical Formula: $C_{189}H_{277}N_{15}O_{51}$
Exact Mass: 3572.9543
Molecular Weight: 3575.3490

The compound **150** was obtained as a white powder (28.5 mg, 99%) from the peptide **147** (27.8 mg, 8.1 µmol) following the general procedure 8.5. **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 4.5 min, calcd. for $C_{170}H_{263}N_{15}O_{51}$: 555.98 $[M+6H]^{6+}$, 666.97 $[M+5H]^{5+}$, 833.47 $[M+4H]^{4+}$, 1110.95 $[M+3H]^{3+}$, 1665.93 $[M+2H]^{2+}$, 3330.8447 $[M+H]^+$, found: 556.80, 834.40 and 1112.80.

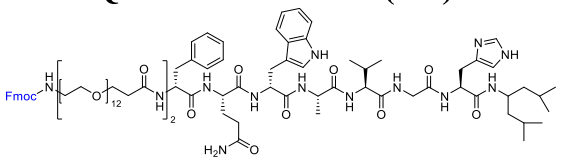
Fmoc-NH-PEG$_{12}$-fQWAVGH-DMH4A (151)



Chemical Formula: $C_{92}H_{135}N_{13}O_{23}$
Exact Mass: 1789.9794
Molecular Weight: 1791.1600

The compound **151** was obtained as a white powder (11.0 mg, 81%) from the peptide **148** (18.1 mg, 7.6 µmol) following the general procedure 8.9. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.6 min, calcd. for $C_{92}H_{136}N_{13}O_{23}$: 597.67 $[M+3H]^{3+}$, 896.00 $[M+2H]^{2+}$, 1790.99 $[M+H]^+$, found: 597.40, 896.00 and 1790.00.

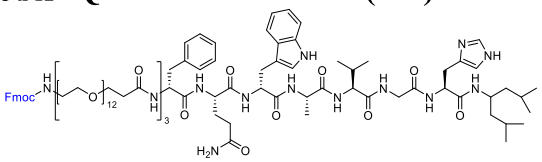
Fmoc-NH-PEG$_{2\ x\ 12}$-fQWAVGH-DMH4A (152)



Chemical Formula: $C_{119}H_{188}N_{14}O_{36}$
Exact Mass: 2389.3110
Molecular Weight: 2390.8750

The compound **152** was obtained as a white powder (57.0 mg, 79%) from the peptide **149** (89.8 mg, 30.2 µmol) following the general procedure 8.9. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 3.9 min, calcd. for $C_{119}H_{189}N_{14}O_{36}$: 478.87, 598.34, 797.45, 1195.67, 2390.34 $[M+H]^+$, found: 478.40 and 798.40.

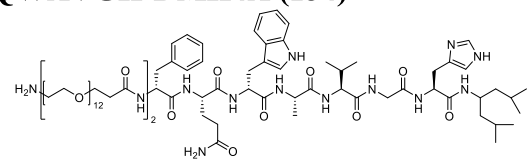
Fmoc-NH-PEG$_{3\ x\ 12}$-fQWAVGH-DMH4A (153)



Chemical Formula: $C_{146}H_{241}N_{15}O_{49}$
Exact Mass: 2988.6828
Molecular Weight: 2990.5900

The compound **153** was obtained as a white powder (15.6 mg, 78%) from the peptide **150** (23.9 mg, 6.7 µmol) following the general procedure 8.9. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.8 min, calcd. for $C_{146}H_{242}N_{15}O_{49}$: 748.18 $[M+4H]^{4+}$, 997.23 $[M+3H]^{3+}$, 1495.35 $[M+2H]^{2+}$, 2989.69 $[M+H]^+$, found: 748.60, 997.80 and 1495.60.

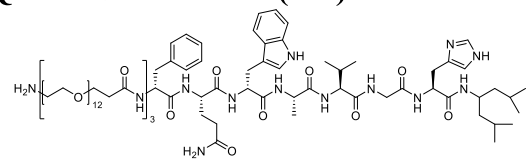
H$_2$N-PEG$_{2\ x\ 12}$-fQWAVGH-DMH4A (154)



Chemical Formula: $C_{104}H_{178}N_{14}O_{34}$
Exact Mass: 2167.2630
Molecular Weight: 2168.6320

The compound **154** was obtained as a white powder (50.7 mg, 98%) from the peptide **152** (57.0 mg, 23.8 µmol) following the general procedure 8.9. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.4 min, calcd. for $C_{104}H_{179}N_{14}O_{34}$: 723.43 $[M+3H]^{3+}$, 1084.64 $[M+2H]^{2+}$, 2168.27 $[M+H]^+$, found: 723.70 and 1084.90.

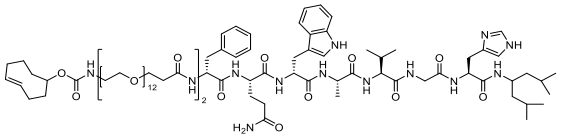
H_2N-$PEG_{3\ x\ 12}$-fQWAVGH-DMH4A (155)



Chemical Formula: $C_{131}H_{231}N_{15}O_{47}$
Exact Mass: 2766.6147
Molecular Weight: 2768.3470

The compound **155** was obtained as a white powder (14.2 mg, 98%) from the peptide **153** (15.6 mg, 5.2 µmol) following the general procedure 8.9. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.4 min, calcd. for $C_{131}H_{232}N_{15}O_{47}$: 692.50 $[M+4H]^{4+}$, 923.21 $[M+3H]^{3+}$, 1384.31 $[M+2H]^{2+}$, 2767.62 $[M+H]^+$, found: 692.50, 923.30 and 1384.40.

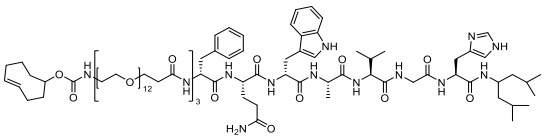
TCO-NH-$PEG_{2\ x\ 12}$-fQWAVGH-DMH4A (156)



Chemical Formula: $C_{113}H_{190}N_{14}O_{36}$
Exact Mass: 2319.3467
Molecular Weight: 2320.8250

The compound **156** was purified by preparative HPLC (Conditions 1) and isolated as a white powder (0.6 mg, 18%) from the peptide **154** (3.2 mg, 1.5 µmol) stirred for 21 h following the general procedure 8.10. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.9 min, calcd. for $C_{113}H_{191}N_{14}O_{36}$: 774.12 $[M+3H]^{3+}$, 1160.68 $[M+2H]^{2+}$, 2320.35 $[M+H]^+$, found: 773.60, 1160.60 and 2320.40.

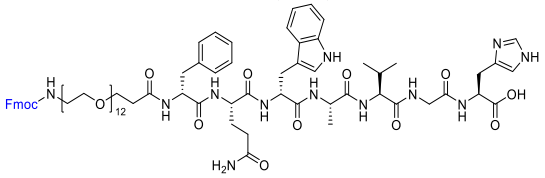
TCO-NH-$PEG_{3\ x\ 12}$-fQWAVGH-DMH4A (157)



Chemical Formula: $C_{140}H_{243}N_{15}O_{49}$
Exact Mass: 2918.6984
Molecular Weight: 2920.5400

The compound **157** was purified by preparative HPLC (Conditions 1) and isolated as a white powder (0.3 mg, 17%) from the peptide **155** (1.8 mg, 0.7 µmol) stirred for 21 h following the general procedure 8.10. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.0 min, calcd. for $C_{140}H_{244}N_{15}O_{49}$: 730.43 $[M+4H]^{4+}$, 973.57 $[M+3H]^{3+}$, 1459.85 $[M+2H]^{2+}$, 2918.70 $[M+H]^+$, found: 730.60, 974.60 and 1460.80.

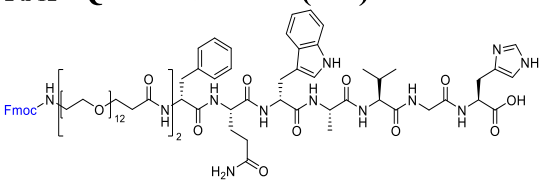
Fmoc-NH-PEG_{12}-fQWAVGH-OH (158)



Chemical Formula: $C_{83}H_{116}N_{12}O_{24}$
Exact Mass: 1664.8225
Molecular Weight: 1665.9010

The compound **158** was obtained as a white powder (0.6 mg, 99%) from the resin **139** (1.4 mg, 0.4 µmol) following the general procedure 8.4.8. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.1 min, calcd. for $C_{83}H_{117}N_{12}O_{24}$: 1665.83 $[M+H]^+$, found: 1667.00.

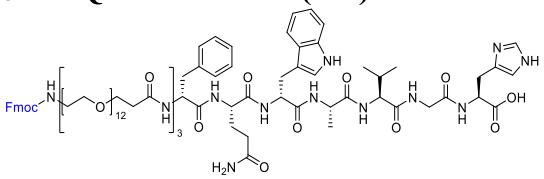
Fmoc-NH-PEG$_{2\ x\ 12}$-fQWAVGH-OH (159)



Chemical Formula: $C_{110}H_{169}N_{13}O_{37}$
Exact Mass: 2264.1742
Molecular Weight: 2265.6160

The compound **159** was obtained as a white powder (0.8 mg, 99%) from the resin **140** (1.6 mg, 0.4 µmol) following the general procedure 8.4.8. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.3 min, calcd. for $C_{110}H_{170}N_{13}O_{37}$: 567.05 $[M+4H]^{4+}$, 755.73 $[M+3H]^{3+}$, 1133.09 $[M+2H]^{2+}$, 2265.18 $[M+H]^+$, found: 567.40, 755.40, 1133.00 and 2265.20.

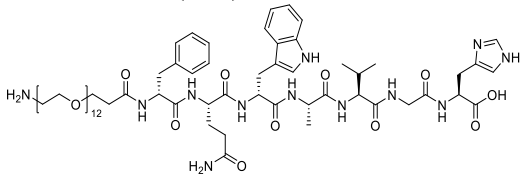
Fmoc-NH-PEG$_{3\ x\ 12}$-fQWAVGH-OH (160)



Chemical Formula: $C_{137}H_{222}N_{14}O_{50}$
Exact Mass: 2863.5259
Molecular Weight: 2865.3310

The compound **160** was obtained as a white powder (1.0 mg, 99%) from the resin **141** (2.0 mg, 0.4 µmol) following the general procedure 8.4.8. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.1 min, calcd. for $C_{137}H_{223}N_{14}O_{50}$: 955.52 $[M+3H]^{3+}$, 1432.77 $[M+2H]^{2+}$, 2864.53 $[M+H]^+$, found: 957.80 and 1433.20.

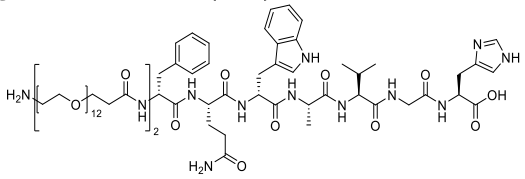
H_2N-PEG$_{12}$-fQWAVGH-OH (161)



Chemical Formula: $C_{68}H_{106}N_{12}O_{22}$
Exact Mass: 1442.7545
Molecular Weight: 1443.6580

The compound **161** was obtained as a white powder (3.3 mg, 99%) from the resin **113** (7.8 mg, 2.3 µmol) following the general procedure 8.4.8. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 3.8 min, calcd. for $C_{68}H_{107}N_{12}O_{22}$: 481.93 $[M+3H]^{3+}$, 722.38 $[M+2H]^{2+}$, 1443.76 $[M+H]^+$, found: 482.20, 722.60 and 1443.80.

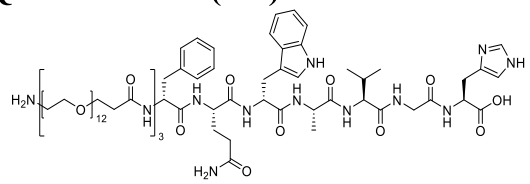
H_2N-PEG$_{2\ x\ 12}$-fQWAVGH-OH (162)



Chemical Formula: $C_{95}H_{159}N_{13}O_{35}$
Exact Mass: 2042.1062
Molecular Weight: 2043.3730

The compound **162** was obtained as a white powder (36.1 mg, 99%) from the resin **159** (64.6 mg, 17.8 µmol) following the general procedure 8.4.4 and 8.4.8. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 3.9 min, calcd. for $C_{95}H_{160}N_{13}O_{35}$: 681.71 $[M+3H]^{3+}$, 1022.06 $[M+2H]^{2+}$, found: 682.20 and 1022.20.

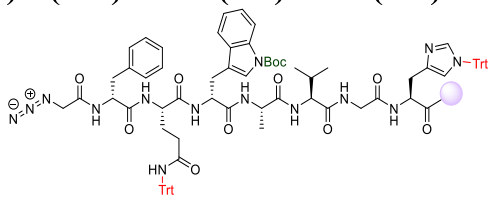
H_2N-$PEG_{3\ x\ 12}$-fQWAVGH-OH (163)



Chemical Formula: $C_{122}H_{212}N_{14}O_{48}$
Exact Mass: 2641.4578
Molecular Weight: 2643.0880

The compound **163** was obtained as a white powder (0.8 mg, 99%) from the resin **159** (1.4 mg, 0.3 µmol) following the general procedure 8.4.4 and 8.4.8. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.8 min, calcd. for $C_{122}H_{213}N_{14}O_{48}$: 881.49 $[M+3H]^{3+}$, 1321.74 $[M+2H]^{2+}$, 2642.47 $[M+H]^+$, found: 882.80, 1323.80 and 2644.00.

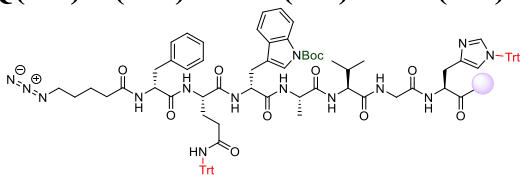
N_3-CH_2-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin (164)



Chemical Formula: $C_{86}H_{90}N_{14}O_{12}$
Exact Mass: 1510.6863
Molecular Weight: 1511.7520

The compound **164** was obtained as a light-yellow resin (0.9070 g, 98%) from the resin **109** (0.8931 g, 0.4 mmol) and 2-azidoacetic acid (30 µL, 0.4 mmol) following the general procedure 8.4.5 optimized with HBTU replaced by TBTU (128.4 mg, 0.4 mmol) stirred for 18 h. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.6 min, calcd. for $C_{86}H_{91}N_{14}O_{12}$: 756.35 $[M+2H]^{2+}$, 1511.69 $[M+H]^+$, found: 756.40 and 1511.80.

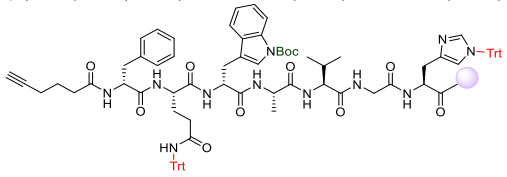
N_3-$(CH_2)_4$-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin (165)



Chemical Formula: $C_{89}H_{96}N_{14}O_{12}$
Exact Mass: 1552.7332
Molecular Weight: 1553.8330

The compound **165** was obtained as a light-yellow resin (0.5848 g, 76%) from the resin **109** (0.7296 g, 0.3 mmol) and 5-azidopentanoic acid (42.2 mg, 0.3 mmol) following the general procedure 8.4.5 optimized with HBTU replaced by TBTU (96.3 mg, 0.3 mmol) stirred for 18 h. **Preparative HPLC** (Conditions 1): t_R = 12.4 min; **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.6 min, calcd. for $C_{89}H_{97}N_{14}O_{12}$: 777.37 $[M+2H]^{2+}$, 1553.74 $[M+H]^+$, found: 777.60 and 1553.80.

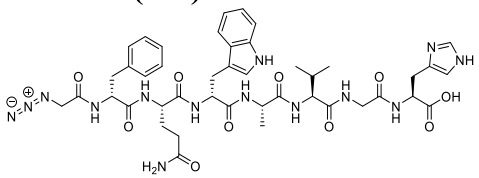
5-Hexynoyl-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin (166)



Chemical Formula: $C_{90}H_{95}N_{11}O_{12}$
Exact Mass: 1521.7162
Molecular Weight: 1522.8150

The compound **166** was obtained as a light-yellow resin (0.5238 g, 77%) from the resin **109** (0.6534 g, 0.3 mmol) and 5-hexynoic acid (57.2 µL, 0.5 mmol) following the general procedure 8.4.5 optimized with HBTU replaced by TBTU (160.5 mg, 0.5 mmol) stirred for 18 h. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 7.0 min, calcd. for $C_{90}H_{96}N_{11}O_{12}$: 761.87 $[M+2H]^{2+}$, 1522.72 $[M+H]^+$, found: 761.80 and 1523.80.

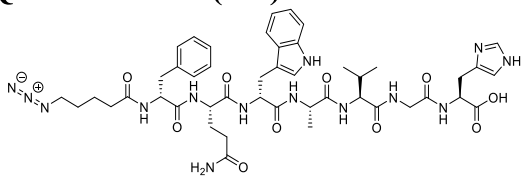
N_3-CH_2-NH-fQWAVGH-OH (167)



Chemical Formula: $C_{43}H_{54}N_{14}O_{10}$
Exact Mass: 926.4147
Molecular Weight: 926.9930

The compound **167** was obtained as a white powder (18.5 mg, 99%) from the resin **164** (48.8 mg, 20.2 µmol) following the general procedure 8.4.8. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.3 min, calcd. for $C_{43}H_{55}N_{14}O_{10}$: 464.21 $[M+2H]^{2+}$, 927.42 $[M+H]^+$, found: 464.30 and 927.80.

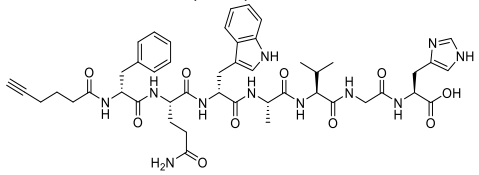
N_3-$(CH_2)_4$-NH-fQWAVGH-OH (168)



Chemical Formula: $C_{46}H_{60}N_{14}O_{10}$
Exact Mass: 968.4617
Molecular Weight: 969.0740

The compound **168** was obtained as a white powder (15.0 mg, 99%) from the resin **165** (39.0 mg, 15.7 µmol) following the general procedure 8.4.8. **Preparative HPLC** (Conditions 1): t_R = 6.2 min; **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.4 min, calcd. for $C_{46}H_{61}N_{14}O_{10}$: 485.24 $[M+2H]^{2+}$, 969.47 $[M+H]^+$, found: 485.40 and 969.80.

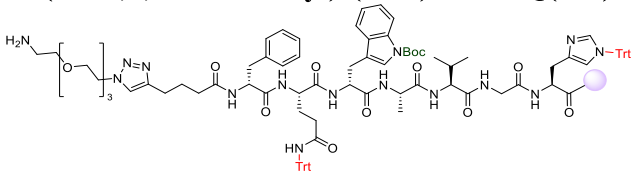
5-Hexynoyl-NH-fQWAVGH-OH (169)



Chemical Formula: $C_{47}H_{59}N_{11}O_{10}$
Exact Mass: 937.4446
Molecular Weight: 938.0560

The compound **169** was obtained as a white powder (13.6 mg, 99%) from the resin **166** (35.7 mg, 14.7 µmol) following the general procedure 8.4.8. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.2 min, calcd. for $C_{47}H_{60}N_{11}O_{10}$: 469.73 $[M+2H]^{2+}$, 938.45 $[M+H]^+$, found: 470.00 and 938.60.

H_2N-PEG_3-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin (170)

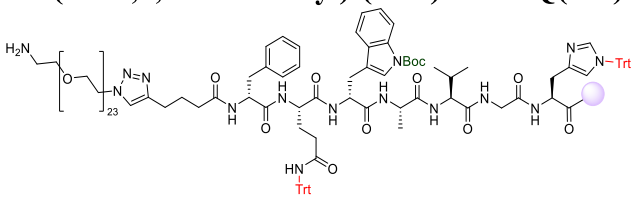


Chemical Formula: $C_{98}H_{113}N_{15}O_{15}$
Exact Mass: 1739.8541
Molecular Weight: 1741.0720

In a 10 mL SPPS reactor, the resin **166** (1.6 mmol/g, 26.0 mg, 10.7 µmol) was stirred in DCM (2 mL) for 1 h and washed with DCM (3 x 1 mL) and DMF (3 x 1 mL). Copper(II) sulfate pentahydrate (0.3 mg, 1.3 µmol) and sodium L-ascorbate (0.8 mg, 3.9 µmol) in DMF (120 µL) were stirred at r. t. for 1 min under $N_{2\,(g)}$ and added to the reaction mixture. 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine (2.7 µL, 13.6 µmol) in THF (120 µL) was added. The reaction mixture was stirred at r. t. for 16 h. The crude product was filtered, washed with CH_3OH (6 x 1 mL) and DCM (6 x 1 mL), filtered, and concentrated under reduced pressure to give the product **170** as

a white powder (16.4 mg, 58% yield). **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.4 min, calcd. for $C_{98}H_{114}N_{15}O_{15}$: 870.93 $[M+2H]^{2+}$, 1740.86 $[M+H]^+$, found: 871.60 and 1742.00.

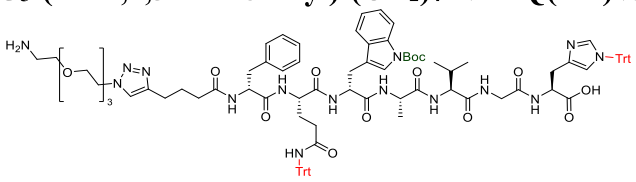
H_2N-PEG_{23}-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-resin (171)



Chemical Formula: $C_{138}H_{193}N_{15}O_{35}$
Exact Mass: 2620.3784
Molecular Weight: 2622.1320

In a 10 mL SPPS reactor, the resin **166** (1.6 mmol/g, 26.0 mg, 10.7 µmol) was stirred in DCM (2 mL) for 1 h and washed with DCM (3 x 1 mL) and DMF (3 x 1 mL). Copper(II) sulfate pentahydrate (0.3 mg, 1.3 µmol) and sodium L-ascorbate (0.8 mg, 3.9 µmol) in DMF (120 µL) were stirred at r. t. for 1 min under $N_{2\,(g)}$ and added to the reaction mixture. Azido-PEG_{23}-amine (14.9 mg, 13.6 µmol) in THF (120 µL) was added. The reaction mixture was stirred at r. t. for 16 h. The crude product was filtered, washed with CH_3OH (6 x 1 mL) and DCM (6 x 1 mL), filtered under reduced pressure to give the product **171** as a white powder (0.8 mg, 2% yield). **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.5 min, calcd. for $C_{138}H_{194}N_{15}O_{35}$: 525.08 $[M+5H]^{5+}$, 656.10 $[M+4H]^{4+}$, 874.47 $[M+3H]^{3+}$, 1311.20 $[M+2H]^{2+}$, 2623.10 $[M+H]^+$, found: 525.80, 656.20, 721.70, 874.40 and 1311.20.

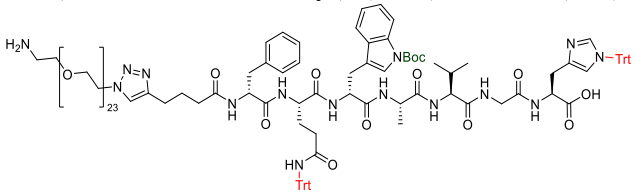
H_2N-PEG_3-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_4$-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH (172)



Chemical Formula: $C_{98}H_{113}N_{15}O_{15}$
Exact Mass: 1739.8541
Molecular Weight: 1741.0720

The compound **172** was obtained as a white powder (10.2 mg, 99%) from the resin **170** (16.4 mg, 5.9 µmol) following the general procedure 8.4.6. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.4 min, calcd. for $C_{98}H_{114}N_{15}O_{15}$: 870.93 $[M+2H]^{2+}$, 1740.86 $[M+H]^+$, found: 871.60 and 1742.00.

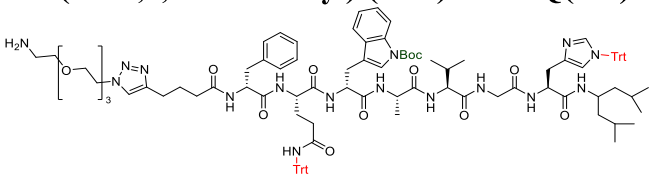
H_2N-PEG_{23}-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_4$-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH (173)



Chemical Formula: $C_{138}H_{193}N_{15}O_{35}$
Exact Mass: 2620.3784
Molecular Weight: 2622.1320

The compound **173** was obtained as a white powder (0.5 mg, 99%) from the resin **171** (0.8 mg, 0.2 µmol) following the general procedure 8.4.6. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.5 min, calcd. for $C_{138}H_{194}N_{15}O_{35}$: 525.08 $[M+5H]^{5+}$, 656.10 $[M+4H]^{4+}$, 874.47 $[M+3H]^{3+}$, 1311.20 $[M+2H]^{2+}$, 2623.10 $[M+H]^+$, found: 525.80, 656.20, 721.70, 874.40 and 1311.20.

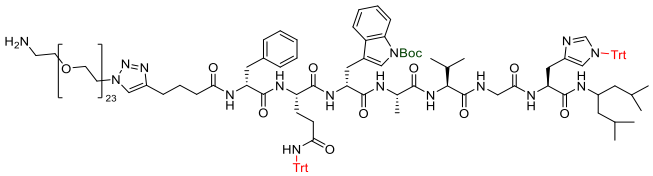
H_2N-PEG_3-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A (174)



Chemical Formula: $C_{107}H_{132}N_{16}O_{14}$
Exact Mass: 1865.0109
Molecular Weight: 1866.3310

The compound **174** was obtained as a white powder (78.9 mg, 99%) from the peptide **186** (65.0 mg, 42.7 µmol) and 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine following the general procedure 8.11. **Preparative HPLC** (Conditions 1): t_R = 11.1 min; **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.9 min, calcd. for $C_{107}H_{133}N_{16}O_{14}$: 933.51 $[M+2H]^{2+}$, 1866.02 $[M+H]^+$, found: 934.00 and 1866.33.

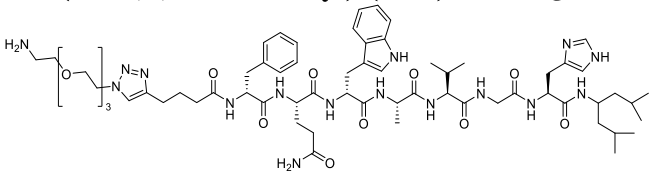
H_2N-PEG_{23}-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A (175)



Chemical Formula: $C_{147}H_{212}N_{16}O_{34}$
Exact Mass: 2745.5352
Molecular Weight: 2747.3910

The compound **175** was obtained as a white powder (116.9 mg, 99%) from the peptide **186** (66.1 mg, 43.4 µmol) and azido-PEG_{23}-amine following the general procedure 8.11. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.9 min, calcd. for $C_{147}H_{213}N_{16}O_{34}$: 550.11 $[M+5H]^{5+}$, 687.39 $[M+4H]^{4+}$, 916.19 $[M+3H]^{3+}$, 1373.77 $[M+2H]^{2+}$, 2746.54 $[M+H]^+$, found: 551.10, 687.50, 916.40 and 1373.90.

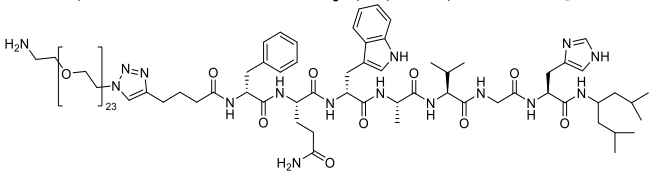
H_2N-PEG_3-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A (176)



Chemical Formula: $C_{64}H_{96}N_{16}O_{12}$
Exact Mass: 1280.7394
Molecular Weight: 1281.5720

The compound **176** was obtained as a white powder (1.4 mg, 99%) from the peptide **174** (2.0 mg, 1.1 µmol) following the general procedure 8.9. **Preparative HPLC** (Conditions 1): t_R = 5.5 min; **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.2 min, calcd. for $C_{64}H_{97}N_{16}O_{12}$: 427.92 $[M+3H]^{3+}$, 641.38 $[M+2H]^{2+}$, 1281.75 $[M+H]^+$, found: 428.20, 641.80 and 1282.00.

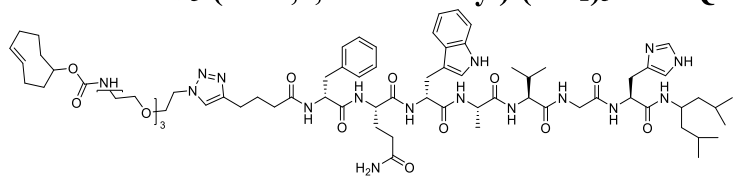
H_2N-PEG_{23}-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A (177)



Chemical Formula: $C_{104}H_{176}N_{16}O_{32}$
Exact Mass: 2161.2637
Molecular Weight: 2162.6320

The compound **177** was obtained as a white powder (85.8 mg, 99%) from the peptide **175** (110.1 mg, 40.1 µmol) following the general procedure 8.9. **Preparative HPLC** (Conditions 1): t_R = 9.8 min; **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.4 min, calcd. for $C_{104}H_{177}N_{16}O_{32}$: 721.43 $[M+3H]^{3+}$, 1081.64 $[M+2H]^{2+}$ and 2162.27 $[M+H]^+$, found: 721.70 and 1081.90.

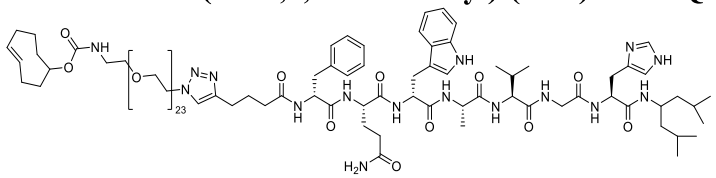
TCO-NH-PEG$_3$-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-(CH$_2$)$_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A (178)



Chemical Formula: $C_{73}H_{108}N_{16}O_{14}$
Exact Mass: 1432.8231
Molecular Weight: 1433.7650

The compound **178** was purified by preparative HPLC (Conditions 1: t_R = 6.0 min) and isolated as a white powder (59.8 mg, 62%) from the peptide **176** (86.2 mg, 67.3 µmol) stirred for 21 h following the general procedure 8.10. **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 5.2 min, calcd. for $C_{73}H_{109}N_{16}O_{14}$: 717.42 $[M+2H]^{2+}$, 1433.83 $[M+H]^+$, found: 717.60 and 1433.80.

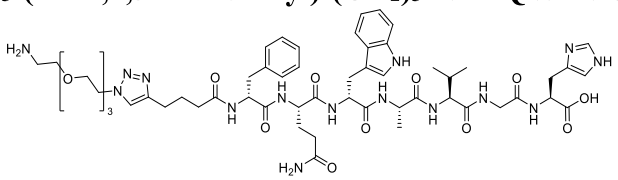
TCO-NH-PEG$_{23}$-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-(CH$_2$)$_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A (179)



Chemical Formula: $C_{113}H_{188}N_{16}O_{34}$
Exact Mass: 2313.3474
Molecular Weight: 2314.8250

The compound **179** was purified by preparative HPLC (Conditions 1: t_R = 10.4 min) and isolated as a white powder (62.2 mg, 60%) from the peptide **177** (96.9 mg, 44.8 µmol) stirred for 21 h following the general procedure 8.10. **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 5.0 min, calcd. for $C_{113}H_{189}N_{16}O_{34}$: 579.34 $[M+4H]^{4+}$, 772.12 $[M+3H]^{3+}$, 1157.68 $[M+2H]^{2+}$, 2314.36 $[M+H]^+$, found: 579.50, 772.50, 1157.90 and 2315.40.

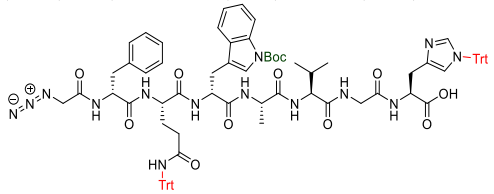
H$_2$N-PEG$_3$-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-(CH$_2$)$_3$-NH-fQWAVGH-OH (180)



Chemical Formula: $C_{55}H_{77}N_{15}O_{13}$
Exact Mass: 1155.5825
Molecular Weight: 1156.3130

The compound **180** was obtained as a white powder (3.0 mg, 99%) from the resin **170** (7.4 mg, 2.7 µmol) following the general procedure 8.4.8. **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 4.3 min, calcd. for $C_{55}H_{78}N_{15}O_{13}$: 578.80 $[M+2H]^{2+}$, 1156.59 $[M+H]^+$, found: 578.40 and 1156.60.

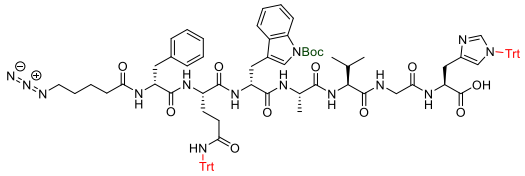
N$_3$-CH$_2$-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH (181)



Chemical Formula: $C_{86}H_{90}N_{14}O_{12}$
Exact Mass: 1510.6863
Molecular Weight: 1511.7520

The compound **181** was obtained as a white powder (9.8 mg, 98%) from the resin **164** (10.0 mg, 6.6 µmol) following the general procedure 8.4.7. **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 4.6 min, calcd. for $C_{86}H_{91}N_{14}O_{12}$: 756.35 $[M+2H]^{2+}$, 1511.69 $[M+H]^+$, found: 756.40 and 1511.80.

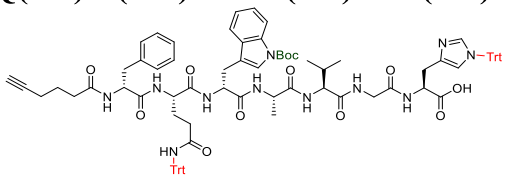
N_3-$(CH_2)_4$-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH (182)



Chemical Formula:
$C_{89}H_{96}N_{14}O_{12}$
Exact Mass: 1552.7332
Molecular Weight: 1553.8330

The compound **182** was obtained as a white powder (10.1 mg, 98%) from the resin **165** (10.3 mg, 6.6 µmol) following the general procedure 8.4.7. **Preparative HPLC** (Conditions 1): t_R = 12.4 min; **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.6 min, calcd. for $C_{89}H_{97}N_{14}O_{12}$: 777.37 $[M+2H]^{2+}$, 1553.74 $[M+H]^+$, found: 777.60 and 1553.80.

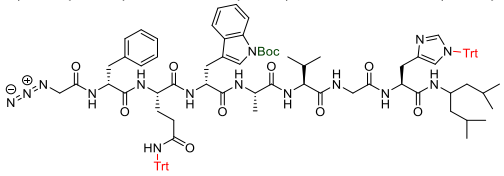
5-Hexynoyl-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-OH (183)



Chemical Formula:
$C_{90}H_{95}N_{11}O_{12}$
Exact Mass: 1521.7162
Molecular Weight: 1522.8150

The compound **183** was obtained as a white powder (9.9 mg, 98%) from the resin **166** (10.1 mg, 6.6 µmol) following the general procedure 8.4.7. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 7.0 min, calcd. for $C_{90}H_{96}N_{11}O_{12}$: 761.87 $[M+2H]^{2+}$, 1522.72 $[M+H]^+$, found: 761.80 and 1523.80.

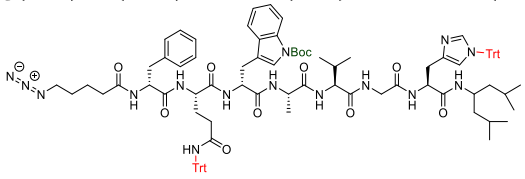
N_3-CH_2-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A (184)



Chemical Formula:
$C_{95}H_{109}N_{15}O_{11}$
Exact Mass: 1635.8431
Molecular Weight: 1637.0110

The compound **184** was obtained as a white powder (5.2 mg, 91%) from the peptide **136** (5.3 mg, 3.5 µmol) and 2-azidoacetic acid (1 µL, 14.0 µmol) following the general procedure 8.7 optimized with TBTU/TSTU replaced by *N,N*-diisopropylcarbodiimide (DIC) (2 µL, 14.0 µmol) stirred for 13 h. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 6.1 min, calcd. for $C_{95}H_{110}N_{15}O_{11}$: 546.29 $[M+3H]^{3+}$, 818.93 $[M+2H]^{2+}$, 1636.85 $[M+H]^+$, found: 546.20 and 818.80.

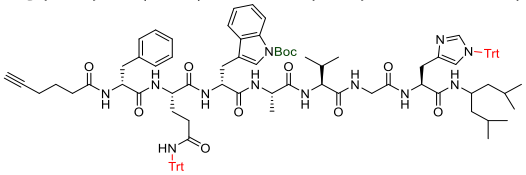
N_3-$(CH_2)_4$-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A (185)



Chemical Formula:
$C_{98}H_{115}N_{15}O_{11}$
Exact Mass: 1677.8900
Molecular Weight: 1679.0920

The compound **185** was obtained as a white powder (5.6 mg, 95%) from the peptide **136** (5.5 mg, 3.5 µmol) and 5-azidopentanoic acid (2.0 mg, 14 µmol) following the general procedure 8.7 optimized with TBTU/TSTU replaced by *N,N*-diisopropylcarbodiimide (DIC) (2 µL, 14.0 µmol) stirred for 13 h. **Preparative HPLC** (Conditions 1): t_R = 11.9 min; **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.6 min, calcd. for $C_{98}H_{116}N_{15}O_{11}$: 560.30 $[M+3H]^{3+}$, 839.95 $[M+2H]^{2+}$, 1678.90 $[M+H]^+$, found: 560.20, 839.90 and 1678.80.

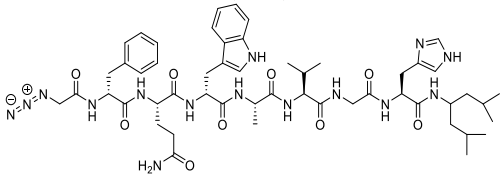
5-Hexynoyl-NH-fQ(Trt)W(Boc)AVGH(Trt)-DMH4A (186)



Chemical Formula: $C_{99}H_{114}N_{12}O_{11}$
Exact Mass: 1646.8730
Molecular Weight: 1648.0740

The compound **186** was purified by short silica column chromatography with a linear gradient of 0% to 20% CH_3OH in $CHCl_3$ and isolated as a white powder (364.9 mg, 97%) from the peptide **136** (347.6 mg, 228.3 µmol) and 5-hexynoic acid (102.4 mg, 913.2 µmol) following the general procedure 8.7 optimized with TBTU/TSTU replaced by *N,N*-diisopropylcarbodiimide (DIC) (2 µL, 14.0 µmol) stirred for 13 h. **Preparative HPLC** (Conditions 1): t_R = 13.3 min; **LC-MS** (ESI^+): t_R = 6.3 min, calcd. for $C_{99}H_{115}N_{12}O_{11}$: 824.44 $[M+2H]^{2+}$, 1647.88 $[M+H]^+$, found: 825.80 and 1648.00.

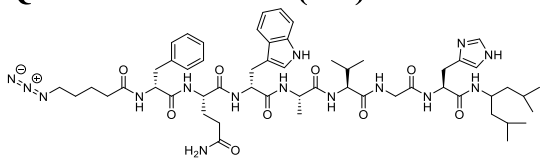
N_3-CH_2-NH-fQWAVGH-DMH4A (187)



Chemical Formula: $C_{52}H_{73}N_{15}O_9$
Exact Mass: 1051.5716
Molecular Weight: 1052.2520

The compound **187** was obtained as a white powder (8.7 mg, 99%) from the peptide **184** (13.7 mg, 8.4 µmol) following the general procedure 8.9. **Preparative HPLC** (Conditions 1): t_R = 7.1 min; **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.0 min, calcd. for $C_{52}H_{74}N_{15}O_9$: 526.79 $[M+2H]^{2+}$, 1052.58 $[M+H]^+$, found: 527.00 and 1052.80.

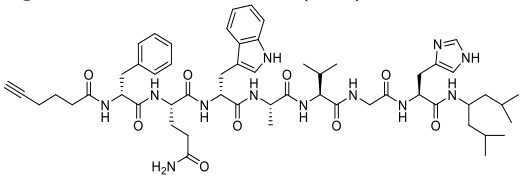
N_3-$(CH_2)_4$-NH-fQWAVGH-DMH4A (188)



Chemical Formula: $C_{55}H_{79}N_{15}O_9$
Exact Mass: 1093.6185
Molecular Weight: 1094.3330

The compound **188** was obtained as a white powder (9.2 mg, 99%) from the peptide **185** (14.1 mg, 8.4 µmol) following the general procedure 8.9. **Preparative HPLC** (Conditions 1): t_R = 7.5 min; **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.2 min, calcd. for $C_{55}H_{80}N_{15}O_9$: 547.82 $[M+2H]^{2+}$, 1094.63 $[M+H]^+$, found: 548.00 and 1094.80.

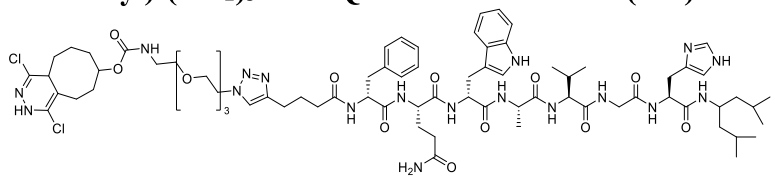
5-Hexynoyl-NH-fQWAVGH-DMH4A (189)



Chemical Formula: $C_{56}H_{78}N_{12}O_9$
Exact Mass: 1062.6015
Molecular Weight: 1063.3150

The compound **189** was obtained as a white powder (39.3 mg, 99%) from the peptide **186** (61.5 mg, 37.3 µmol) following the general procedure 8.9. **Preparative HPLC** (Conditions 1): t_R = 7.3 min; **LC-MS** (ESI^+): t_R = 5.2 min, calcd. for $C_{56}H_{79}N_{12}O_9$: 532.31 $[M+2H]^{2+}$, 1063.61 $[M+H]^+$, found: 532.60 and 1063.80.

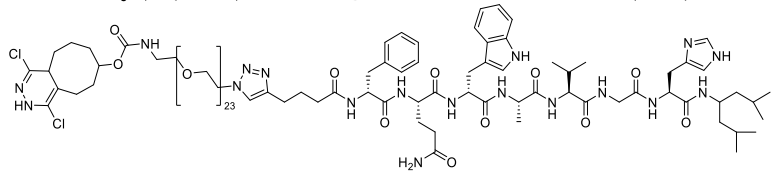
1,4-Dichloro-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG$_3$-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-(CH$_2$)$_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A (190)



Chemical Formula: $C_{75}H_{108}Cl_2N_{18}O_{14}$
Exact Mass: 1554.7669
Molecular Weight: 1556.7010

The compound **190** was obtained as a white powder (1.1 mg, 99%) from the peptide **178** (1.0 mg, 0.7 µmol) and 3,6-dichloro-1,2,4,5-tetrazine (0.1 mg, 0.7 µmol) following the general procedure 8.12. **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 4.9 min, calcd. for $C_{75}H_{109}Cl_2N_{18}O_{14}$: 519.26 $[M+3H]^{3+}$, 778.39 $[M+2H]^{2+}$, 1555.77 $[M+H]^+$, found: 519.10, 779.60 and 1558.50.

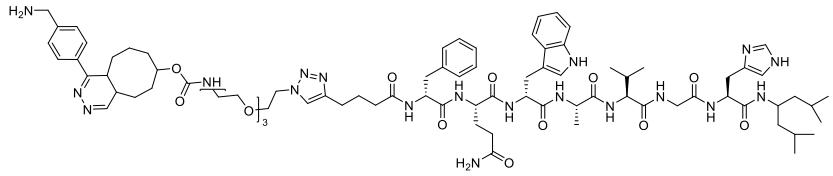
1,4-Dichloro-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG$_3$-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-(CH$_2$)$_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A (191)



Chemical Formula: $C_{115}H_{188}Cl_2N_{18}O_{34}$
Exact Mass: 2435.2912
Molecular Weight: 2437.7610

The compound **191** was obtained as a white powder (1.7 mg, 99%) from the peptide **179** (1.6 mg, 0.7 µmol) and 3,6-dichloro-1,2,4,5-tetrazine (0.1 mg, 0.7 µmol) following the general procedure 8.12. **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 4.3 min, calcd. for $C_{115}H_{189}Cl_2N_{18}O_{34}$: 609.83 $[M+4H]^{4+}$, 812.77 $[M+3H]^{3+}$, 1218.65 $[M+2H]^{2+}$, 2436.30 $[M+H]^+$, found: 609.80, 812.50 and 1218.50.

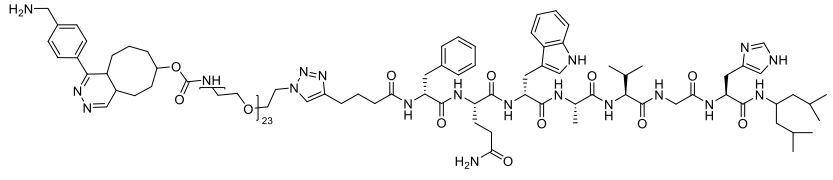
H$_2$N-CH$_2$-Ph-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG$_3$-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-(CH$_2$)$_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A (192)



Chemical Formula: $C_{82}H_{117}N_{19}O_{14}$
Exact Mass: 1591.9027
Molecular Weight: 1592.9570

The compound **192** was obtained as a white powder (1.1 mg, 99%) from the peptide **178** (1.0 mg, 0.7 µmol) and (4-(1-2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl)methanamine hydrochloride (0.1 mg, 0.7 µmol) following the general procedure 8.12. **LC-MS** (ESI$^+$): t_R = 4.4 min, calcd. for $C_{82}H_{118}N_{19}O_{14}$: 531.64 $[M+3H]^{3+}$, 796.96 $[M+2H]^{2+}$, 1592.91 $[M+H]^+$, found: 531.70, 797.10 and 1593.00.

H$_2$N-CH$_2$-Ph-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG$_{23}$-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-(CH$_2$)$_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A (193)

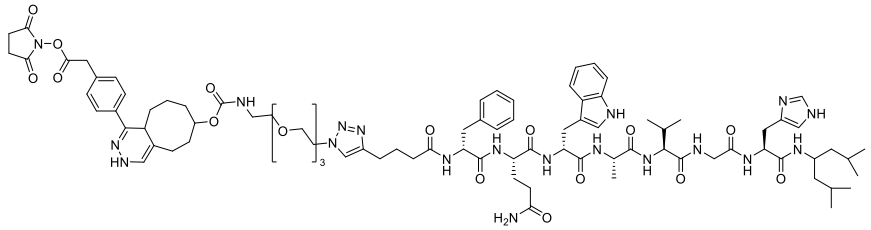


Chemical Formula: $C_{122}H_{197}N_{19}O_{34}$
Exact Mass: 2472.4270
Molecular Weight: 2474.0170

The compound **193** was obtained as a white powder (1.7 mg, 99%) from the peptide **179** (1.6 mg, 0.7 µmol) and (4-(1-2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl)methanamine hydrochloride (0.1 mg,

0.7 µmol) following the general procedure 8.12. **Preparative HPLC** (Conditions 1): t_R = 11.3 min; **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.4 min, calcd. for $C_{122}H_{198}N_{19}O_{34}$: 413.08 $[M+6H]^{6+}$, 495.49 $[M+5H]^{5+}$, 619.11 $[M+4H]^{4+}$, 825.15 $[M+3H]^{3+}$, 1237.22 $[M+2H]^{2+}$, found: 412.50, 495.20, 619.00, 825.00 and 1237.00.

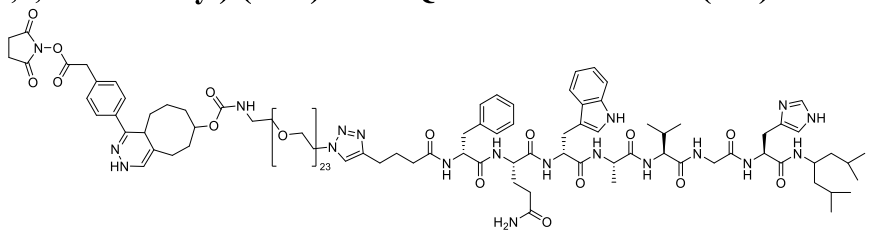
NHS-CO_2-CH_2-Ph-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG_3-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A (194)



Chemical Formula: $C_{87}H_{119}N_{19}O_{18}$
Exact Mass: 1717.8980
Molecular Weight: 1719.0240

The compound **194** was obtained as a white powder (1.2 mg, 99%) from the peptide **178** (1.0 mg, 0.7 µmol) and methyltetrazine-NHS ester (0.2 mg, 0.7 µmol) following the general procedure 8.12. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.9 min, calcd. for $C_{87}H_{120}N_{19}O_{18}$: 573.64 $[M+3H]^{3+}$, 859.96 $[M+2H]^{2+}$, 1718.91 $[M+H]^+$, found: 575.20, 861.30 and 1720.00.

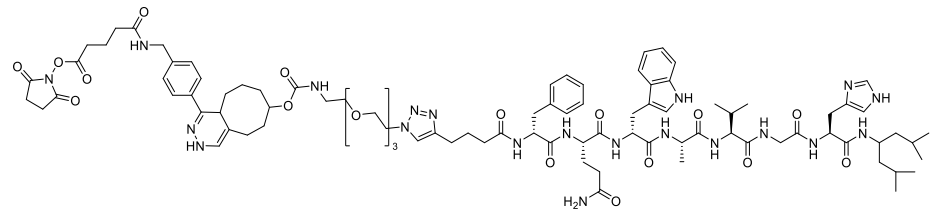
NHS-CO_2-CH_2-Ph-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG_3-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A (195)



Chemical Formula: $C_{127}H_{199}N_{19}O_{38}$
Exact Mass: 2598.4223
Molecular Weight: 2600.0840

The compound **195** was obtained as a white powder (1.8 mg, 99%) from the peptide **179** (1.6 mg, 0.7 µmol) and methyltetrazine-NHS ester (0.2 mg, 0.7 µmol) following the general procedure 8.12. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 6.1 min, calcd. for $C_{127}H_{200}N_{19}O_{38}$: 520.80 $[M+4H]^{4+}$, 867.15 $[M+3H]^{3+}$, 1300.22 $[M+2H]^{2+}$, 2599.43 $[M+H]^+$, found: 520.80, 867.20 and 1300.20.

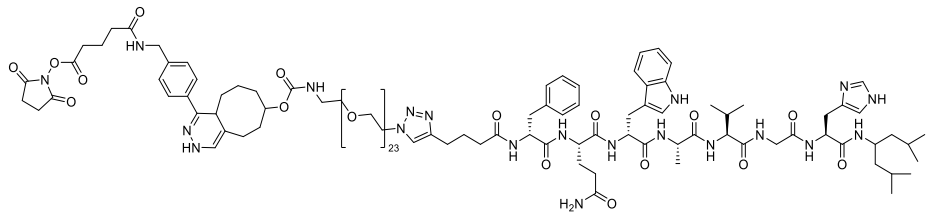
NHS-CO_2-$(CH_2)_3$-CONH-CH_2-Ph-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG_3-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A (196)



Chemical Formula: $C_{91}H_{126}N_{20}O_{19}$
Exact Mass: 1802.9508
Molecular Weight: 1804.1300

The compound **196** was obtained as a white powder (1.3 mg, 99%) from the peptide **178** (1.0 mg, 0.7 µmol) and 2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl 5-[4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzylamino]-5-oxopentanoate (0.3 mg, 0.7 µmol) following the general procedure 8.12. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.1 min, calcd. for $C_{91}H_{127}N_{20}O_{19}$: 601.99 $[M+3H]^{3+}$, 902.48 $[M+2H]^{2+}$, 1803.96 $[M+H]^+$, found: 604.60, 904.90 and 1804.80.

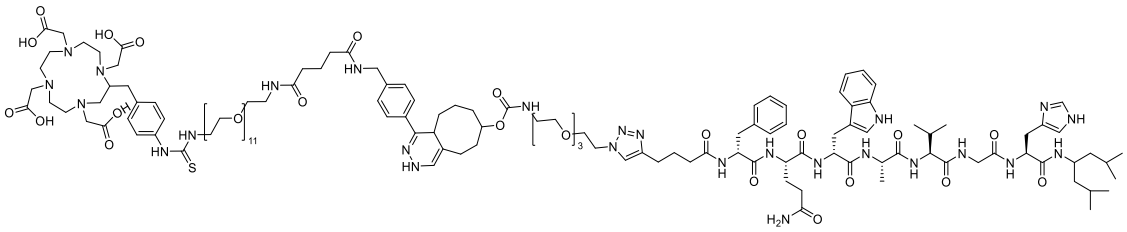
NHS-CO_2-$(CH_2)_3$-CONH-CH_2-Ph-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG_{23}-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A (197)



Chemical Formula: $C_{131}H_{206}N_{20}O_{39}$
Exact Mass: 2683.4751
Molecular Weight: 2685.1900

The compound **197** was obtained as a white powder (1.9 mg, 99%) from the peptide **179** (1.6 mg, 0.7 µmol) and 2,5-Dioxo-1-pyrrolidinyl 5-[4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzylamino]-5-oxopentanoate (0.3 mg, 0.7 µmol) following the general procedure 8.12. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.7 min, calcd. for $C_{131}H_{207}N_{20}O_{39}$: 895.50 $[M+3H]^{3+}$, 1342.74 $[M+2H]^{2+}$, 2684.48 $[M+H]^+$, found: 895.50 and 1342.00.

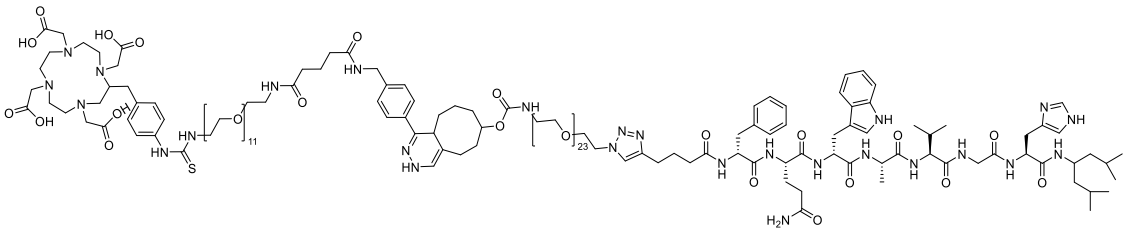
DOTA-PEG_{11}-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG_3-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A (199)



Chemical Formula: $C_{135}H_{206}N_{26}O_{35}S$
Exact Mass: 2783.4860
Molecular Weight: 2785.3400

The compound **199** was purified by preparative HPLC (Conditions 1: t_R = 5.9 min) and isolated as a white powder (1.9 mg, 99%) from the peptide **178** (1.0 mg, 0.7 µmol) and DOTA-PEG_{11}-Tz (0.2 mg, 0.7 µmol) following the general procedure 8.12. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.2 min, calcd. for $C_{135}H_{207}N_{26}O_{35}S$: 928.84 $[M+3H]^{3+}$, 1392.75 $[M+2H]^{2+}$, 2784.49 $[M+H]^+$, found: 928.50 and 1392.70.

DOTA-PEG_{11}-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG_{23}-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-$(CH_2)_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A (200)

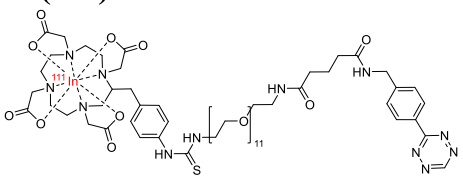


Chemical Formula: $C_{175}H_{286}N_{26}O_{55}S$
Exact Mass: 3664.0103
Molecular Weight: 3666.4000

The compound **200** was purified by preparative HPLC (Conditions 1: t_R = 7.6 min) and isolated as a white powder (2.5 mg, 99%) from the peptide **179** (1.6 mg, 0.7 µmol) and DOTA-PEG_{11}-Tz (0.2 mg, 0.7 µmol) following the general procedure 8.12. **LC-MS** (ESI^+): t_R = 4.4

min, calcd. for $C_{175}H_{287}N_{26}O_{55}S$: 367.41 $[M+10H]^{10+}$, 408.12 $[M+9H]^{9+}$, 459.01 $[M+8H]^{8+}$, 524.44 $[M+7H]^{7+}$, 611.68 $[M+6H]^{6+}$, 733.81 $[M+5H]^{5+}$, 917.01 $[M+4H]^{4+}$, 1222.34 $[M+3H]^{3+}$, 1833.01 $[M+2H]^{2+}$, 3665.02 $[M+H]^{+}$, found: 367.50, 408.00, 459.70, 524.20, 611.60, 733.80, 917.00, 1222.00 and 1835.00.

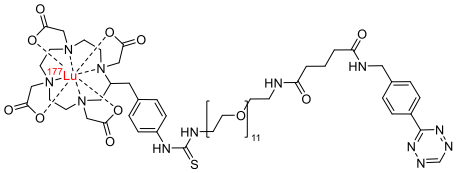
[^{111}In]DOTA-PEG$_{11}$-Tz (201)



Chemical Formula: $C_{62}H_{94}{}^{111}InN_{12}O_{21}S$
Exact Mass: 1485.5428
Molecular Weight: 1486.4621

The compound **201** was purified by semi-preparative HPLC (Conditions 5: t_R = 16.1 min) and collected (RCY 99%, RCP > 98%) from the DOTA-PEG$_{11}$-Tz (1.38 µg/µL, 1.0 mM, 1.0 µL, 1.0 nmol) and [^{111}In]InCl$_3$ (13.3 MBq, 0.6 MBq/µL, 16.2 µL) following the general procedure 8.14.1. **Analytical HPLC** (Conditions 3): t_R = 14.9 min; (Conditions 4): t_R = 17.2 min.

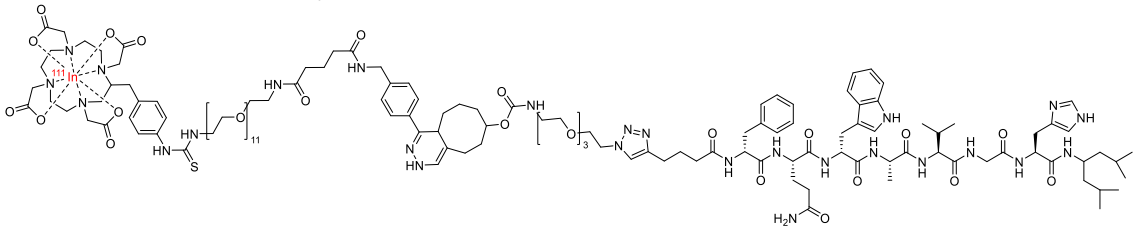
[^{177}Lu]Lu-DOTA-PEG$_{11}$-Tz (202)



Chemical Formula: $C_{62}H_{94}{}^{177}LuN_{12}O_{21}S$
Exact Mass: 1551.5815
Molecular Weight: 1552.5008

The compound **202** was purified by semi-preparative HPLC (Conditions 5: t_R = 16.0 min) and collected (RCY 98%, RCP > 98%) from the DOTA-PEG$_{11}$-Tz (1.38 µg/µL, 1.0 mM, 1.0 µL, 1.0 nmol) and [^{177}Lu]LuCl$_3$ (31.7 MBq, 12.9 MBq/µL, 2.5 µL) following the general procedure 8.14.1. **Analytical HPLC** (Conditions 3): t_R = 14.8 min; (Conditions 4): t_R = 17.3 min.

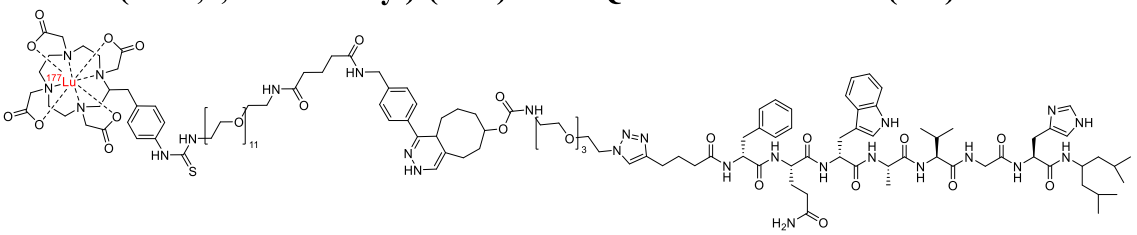
[^{111}In]DOTA-PEG$_{11}$-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG$_3$-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-(CH$_2$)$_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A (204)



Chemical Formula: $C_{135}H_{202}{}^{111}InN_{26}O_{35}S$
Exact Mass: 2890.3598
Molecular Weight: 2892.2131

The compound **204** was obtained in colorless solution (RCY 99%, RCP > 98%) from the peptide **178** (2.3 µg/µL, 1.0 mM, 1.0 µL, 1.0 nmol) and the labelled tetrazine **201** (13.3 MBq, 135 µL) following the general procedure 8.14.2. **Analytical HPLC** (Conditions 3): t_R = 5.1 min; (Conditions 4): t_R = 4.7 min.

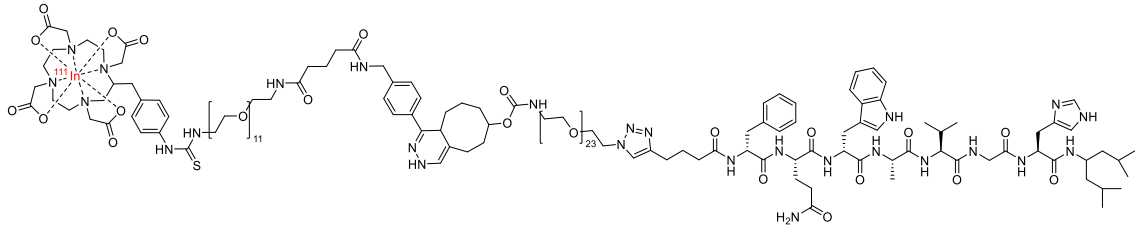
[^{177}Lu]Lu-DOTA-PEG$_{11}$-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG$_3$-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-(CH$_2$)$_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A (205)



Chemical Formula: $C_{135}H_{202}{}^{177}LuN_{26}O_{35}S$
Exact Mass: 2956.3984
Molecular Weight: 2958.2518

The compound **205** was obtained in colorless solution (RCY 99%, RCP > 98%) from the peptide **178** (2.3 µg/µL, 1.0 mM, 1.0 µL, 1.0 nmol) and the labelled tetrazine **202** (13.0 MBq, 135 µL) following the general procedure 8.14.2. **Analytical HPLC** (Conditions 3): t_R = 5.1 min; (Conditions 4): t_R = 4.7 min.

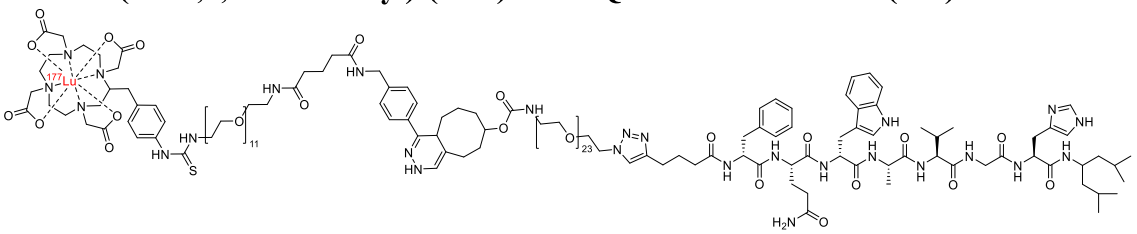
[^{111}In]DOTA-PEG$_{11}$-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG$_{23}$-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-(CH$_2$)$_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A (206)



Chemical Formula: $C_{175}H_{282}{}^{111}InN_{26}O_{55}S$
Exact Mass: 3770.8841
Molecular Weight: 3773.2731

The compound **206** was obtained in colorless solution (RCY 99%, RCP > 98%) from the peptide **179** (2.3 µg/µL, 1.0 mM, 1.0 µL, 1.0 nmol) and the labelled tetrazine **201** (17.3 MBq, 135 µL) following the general procedure 8.14.2. **Analytical HPLC** (Conditions 3): t_R = 8.3 min; (Conditions 4): t_R = 8.1 min.

[^{177}Lu]Lu-DOTA-PEG$_{11}$-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-ol-NH-PEG$_{23}$-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-(CH$_2$)$_3$-NH-fQWAVGH-DMH4A (207)



Chemical Formula: $C_{175}H_{282}{}^{177}LuN_{26}O_{55}S$
Exact Mass: 3836.9227
Molecular Weight: 3839.3118

The compound **207** was obtained in colorless solution (RCY 99%, RCP > 98%) from the peptide **179** (2.3 µg/µL, 1.0 mM, 1.0 µL, 1.0 nmol) and the labelled tetrazine **202** (13.0 MBq, 135 µL) following the general procedure 8.14.2. **Analytical HPLC** (Conditions 3): t_R = 8.3 min; (Conditions 4): t_R = 8.1 min.

Bibliographie

Bibliographie

[1] [Découverte de la réaction de décomposition et de recombinaison de l'eau], *Traité élémentaire de chimie*, présenté dans un ordre nouveau, et d'après les découvertes modernes avec figures ; par M. Antoine-Laurent de Lavoisier (1743-1794), à Paris, chez Cuchet, Librairie, rue & hôtel Serpente, M. DCC. LXXXIX, folio page 101 (consulté le 01/02/2022, https ://gallica.bnf.fr/ark :/12148/btv1b8615746s/f161.item).

A. Chapitre 1

[2] Anderson, C. J.; Welch, M. J. Radiometal-Labeled Agents (Non-Technetium) for Diagnostic Imaging. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (9), 2219–2234. https://doi.org/10.1021/cr980451q.

[3] Pichler, V.; Berroterán-Infante, N.; Philippe, C.; Vraka, C.; Klebermass, E.-M.; Balber, T.; Pfaff, S.; Nics, L.; Mitterhauser, M.; Wadsak, W. An Overview of PET Radiochemistry, Part 1: The Covalent Labels ^{18}F, ^{11}C, and ^{13}N. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (9), 1350–1354. https://doi.org/10.2967/jnumed.117.190793.

[4] Boros, E.; Packard, A. B. Radioactive Transition Metals for Imaging and Therapy. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 870–901. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00281.

[5] James, M. L.; Gambhir, S. S. A Molecular Imaging Primer: Modalities, Imaging Agents, and Applications. *Physiol. Rev.* **2012**, *92* (2), 897–965. https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2010.

[6] Ziegler, S. I. Positron Emission Tomography: Principles, Technology, and Recent Developments. *Nucl. Phys. A* **2005**, *752* (1), 679–687. https://doi.org/10.1016/j.nuclphysa.2005.02.067.

[7] Levin, C. S. Primer on Molecular Imaging Technology. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2005**, *32* (2), S325–S345. https://doi.org/10.1007/s00259-005-1973-y.

[8] L. Pimlott, S.; Sutherland, A. Molecular Tracers for the PET and SPECT Imaging of Disease. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (1), 149–162. https://doi.org/10.1039/B922628C.

[9] Wilder, R. B.; Shen, S.; DeNardo, G. L. Dosimetry for Radioimmunotherapy: A Rapidly Evolving Field. *Cancer Biother. Radiopharm.* **1999**, *14* (2), 67–70. https://doi.org/10.1089/cbr.1999.14.67.

[10] Ehrlich, P. On Immunity with Special Reference to Cell Life. *Croonian Lecture*, **1900**. *The Collected Papers of Paul Ehrlich* **1957**, *2* (1), 178–195. ; Ehrlich, P. On Immunity with Special Reference to Cell Life. *Croonian Lecture*, *Proc. R. Soc. Lond.* **1900**, *66* (1), 424–448. https://doi.org/10.1098/rspl.1899.0121.

[11] Bournaud, C.; Lombard-Bohas, C.; Habouzit, V.; Carlier, T.; Hindié, E.; Ansquer, C. La radiothérapie interne vectorisée par les analogues de la somatostatine, en pratique, en 2019. *Med. Nucleaire* **2019**, *43* (3), 251–266. https://doi.org/10.1016/j.mednuc.2019.04.001.

[12] Guillaume, M.; Luxen, A.; Nebeling, B.; Argentini, M.; Clark, J. C.; Pike, V. W. Recommendations for Fluorine-18 Production. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. A. Appl. Radiat. Isot.* **1991**, *42* (8), 749–762. https://doi.org/10.1016/0883-2889(91)90179-5.

[13] Stimson, D. H. R.; Qiao, Z.; Reutens, D. C.; Venkatachalam, T. K.; Bhalla, R. Investigation on the Impact of Three Different Quaternary Methyl Ammonium Cartridges on the Radiosynthetic Yields of [^{18}F]Fluoromethyl Tosylate. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **2019**, *62* (9), 588–595. https://doi.org/10.1002/jlcr.3781.

[14] Verhoog, S.; Brooks, A.; Mossine, A.; Sanford, M.; Scott, P. Determination of Efficiency of [^{18}F]Fluoride Recovery From a QMA Cartridge Using Acidic Elution Media. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (1), 1064–1064.

[15] Jewett, D. M.; Toorongian, S. A.; Mulholland, G. K.; Watkins, G. L.; Kilbourn, M. R. Multiphase Extraction: Rapid Phase-Transfer of [^{18}F]Fluoride Ion for Nucleophilic Radiolabeling Reactions. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. A. Appl. Radiat. Isot.* **1988**, *39* (11), 1109–1111. https://doi.org/10.1016/0883-2889(88)90001-9.

[16] Dollé, F.; Roeda, D.; Kuhnast, B.; Lasne, M. Chapter 1 - Fluorine-18 Chemistry for Molecular Imaging with Positron Emission Tomography. *In Fluorine and Health*; Tressaud, A., Ed.; Elsevier: Amsterdam, **2008**, 3–65. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53086-8.00001-1.

[17] Mukherjee, J.; Yang, Z.-Y.; Das, M. K.; Brown, T. Fluorinated Benzamide Neuroleptics—III. Development of (S)-N-[(1-Allyl-2-Pyrrolidinyl)Methyl]-5-(3-[^{18}F]Fluoropropyl)-2,3-Dimethoxybenzamide as an Improved Dopamine D-2 Receptor Tracer. *Nucl. Med. Biol.* **1995**, *22* (3), 283–296. https://doi.org/10.1016/0969-8051(94)00117-3.

[18] Grierson, J. R.; Shields, A. F. Radiosynthesis of 3′-Deoxy-3′-[^{18}F]Fluorothymidine: [^{18}F]FLT for Imaging of Cellular Proliferation in Vivo. *Nucl. Med. Biol.* **2000**, *27* (2), 143–156. https://doi.org/10.1016/S0969-8051(99)00104-3.

[19] Oh, S. J.; Mosdzianowski, C.; Chi, D. Y.; Kim, J. Y.; Kang, S. H.; Ryu, J. S.; Yeo, J. S.; Moon, D. H. Fully Automated Synthesis System of 3′-Deoxy-3′-[^{18}F]Fluorothymidine. *Nucl. Med. Biol.* **2004**, *31* (6), 803–809. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2004.01.008.

[20] Hamacher, K.; Coenen, H. H.; Stöcklin, G. Efficient Stereospecific Synthesis of No-Carrier-Added 2-[^{18}F]-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose Using Aminopolyether Supported Nucleophilic Substitution. *J. Nucl. Med.* **1986**, *27* (2), 235–238.

[21] Park, H. K.; Kim, J. S.; Im, K. C.; Oh, S. J.; Kim, M. J.; Lee, J.-H.; Chung, S. J.; Lee, M. C. Functional Brain Imaging in Pure Akinesia with Gait Freezing: [^{18}F] FDG PET and [^{18}F] FP-CIT PET Analyses. *J. Mov. Disord.* **2009**, *24* (2), 237–245. https://doi.org/10.1002/mds.22347.

[22] Ermert, J. ^{18}F-Labelled Intermediates for Radiosynthesis by Modular Build-Up Reactions: Newer Developments. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014* (1), e812973–e812989. https://doi.org/10.1155/2014/812973.

[23] Kämäräinen, E.-L.; Kyllönen, T.; Nihtilä, O.; Björk, H.; Solin, O. Preparation of Fluorine-18-Labelled Fluoromisonidazole Using Two Different Synthesis Methods. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **2004**, *47* (1), 37–45. https://doi.org/10.1002/jlcr.795.

[24] DeGrado, T. R.; Baldwin, S. W.; Wang, S.; Orr, M. D.; Liao, R. P.; Friedman, H. S.; Reiman, R.; Price, D. T.; Coleman, R. E. Synthesis and Evaluation of ^{18}F-Labeled Choline Analogs as Oncologic PET Tracers. *J. Nucl. Med.* **2001**, *42* (12), 1805–1814.

[25] Dollé, F.; Dolci, L.; Valette, H.; Hinnen, F.; Vaufrey, F.; Guenther, I.; Fuseau, C.; Coulon, C.; Bottlaender, M.; Crouzel, C. Synthesis and Nicotinic Acetylcholine Receptor in Vivo Binding Properties of 2-Fluoro-3-[2(S)-2-Azetidinylmethoxy]Pyridine: A New Positron Emission Tomography Ligand for Nicotinic Receptors. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (12), 2251–2259. https://doi.org/10.1021/jm9910223.

[26] Kilbourn, M. R.; Welch, M. J.; Dence, C. S.; Tewson, T. J.; Saji, H.; Maeda, M. Carrier-Added and No-Carrier-Added Syntheses of [^{18}F]Spiroperidol and [^{18}F]Haloperidol. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1984**, *35* (7), 591–598. https://doi.org/10.1016/0020-708X(84)90101-7.

[27] Angelini, G.; Speranza, M.; Wolf, A. P.; Shiue, C.-Y. Nucleophilic Aromatic Substitution of Activated Cationic Groups by ^{18}F-Labeled Fluoride. A Useful Route to No-Carrier-Added (NCA) ^{18}F-Labeled Aryl Fluorides. *J. Fluorine Chem.* **1985**, *27* (2), 177–191. https://doi.org/10.1016/S0022-1139(00)84987-8.

[28] Ross, T. L.; Ermert, J.; Hocke, C.; Coenen, H. H. Nucleophilic ^{18}F-Fluorination of Heteroaromatic Iodonium Salts with No-Carrier-Added [^{18}F]Fluoride. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (25), 8018–8025. https://doi.org/10.1021/ja066850h.

[29] Pike, V. W.; Aigbirhio, F. I. Reactions of Cyclotron-Produced [^{18}F]Fluoride with Diaryliodonium Salts—a Novel Single-Step Route to No-Carrier-Added [^{18}F]Fluoroarenes. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, *21* (1), 2215–2216. https://doi.org/10.1039/C39950002215.

[30] 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. ^{18}F-Labelling of Electron Rich Iodonium Ylides: Application to the Radiosynthesis of Potential 5-HT2A Receptor PET Ligands. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (20), 4351–4358. https://doi.org/10.1039/C7OB00628D.

[31] 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. A Facile Radiolabeling of [^{18}F]FDPA via Spirocyclic Iodonium Ylides: Preliminary PET Imaging Studies in Preclinical Models of Neuroinflammation. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (12), 5222–5227. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00432.

[32] Brown, J. M.; Gouverneur, V. Transition-Metal-Mediated Reactions for C-F Bond Construction: The State of Play. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2009**, *48* (46), 8610–8614. https://doi.org/10.1002/anie.200902121.

[33] Mossine, A. V.; Brooks, A. F.; Makaravage, K. J.; Miller, J. M.; Ichiishi, N.; Sanford, M. S.; Scott, P. J. H. Synthesis of [^{18}F]Arenes via the Copper-Mediated [^{18}F]Fluorination of Boronic Acids. *Org. Lett.* **2015**, *17* (23), 5780–5783. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b02875.

[34] R. Brandt, J.; Lee, E.; B. Boursalian, G.; Ritter, T. Mechanism of Electrophilic Fluorination with Pd(Iv): Fluoride Capture and Subsequent Oxidative Fluoride Transfer. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (1), 169–179. https://doi.org/10.1039/C3SC52367E.

[35] Littich, R.; Scott, P. J. H. Novel Strategies for Fluorine-18 Radiochemistry. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2012**, *51* (5), 1106–1109. https://doi.org/10.1002/anie.201106785.

[36] Cardinale, J.; Ermert, J. Simplified Synthesis of Aryliodonium Ylides by a One-Pot Procedure. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54* (16), 2067–2069. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.02.018.

[37] Ren, H.; Wey, H.-Y.; Strebl, M.; Neelamegam, R.; Ritter, T.; Hooker, J. M. Synthesis and Imaging Validation of [^{18}F]MDL100907 Enabled by Ni-Mediated Fluorination. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5* (7), 611–615. https://doi.org/10.1021/cn500078e.

[38] Garnett, E. S.; Firnau, G.; Nahmias, C. Dopamine Visualized in the Basal Ganglia of Living Man. *Nature* **1983**, *305* (5930), 137–138. https://doi.org/10.1038/305137a0.

[39] Dolle, F.; Demphel, S.; Hinnen, F.; Fournier, D.; Vaufrey, F.; Crouzel, C. 6-[^{18}F]Fluoro-L-DOPA by Radiofluorodestannylation: A Short and Simple Synthesis of a New Labelling Precursor. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **1998**, *41* (2), 105–114. https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1344(199802)41:2<105::AID-JLCR65>3.0.CO;2-H.

[40] Liao, G. J.; Clark, A. S.; Schubert, E. K.; Mankoff, D. A. ^{18}F-Fluoroestradiol PET: Current Status and Potential Future Clinical Applications. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57* (8), 1269–1275. https://doi.org/10.2967/jnumed.116.175596.

[41] Vali, R.; Loidl, W.; Pirich, C.; Langesteger, W.; Beheshti, M. Imaging of Prostate Cancer with PET/CT Using ^{18}F-Fluorocholine. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2015**, *5* (2), 96–108. PMCID: PMC4396012.

[42] Kluijfhout, W. P.; Vriens, M. R.; BorelRinkes, I. H. M.; de Keizer, B. ^{18}F-fluorocholine PET-CT scan effective in localising pathological parathyroid glands]. *Ned. Tijdschr. Geneeskd.* **2021**, *165* (1), D5468–D5478. PMCID: 34346587.

[43] Weber, D. C.; Zilli, T.; Buchegger, F.; Casanova, N.; Haller, G.; Rouzaud, M.; Nouet, P.; Dipasquale, G.; Ratib, O.; Zaidi, H.; Vees, H.; Miralbell, R. [^{18}F]Fluoroethyltyrosine- Positron Emission Tomography-Guided Radiotherapy for High-Grade Glioma. *Radiat. Oncol.* **2008**, *3* (1), 44–55. https://doi.org/10.1186/1748-717X-3-44.

[44] Nikaki, A.; Angelidis, G.; Efthimiadou, R.; Tsougos, I.; Valotassiou, V.; Fountas, K.; Prasopoulos, V.; Georgoulias, P. ^{18}F-Fluorothymidine PET Imaging in Gliomas: An Update. *Ann. Nucl. Med.* **2017**, *31* (7), 495–505. https://doi.org/10.1007/s12149-017-1183-2.

[45] Glaser, M.; Luthra, S. K.; Brady, F. Applications of Positron-Emitting Halogens in PET Oncology (Review). *Int. J. Oncol.* **2003**, *22* (2), 253–267. https://doi.org/10.3892/ijo.22.2.253.

[46] Kettenbach, K.; Schieferstein, H.; Ross, T. L. ^{18}F-Labeling Using Click Cycloadditions. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014* (1), e361329-e361346. https://doi.org/10.1155/2014/361329.

[47] Jacobson, O.; Kiesewetter, D. O.; Chen, X. Fluorine-18 Radiochemistry, Labeling Strategies and Synthetic Routes. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26* (1), 1–18. https://doi.org/10.1021/bc500475e.

[48] Campbell, M. G.; Mercier, J.; Genicot, C.; Gouverneur, V.; Hooker, J. M.; Ritter, T. Bridging the Gaps in ^{18}F PET Tracer Development. *Nat. Chem.* **2017**, *9* (1), 1–3. https://doi.org/10.1038/nchem.2693.

[49] Nerella, S. G.; Bhattacharya, A.; Thacker, P. S.; Tulja, S. Synthetic Methodologies and PET Imaging Applications of Fluorine-18 Radiotracers: A Patent Review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2022**, *32* (4), 455–473. https://doi.org/10.1080/13543776.2022.2032649.

[50] Chansaenpak, K.; Vabre, B.; Gabbaï, F. P. [^{18}F]-Group 13 Fluoride Derivatives as Radiotracers for Positron Emission Tomography. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (4), 954–971. https://doi.org/10.1039/C5CS00687B.

[51] Lin, K.-S.; Benard, F.; Perrin, D. M. 14 - Organoboronates: Captors of ^{18}F-Fluoride for One-Step Radiofluorination of Biomolecules. *In Fluorine in Life Sciences: Pharmaceuticals, Medicinal Diagnostics, and Agrochemicals*; Haufe, G., Leroux, F. R., Eds.; Progress in Fluorine Science; Academic Press, **2019**, 519–549. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812733-9.00014-3.

[52] Nelissen, N.; Laere, K. V.; Thurfjell, L.; Owenius, R.; Vandenbulcke, M.; Koole, M.; Bormans, G.; Brooks, D. J.; Vandenberghe, R. Phase 1 Study of the Pittsburgh Compound B Derivative ^{18}F-Flutemetamol in Healthy Volunteers and Patients with Probable Alzheimer Disease. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50* (8), 1251–1259. https://doi.org/10.2967/jnumed.109.063305.

[53] Quintela-Fandino, M.; Lluch, A.; Manso, L.; Calvo, I.; Cortes, J.; García-Saenz, J. A.; Gil-Gil, M.; Martinez-Jánez, N.; Gonzalez-Martin, A.; Adrover, E.; de Andres, R.; Viñas, G.; Llombart-Cussac, A.; Alba, E.; Guerra, J.; Bermejo, B.; Zamora, E.; Moreno-Anton, F.; Pernas Simon, S.; Carrato, A.; Lopez-Alonso, A.; Escudero, M. J.; Campo, R.; Carrasco, E.; Palacios, J.; Mulero, F.; Colomer, R. ^{18}F-Fluoromisonidazole PET and Activity of Neoadjuvant Nintedanib in Early HER2-Negative Breast Cancer: A Window-of-Opportunity Randomized Trial. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23* (6), 1432–1441. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0738.

[54] Wängler, C.; Kostikov, A.; Zhu, J.; Chin, J.; Wängler, B.; Schirrmacher, R. Silicon-[^{18}F]Fluorine Radiochemistry: Basics, Applications and Challenges. *Appl. Sci.* **2012**, *2* (2), 277–302. https://doi.org/10.3390/app2020277.

[55] Archibald, S. J.; Allott, L. The Aluminium-[^{18}F]Fluoride Revolution: Simple Radiochemistry with a Big Impact for Radiolabelled Biomolecules. *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2021**, *6* (1), 30–58. https://doi.org/10.1186/s41181-021-00141-0.

[56] Way, J.; Wuest, F. Fully Automated Synthesis of 4-[^{18}F]Fluorobenzylamine Based on Borohydride/NiCl2 Reduction. *Nucl. Med. Biol.* **2013**, *40* (3), 430–436. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2012.11.010.

[57] Bernard-Gauthier, V.; Lepage, M. L.; Waengler, B.; Bailey, J. J.; Liang, S. H.; Perrin, D. M.; Vasdev, N.; Schirrmacher, R. Recent Advances in ^{18}F Radiochemistry: A Focus on B-^{18}F, Si-^{18}F, Al-^{18}F, and C-^{18}F Radiofluorination via Spirocyclic Iodonium Ylides. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (4), 568–572. https://doi.org/10.2967/jnumed.117.197095.

[58] Bohn, P.; Deyine, A.; Azzouz, R.; Bailly, L.; Fiol-Petit, C.; Bischoff, L.; Fruit, C.; Marsais, F.; Vera, P. Design of Silicon-Based Misonidazole Analogues and ^{18}F-Radiolabelling. *Nucl. Med. Biol.* **2009**, *36* (8), 895–905. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2009.06.004.

[59] Aluicio-Sarduy, E.; Ellison, P. A.; Barnhart, T. E.; Cai, W.; Nickles, R. J.; Engle, J. W. PET Radiometals for Antibody Labeling. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **2018**, *61* (9), 636–651. https://doi.org/10.1002/jlcr.3607.

[60] Pretze, M.; Pietzsch, D.; Mamat, C. Recent Trends in Bioorthogonal Click-Radiolabeling Reactions Using Fluorine-18. *Molecules* **2013**, *18* (7), 8618–8665. https://doi.org/10.3390/molecules18078618.

[61] Ishikawa, E. 8 - Labeling of Antibodies and Antigens. *In Immunoassay*; Diamandis, E. P., Christopoulos, T. K., Eds.; Academic Press: San Diego, **1996**, 191–204. https://doi.org/10.1016/B978-012214730-2/50009-1.

[62] Talip, Z.; Favaretto, C.; Geistlich, S.; Meulen, N. P. van der. A Step-by-Step Guide for the Novel Radiometal Production for Medical Applications: Case Studies with ^{68}Ga, ^{44}Sc, ^{177}Lu and ^{161}Tb. *Molecules* **2020**, *25* (4), 966–995. https://doi.org/10.3390/molecules25040966.

[63] Kazakov, A. G.; Ekatova, T. Y.; Babenya, J. S. Photonuclear Production of Medical Radiometals: A Review of Experimental Studies. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2021**, *328* (2), 493–505. https://doi.org/10.1007/s10967-021-07683-2.

[64] Do Carmo, S. J. C.; Scott, P. J. H.; Alves, F. Production of Radiometals in Liquid Targets. *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2020**, *5* (1), 2–23. https://doi.org/10.1186/s41181-019-0088-x.

[65] M. Rey, A. Radiometal Complexes in Molecular Imaging and Therapy. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17* (31), 3673–3683. https://doi.org/10.2174/092986710793213733.

[66] Deng, H.; Wang, H.; Li, Z. Matching Chelators to Radiometals for Positron Emission Tomography Imaging- Guided Targeted Drug Delivery. *Curr. Drug Targets* **2015**, *16* (6), 610–624. https://doi.org/10.2174/1389450116666150707100702.

[67] Price, E. W.; Orvig, C. Matching Chelators to Radiometals for Radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *43* (1), 260–290. https://doi.org/10.1039/C3CS60304K.

[68] Pandey, M. K.; DeGrado, T. R. Cyclotron Production of PET Radiometals in Liquid Targets: Aspects and Prospects. *Curr. Radiopharm.* **2021**, *14* (4), 325–339. https://doi.org/10.2174/1874471013999200820165734.

[69] Kostelnik, T. I.; Orvig, C. Radioactive Main Group and Rare Earth Metals for Imaging and Therapy. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 902–956. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00294.

[70] Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson, C. J. Coordinating Radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium, and Zirconium for PET and SPECT Imaging of Disease. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2858–2902. https://doi.org/10.1021/cr900325h.

[71] Sartor, O.; de Bono, J.; Chi, K. N.; Fizazi, K.; Herrmann, K.; Rahbar, K.; Tagawa, S. T.; Nordquist, L. T.; Vaishampayan, N.; El-Haddad, G.; Park, C. H.; Beer, T. M.; Armour, A.; Pérez-Contreras, W. J.; DeSilvio, M.; Kpamegan, E.; Gericke, G.; Messmann, R. A.; Morris, M. J.; Krause, B. J. Lutetium-177–PSMA-617 for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385* (12), 1091–1103. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107322.

[72] Zhang, J.; Li, D.; Lang, L.; Zhu, Z.; Wang, L.; Wu, P.; Niu, G.; Li, F.; Chen, X. ^{68}Ga-NOTA-Aca-BBN(7–14) PET/CT in Healthy Volunteers and Glioma Patients. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57* (1), 9–14. https://doi.org/10.2967/jnumed.115.165316.

[73] Vallabhajosula, S.; Kuji, I.; Hamacher, K. A.; Konishi, S.; Kostakoglu, L.; Kothari, P. A.; Milowski, M. I.; Nanus, D. M.; Bander, N. H.; Goldsmith, S. J. Pharmacokinetics and Biodistribution of ^{111}In- and ^{177}Lu-Labeled J591 Antibody Specific for Prostate-Specific Membrane Antigen: Prediction of ^{90}Y-J591 Radiation Dosimetry Based on ^{111}In or ^{177}Lu? *J. Nucl. Med.* **2005**, *46* (4), 634–641.

[74] Marques, F.; Gano, L.; Campello, M. P.; Lacerda, S.; Santos, I. Biological Evaluation of ^{153}Sm and ^{166}Ho Complexes with Tetraazamacrocycles Containing Methylcarboxylate and/or Methylphosphonate Pendant Arms. *Radiochim. Acta* **2007**, *95* (6), 335–341. https://doi.org/10.1524/ract.2007.95.6.335.

[75] Cooper, G. J. S.; Young, A. A.; Gamble, G. D.; Occleshaw, C. J.; Dissanayake, A. M.; Cowan, B. R.; Brunton, D. H.; Baker, J. R.; Phillips, A. R. J.; Frampton, C. M.; Poppitt, S. D.; Doughty, R. N. A Copper(II)-Selective Chelator Ameliorates Left-Ventricular Hypertrophy in Type 2 Diabetic Patients: A Randomised Placebo-Controlled Study. *Diabetologia* **2009**, *52* (4), 715–722. https://doi.org/10.1007/s00125-009-1265-3.

[76] Ali, S. K. I.; Khandaker, M. U.; Al-mugren, K. S.; Latif, Sk. A.; Bradley, D. A.; Okhunov, A. A.; Sulieman, A. Evaluation of Production Cross-Sections for Theranostic ^{67}Cu

Radionuclide via Proton-Induced Nuclear Reaction on ^{68}Zn Target. *Appl. Radiat. Isot.* **2021**, *173* (1), 109735–109746. https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2021.109735.

[77] Ballal, S.; Yadav, M. P.; Moon, E. S.; Kramer, V. S.; Roesch, F.; Kumari, S.; Bal, C. First-In-Human Results on the Biodistribution, Pharmacokinetics, and Dosimetry of [^{177}Lu]Lu-DOTA.SA.FAPi and [^{177}Lu]Lu-DOTA-GA.(SA.FAPi)$_2$. *Pharmaceuticals* **2021**, *14* (12), 1212-1230. https://doi.org/10.3390/ph14121212.

[78] Gupta, S.; Batra, S.; Jain, M. Antibody Labeling with Radioiodine and Radiometals. *In Drug Delivery System*; Jain, K. K., Ed.; *Methods in Molecular Biology*; Springer: New York, NY, **2014**, 147–157. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0363-4_9.

[79] Roehn, U.; Becaud, J.; Mu, L.; Srinivasan, A.; Stellfeld, T.; Fitzner, A.; Graham, K.; Dinkelborg, L.; Schubiger, A. P.; Ametamey, S. M. Nucleophilic Ring-Opening of Activated Aziridines: A One-Step Method for Labeling Biomolecules with Fluorine-18. *J. Fluorine Chem.* **2009**, *130* (10), 902–912. https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2009.07.003.

[80] Becaud, J.; Mu, L.; Karramkam, M.; Schubiger, P. A.; Ametamey, S. M.; Graham, K.; Stellfeld, T.; Lehmann, L.; Borkowski, S.; Berndorff, D.; Dinkelborg, L.; Srinivasan, A.; Smits, R.; Koksch, B. Direct One-Step ^{18}F-Labeling of Peptides via Nucleophilic Aromatic Substitution. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20* (12), 2254–2261. https://doi.org/10.1021/bc900240z.

[81] Schirrmacher, R.; Bradtmöller, G.; Schirrmacher, E.; Thews, O.; Tillmanns, J.; Siessmeier, T.; Buchholz, H. G.; Bartenstein, P.; Wängler, B.; Niemeyer, C. M.; Jurkschat, K. ^{18}F-Labeling of Peptides by Means of an Organosilicon-Based Fluoride Acceptor. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2006**, *45* (36), 6047–6050. https://doi.org/10.1002/anie.200600795.

[82] Ting, R.; Adam, M. J.; Ruth, T. J.; Perrin, D. M. Arylfluoroborates and Alkylfluorosilicates as Potential PET Imaging Agents: High-Yielding Aqueous Biomolecular ^{18}F-Labeling. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (38), 13094–13095. https://doi.org/10.1021/ja053293a.

[83] Liu, Z.; Pourghiasian, M.; Radtke, M. A.; Lau, J.; Pan, J.; Dias, G. M.; Yapp, D.; Lin, K.-S.; Bénard, F.; Perrin, D. M. An Organotrifluoroborate for Broadly Applicable One-Step ^{18}F-Labeling. *Angew. Chem.* **2014**, *126* (44), 12070–12074. https://doi.org/10.1002/ange.201406258.

[84] 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. A Novel Method of ^{18}F Radiolabeling for PET. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50* (6), 991–998. https://doi.org/10.2967/jnumed.108.060418.

[85] McKay, C. S.; Finn, M. G. Click Chemistry in Complex Mixtures: Bioorthogonal Bioconjugation. *Chem. Biol.* **2014**, *21* (9), 1075–1101. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.09.002.

[86] Wu, Z.; Li, L.; Liu, S.; Yakushijin, F.; Yakushijin, K.; Horne, D.; Conti, P. S.; Li, Z.; Kandeel, F.; Shively, J. E. Facile Preparation of a Thiol-Reactive ^{18}F-Labeling Agent and

Synthesis of ^{18}F-DEG-VS-NT for PET Imaging of a Neurotensin Receptor–Positive Tumor. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55* (7), 1178–1184. https://doi.org/10.2967/jnumed.114.137489.

[87] Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. The Growing Impact of Click Chemistry on Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2003**, *8* (24), 1128–1137. https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02933-7.

[88] Hartmuth C. Kolb, M. G. Finn, and K. Barry Sharpless, Reactions Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good, *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2001**, *40* (1), 2004 –2021.

[89] Marik, J.; Sutcliffe, J. L. Click for PET: Rapid Preparation of [^{18}F]Fluoropeptides Using CuI Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloaddition. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (37), 6681–6684. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.06.176.

[90] Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021. https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5.

[91] Nwe, K.; Brechbiel, M. W. Growing Applications of "Click Chemistry" for Bioconjugation in Contemporary Biomedical Research. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2009**, *24* (3), 289–302. https://doi.org/10.1089/cbr.2008.0626.

[92] Devaraj, N. K.; Weissleder, R. Biomedical Applications of Tetrazine Cycloadditions. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (9), 816–827. https://doi.org/10.1021/ar200037t.

[93] Carroll, L.; Evans, H. L.; Aboagye, E. O.; Spivey, A. C. Bioorthogonal Chemistry for Pre-Targeted Molecular Imaging – Progress and Prospects. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (35), 5772–5781. https://doi.org/10.1039/C3OB40897C.

[94] Rossin, R.; Renart Verkerk, P.; van den Bosch, S. M.; Vulders, R. C. M.; Verel, I.; Lub, J.; Robillard, M. S. in Vivo Chemistry for Pretargeted Tumor Imaging in Live Mice. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2010**, *122* (19), 3447–3450. https://doi.org/10.1002/ange.200906294.

[95] Patra, M.; Zarschler, K.; Pietzsch, H.-J.; Stephan, H.; Gasser, G. New Insights into the Pretargeting Approach to Image and Treat Tumours. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (23), 6415–6431. https://doi.org/10.1039/C5CS00784D.

[96] Knight, J. C.; Cornelissen, B. Bioorthogonal Chemistry: Implications for Pretargeted Nuclear (PET/SPECT) Imaging and Therapy. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2014**, *4* (2), 96–113.

[97] Paintaud, G.; Diviné, M.; Lechat, P. Anticorps monoclonaux à usage thérapeutique : spécificités du développement clinique, évaluation par les agences, suivi de la tolérance à long terme. *Therapie* **2012**, *67* (4), 319–327. https://doi.org/10.2515/therapie/2012043.

[98] Versteegen, R. M.; ten Hoeve, W.; Rossin, R.; de Geus, M. A. R.; Janssen, H. M.; Robillard, M. S. Click-to-Release from Trans-Cyclooctenes: Mechanistic Insights and Expansion of

Scope from Established Carbamate to Remarkable Ether Cleavage. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2018**, *57* (33), 10494–10499. https://doi.org/10.1002/anie.201800402.

[99] Kenry; Liu, B. Bio-Orthogonal Click Chemistry for in Vivo Bioimaging. *Trends Chem.* **2019**, *1* (8), 763–778. https://doi.org/10.1016/j.trechm.2019.08.003.

[100] Algar, W. R.; Dawson, P.; Medintz, I. L. Chemoselective and Bioorthogonal Ligation Reactions: Concepts and Applications, *John Wiley & Sons*, **2017**.

[101] Ramil, C. P.; Lin, Q. Bioorthogonal Chemistry: Strategies and Recent Developments. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (94), 11007–11022. https://doi.org/10.1039/C3CC44272A.

[102] Billaud, E. M. F.; Belderbos, S.; Cleeren, F.; Maes, W.; Van de Wouwer, M.; Koole, M.; Verbruggen, A.; Himmelreich, U.; Geukens, N.; Bormans, G. Pretargeted PET Imaging Using a Bioorthogonal ^{18}F-Labeled Trans-Cyclooctene in an Ovarian Carcinoma Model. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28* (12), 2915–2920. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00635.

[103] H. Staudinger, Macromolecular Chemistry, *Nobel Lecture* **1953**, 397–419.

[104] Kuhnast, B.; Dolle, F. The Challenge of Labeling Macromolecules with Fluorine-18: Three Decades of Research. *Curr. Radiopharm.* **2010**, *3* (3), 174–201. https://doi.org/10.2174/1874471011003030174.

[105] Hausner, S. H.; Abbey, C. K.; Bold, R. J.; Gagnon, M. K.; Marik, J.; Marshall, J. F.; Stanecki, C. E.; Sutcliffe, J. L. Targeted in Vivo Imaging of Integrin Avβ6 with an Improved Radiotracer and Its Relevance in a Pancreatic Tumor Model. *Cancer Res.* **2009**, *69* (14), 5843–5850. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4410.

[106] Bouvet, V.; Wuest, M.; Wuest, F. Copper-Free Click Chemistry with the Short-Lived Positron Emitter Fluorine-18. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (21), 7393–7399. https://doi.org/10.1039/C1OB06034A.

[107] McKay, C. S.; Blake, J. A.; Cheng, J.; Danielson, D. C.; Pezacki, J. P. Strain-Promoted Cycloadditions of Cyclic Nitrones with Cyclooctynes for Labeling Human Cancer Cells. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (36), 10040–10042. https://doi.org/10.1039/C1CC13808A.

[108] Inkster, J. A. H.; Colin, D. J.; Seimbille, Y. A Novel 2-Cyanobenzothiazole-Based ^{18}F Prosthetic Group for Conjugation to 1,2-Aminothiol-Bearing Targeting Vectors. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (12), 3667–3676. https://doi.org/10.1039/C4OB02637C.

[109] Selvaraj, R.; Liu, S.; Hassink, M.; Huang, C.; Yap, L.; Park, R.; Fox, J. M.; Li, Z.; Conti, P. S. Tetrazine-Trans-Cyclooctene Ligation for the Rapid Construction of Integrin Avβ$_3$ Targeted PET Tracer Based on a Cyclic RGD Peptide. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (17), 5011–5014. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.04.116.

[110] Keliher, E. J.; Reiner, T.; Thurber, G. M.; Upadhyay, R.; Weissleder, R. Efficient ^{18}F-Labeling of Synthetic Exendin-4 Analogues for Imaging Beta Cells. *ChemistryOpen* **2012**, *1* (4), 177–183. https://doi.org/10.1002/open.201200014.

[111] 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. Development and Evaluation of ^{18}F-TTCO-Cys^{40}-Exendin-4: A PET Probe for Imaging Transplanted Islets. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54* (2), 244–251. https://doi.org/10.2967/jnumed.112.109694.

[112] 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. Improved Metabolic Stability for ^{18}F PET Probes Rapidly Constructed via Tetrazine Trans-Cyclooctene Ligation. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26* (3), 435–442. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00089.

[113] Saxon, E.; Bertozzi, C. R. Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science* **2000**, *287* (5460), 2007–2010. https://doi.org/10.1126/science.287.5460.2007.

[114] Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide−Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047. https://doi.org/10.1021/ja044996f.

[115] Van den Bosch, S. M.; Rossin, R.; Renart Verkerk, P.; ten Hoeve, W.; Janssen, H. M.; Lub, J.; Robillard, M. S. Evaluation of Strained Alkynes for Cu-Free Click Reaction in Live Mice. *Nucl. Med. Biol.* **2013**, *40* (3), 415–423. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2012.12.006.

[116] L. Oliveira, B.; Guo, Z.; L. Bernardes, G. J. Inverse Electron Demand Diels–Alder Reactions in Chemical Biology. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (16), 4895–4950. https://doi.org/10.1039/C7CS00184C.

[117] Carboni, R. A.; Lindsey Jr, R. V. Reactions of Tetrazines with Unsaturated Compounds. A New Synthesis of Pyridazines. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81* (16), 4342–4346. https://doi.org/10.1021/ja01525a060.

[118] Wu, H.; Devaraj, N. K. Advances in Tetrazine Bioorthogonal Chemistry Driven by the Synthesis of Novel Tetrazines and Dienophiles. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51* (5), 1249–1259. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00062.

[119] Sauer, J.; Lang, D.; Mielert, A. The Order of Reactivity of Dienes towards Maleic Anhydride in the Diels-Alder Reaction. *Angew. Chem. - Int. Ed. Eng.* **1962**, *1* (5), 268–269. https://doi.org/10.1002/anie.196202683.

[120] Balcar, J.; Chrisam, G.; Huber, F. X.; Sauer, J. Reaktivität von stickstoff-heterocyclen genenüber cyclooctin als dienophil. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24* (14), 1481–1484. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)81687-1.

[121] Kamber, D. N.; Liang, Y.; Blizzard, R. J.; Liu, F.; Mehl, R. A.; Houk, K. N.; Prescher, J. A. 1,2,4-Triazines Are Versatile Bioorthogonal Reagents. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (26), 8388–8391. https://doi.org/10.1021/jacs.5b05100.

[122] Ravasco, J. M. J. M.; Coelho, J. A. S.; Trindade, A. F.; Afonso, C. A. M. Synthesis and Reactivity/Stability Study of Double-Functionalizable Strained Trans-Cyclooctenes for Tetrazine Bioorthogonal Reactions. *Pure Appl. Chem.* **2020**, *92* (1), 15–23. https://doi.org/10.1515/pac-2019-0201.

[123] Boerman, O. C.; Oyen, W. J. G. Immuno-PET of Cancer: A Revival of Antibody Imaging. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52* (8), 1171–1172. https://doi.org/10.2967/jnumed.111.089771.

[124] Šečkutė, J.; Devaraj, N. K. Expanding Room for Tetrazine Ligations in the in Vivo Chemistry Toolbox. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17* (5), 761–767. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.08.004.

[125] Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels−Alder Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (41), 13518–13519. https://doi.org/10.1021/ja8053805.

[126] Denk, C.; Svatunek, D.; Filip, T.; Wanek, T.; Lumpi, D.; Fröhlich, J.; Kuntner, C.; Mikula, H. Development of a ^{18}F-Labeled Tetrazine with Favorable Pharmacokinetics for Bioorthogonal PET Imaging. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2014**, *53* (36), 9655–9659. https://doi.org/10.1002/anie.201404277.

[127] Boger, D. L.; Schaum, R. P.; Garbaccio, R. M. Regioselective Inverse Electron Demand Diels−Alder Reactions of N-Acyl 6-Amino-3-(Methylthio)-1,2,4,5-Tetrazines. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (18), 6329–6337. https://doi.org/10.1021/jo980795g.

[128] Hamasaki, A.; Ducray, R.; Boger, D. L. Two Novel 1,2,4,5-Tetrazines That Participate in Inverse Electron Demand Diels−Alder Reactions with an Unexpected Regioselectivity. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (1), 185–193. https://doi.org/10.1021/jo051832o.

[129] Liang, Y.; Mackey, J. L.; Lopez, S. A.; Liu, F.; Houk, K. N. Control and Design of Mutual Orthogonality in Bioorthogonal Cycloadditions. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (43), 17904–17907. https://doi.org/10.1021/ja309241e.

[130] Wang, D.; Chen, W.; Zheng, Y.; Dai, C.; Wang, K.; Ke, B.; Wang, B. 3,6-Substituted-1,2,4,5-Tetrazines: Tuning Reaction Rates for Staged Labeling Applications. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (23), 3950–3955. https://doi.org/10.1039/C4OB00280F.

[131] Ravasco, J. M. J. M.; Coelho, J. A. S. Predictive Multivariate Models for Bioorthogonal Inverse-Electron Demand Diels–Alder Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (9), 4235–4241. https://doi.org/10.1021/jacs.9b11948.

[132] García-Vázquez, R.; Battisti, U. M.; Herth, M. M. Recent Advances in the Development of Tetrazine Ligation Tools for Pretargeted Nuclear Imaging. *Pharmaceuticals* **2022**, *15* (6), 685–710. https://doi.org/10.3390/ph15060685.

[133] Svatunek, D.; Wilkovitsch, M.; Hartmann, L.; Houk, K. N.; Mikula, H. Uncovering the Key Role of Distortion in Bioorthogonal Tetrazine Tools That Defy the Reactivity/Stability Trade-Off. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144* (18), 8171–8177. https://doi.org/10.1021/jacs.2c01056.

[134] Qiu, L.; Mao, W.; Yin, H.; Tan, H.; Cheng, D.; Shi, H. Pretargeted Nuclear Imaging and Radioimmunotherapy Based on the Inverse Electron-Demand Diels–Alder Reaction and Key Factors in the Pretargeted Synthetic Design. *Contrast Media Mol. Imaging* **2019**, *2019* (1), e9182476-e9182489. https://doi.org/10.1155/2019/9182476.

[135] Stéen, E. J. L.; Edem, P. E.; Nørregaard, K.; Jørgensen, J. T.; Shalgunov, V.; Kjaer, A.; Herth, M. M. Pretargeting in Nuclear Imaging and Radionuclide Therapy: Improving Efficacy of Theranostics and Nanomedicines. *Biomaterials* **2018**, *179* (1), 209–245. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.021.

[136] Tolshchina, S. G.; Rusinov, G. L.; Charushin, V. N. 1,2,4,5-Tetrazines and Azolo[1,2,4,5]Tetrazines: Synthesis and Reactions with Nucleophiles. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2013**, *49* (1), 66–91. https://doi.org/10.1007/s10593-013-1232-2.

[137] Mavragani, N.; Kitos, A. A.; Brusso, J. L.; Murugesu, M. Enhancing Magnetic Communication between Metal Centres: The Role of s-Tetrazine Based Radicals as Ligands. *Chem. – Eur. J.* **2021**, *27* (16), 5091–5106. https://doi.org/10.1002/chem.202004215.

[138] Choi, S.-K.; Kim, J.; Kim, E. Overview of Syntheses and Molecular-Design Strategies for Tetrazine-Based Fluorogenic Probes. *Molecules* **2021**, *26* (7), 1868–1884. https://doi.org/10.3390/molecules26071868.

[139] Clavier, G.; Audebert, P. S-Tetrazines as Building Blocks for New Functional Molecules and Molecular Materials. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (6), 3299–3314. https://doi.org/10.1021/cr900357e.

[140] Karver, M. R.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. Synthesis and Evaluation of a Series of 1,2,4,5-Tetrazines for Bioorthogonal Conjugation. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (11), 2263–2270. https://doi.org/10.1021/bc200295y.

[141] Wiley, R.; Jarboe, J.; Hayes, F. Heterocyclic Analogs of Terphenyl: 3, 6-Diaryl-1, 2, 4, 5-Tetrazines. *J. Org. Chem.* **1957**, *22* (7), 835–836. https://doi.org/10.1021/jo01358a609.

[142] Audebert, P.; Sadki, S.; Miomandre, F.; Clavier, G.; Vernières, M. C.; Saoud, M.; Hapiot, P. Synthesis of New Substituted Tetrazines: Electrochemical and Spectroscopic Properties. *New J. Chem.* **2004**, *28* (3), 387–392. https://doi.org/10.1039/B310737J.

[143] Sołoducho, J.; Doskocz, J.; Cabaj, J.; Roszak, S. Practical Synthesis of Bis-Substituted Tetrazines with Two Pendant 2-Pyrrolyl or 2-Thienyl Groups, Precursors of New Conjugated Polymers. *Tetrahedron* **2003**, *59* (26), 4761–4766. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00709-9.

[144] Calahorro, A. J.; Peñas-Sanjuan, A.; Melguizo, M.; Fairen-Jimenez, D.; Zaragoza, G.; Fernández, B.; Salinas-Castillo, A.; Rodríguez-Diéguez, A. First Examples of Metal–Organic Frameworks with the Novel 3,3′-(1,2,4,5-Tetrazine-3,6-Diyl)Dibenzoic Spacer. Luminescence and Adsorption Properties. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (2), 546–548. https://doi.org/10.1021/ic302318j.

[145] Mao, W.; Shi, W.; Li, J.; Su, D.; Wang, X.; Zhang, L.; Pan, L.; Wu, X.; Wu, H. Organocatalytic and Scalable Syntheses of Unsymmetrical 1,2,4,5-Tetrazines by Thiol-Containing Promotors. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2019**, *58* (4), 1106–1109. https://doi.org/10.1002/anie.201812550.

[146] Jaffee, E. G.; Lauber, M. A.; Running, W. E.; Reilly, J. P. In Vitro and in Vivo Chemical Labeling of Ribosomal Proteins: A Quantitative Comparison. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (21), 9355–9361. https://doi.org/10.1021/ac302115m.

[147] Yang, J.; Karver, M. R.; Li, W.; Sahu, S.; Devaraj, N. K. Metal-Catalyzed One-Pot Synthesis of Tetrazines Directly from Aliphatic Nitriles and Hydrazine. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2012**, *51* (21), 5222–5225. https://doi.org/10.1002/anie.201201117.

[148] Lim, C. L.; Pyo, S. H.; Kim, T. Y. ; Yim, E. S.; Han, B. H.; ChemInform Abstract: Synthesis of Symmetric 3,6-Disubstituted-1,2,4,5-tetrazines Using an Activated Catalyst Prepared by the Reaction of Copper Nitrate with Excess Zinc in the Presence of Hydrazine Monohydrate. *Heterocycl. Compd.* **1995**, *26* (46), 374–377. https://doi.org/10.1002/chin.199546192.

[149] Fang, Z.; Hu, W.-L.; Liu, D.-Y.; Yu, C.-Y.; Hu, X.-G. Synthesis of Tetrazines from Gem-Difluoroalkenes under Aerobic Conditions at Room Temperature. *Green Chem.* **2017**, *19* (5), 1299–1302. https://doi.org/10.1039/C6GC03494B.

[150] Selvaraj, R.; Fox, J. M. An Efficient and Mild Oxidant for the Synthesis of S-Tetrazines. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55* (34), 4795–4797. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.07.012.

[151] Reiner, T.; Zeglis, B. M. The Inverse Electron Demand Diels–Alder Click Reaction in Radiochemistry. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **2014**, *57* (4), 285–290. https://doi.org/10.1002/jlcr.3149.

[152] Shi, X.; Gao, K.; Huang, H.; Gao, R. Pretargeted Immuno-PET Based on Bioorthogonal Chemistry for Imaging EGFR Positive Colorectal Cancer. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29* (2), 250–254. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00023.

[153] Li, X.-G.; Roivainen, A.; Bergman, J.; Heinonen, A.; Bengel, F.; Thum, T.; Knuuti, J. Enabling [^{18}F]-Bicyclo[6.1.0]Nonyne for Oligonucleotide Conjugation for Positron Emission Tomography Applications: [^{18}F]-Anti-MicroRNA-21 as an Example. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (48), 9821–9824. https://doi.org/10.1039/C5CC02618K.

[154] Wang, M.; Svatunek, D.; Rohlfing, K.; Liu, Y.; Wang, H.; Giglio, B.; Yuan, H.; Wu, Z.; Li, Z.; Fox, J. Conformationally Strained Trans-Cyclooctene (STCO) Enables the Rapid Construction of ^{18}F-PET Probes via Tetrazine Ligation. *Theranostics* **2016**, *6* (6), 887–895. https://doi.org/10.7150/thno.14742.

[155] Feng, H.; Zhang, H.; Wang, M.; Vannam, R.; Wang, H.; Yan, X.; Ouyang, W.; Jia, X.; Fox, J. M.; Li, Z. Improving Tumor-to-Background Contrast through Hydrophilic Tetrazines: The Construction of ^{18}F-Labeled PET Agents Targeting Nonsmall Cell Lung Carcinoma. *Chemistry* **2020**, *26* (21), 4690–4694. https://doi.org/10.1002/chem.202000028.

[156] García-Vázquez, R.; Battisti, U. M.; Jørgensen, J. T.; Shalgunov, V.; Hvass, L.; Stares, D. L.; Petersen, I. N.; Crestey, F.; Löffler, A.; Svatunek, D.; Kristensen, J. L.; Mikula, H.; Kjaer, A.; Herth, M. M. Direct Cu-Mediated Aromatic ^{18}F-Labeling of Highly Reactive Tetrazines for Pretargeted Bioorthogonal PET Imaging. *Chem. Sci.* **2021**, *12* (35), 11668–11675. https://doi.org/10.1039/D1SC02789A.

[157] García-Vázquez, R.; Jørgensen, J. T.; Bratteby, K. E.; Shalgunov, V.; Hvass, L.; Herth, M. M.; Kjær, A.; Battisti, U. M. Development of ^{18}F-Labeled Bispyridyl Tetrazines for in Vivo Pretargeted PET Imaging. *Pharmaceuticals* **2022**, *15* (2), 245–273. https://doi.org/10.3390/ph15020245.

[158] Hui Teh, J.; Braga, M.; Allott, L.; Barnes, C.; Hernández-Gil, J.; Tang, M.-X.; O. Aboagye, E.; J. Long, N. A Kit-Based Aluminium-[^{18}F]Fluoride Approach to Radiolabelled Microbubbles. *Chem. Commun.* **2021**, *57* (88), 11677–11680. https://doi.org/10.1039/D1CC04790F.

[159] Otaru, S.; Imlimthan, S.; Sarparanta, M.; Helariutta, K.; Wähälä, K.; Airaksinen, A. J. Evaluation of Organo [^{18}F]Fluorosilicon Tetrazine as a Prosthetic Group for the Synthesis of PET Radiotracers. *Molecules* **2020**, *25* (5), 1208–1226. https://doi.org/10.3390/molecules25051208.

[160] Zhou, Z.; Meshaw, R.; Zalutsky, M. R.; Vaidyanathan, G. Site-Specific and Residualizing Linker for ^{18}F Labeling with Enhanced Renal Clearance: Application to an Anti-HER2 Single-Domain Antibody Fragment. *J. Nucl. Med.* **2021**, *62* (11), 1624–1630. https://doi.org/10.2967/jnumed.120.261446.

[161] Zhou, Z.; Zalutsky, M. R.; Vaidyanathan, G. Labeling a TCO-Functionalized Single Domain Antibody Fragment with ^{18}F via Inverse Electron Demand Diels Alder Cycloaddition Using a Fluoronicotinyl Moiety-Bearing Tetrazine Derivative. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28* (17), 115634–115644. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115634.

[162] Kjær, A.; Petersen, I. N.; Herth, M. M.; Kristensen, J. L. Novel Tetrazine Compounds for in Vivo Imaging. WO2020108720A1, June 4, **2020**.

[163] Novianti, I.; Kowada, T.; Mizukami, S. Clip to Click: Controlling Inverse Electron-Demand Diels–Alder Reactions with Macrocyclic Tetrazines. *Org. Lett.* **2022**, *24* (17), 3223–3226. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.2c01010.

[164] Zeglis, B. M.; Sevak, K. K.; Reiner, T.; Mohindra, P.; Carlin, S. D.; Zanzonico, P.; Weissleder, R.; Lewis, J. S. A Pretargeted PET Imaging Strategy Based on Bioorthogonal Diels–Alder Click Chemistry. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54* (8), 1389–1396. https://doi.org/10.2967/jnumed.112.115840.

[165] Zeglis, B. M.; Brand, C.; Abdel-Atti, D.; Carnazza, K. E.; Cook, B. E.; Carlin, S.; Reiner, T.; Lewis, J. S. Optimization of a Pretargeted Strategy for the PET Imaging of Colorectal Carcinoma via the Modulation of Radioligand Pharmacokinetics. *Mol. Pharmaceutics* **2015**, *12* (10), 3575–3587. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00294.

[166] Meyer, J.-P.; Kozlowski, P.; Jackson, J.; Cunanan, K. M.; Adumeau, P.; Dilling, T. R.; Zeglis, B. M.; Lewis, J. S. Exploring Structural Parameters for Pretargeting Radioligand Optimization. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (19), 8201–8217. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01108.

[167] García, M. F.; Gallazzi, F.; Junqueira, M. de S.; Fernández, M.; Camacho, X.; Mororó, J. da S.; Faria, D.; Carneiro, C. de G.; Couto, M.; Carrión, F.; Pritsch, O.; Chammas, R.; Quinn, T.; Cabral, P.; Cerecetto, H. Synthesis of Hydrophilic HYNIC-[1,2,4,5]Tetrazine Conjugates and Their Use in Antibody Pretargeting with ^{99m}Tc. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (29), 5275–5285. https://doi.org/10.1039/C8OB01255E.

[168] García Garayoa, E.; Schweinsberg, C.; Maes, V.; Brans, L.; Bläuenstein, P.; Tourwé, D. A.; Schibli, R.; Schubiger, P. A. Influence of the Molecular Charge on the Biodistribution of Bombesin Analogues Labeled with the [^{99m}Tc(CO)$_3$]-Core. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (12), 2409–2416. https://doi.org/10.1021/bc800262m.

[169] Tsiapa, I.; Loudos, G.; Varvarigou, A.; Fragogeorgi, E.; Psimadas, D.; Tsotakos, T.; Xanthopoulos, S.; Mihailidis, D.; Bouziotis, P.; Nikiforidis, G. C.; Kagadis, G. C. Biological Evaluation of an Ornithine-Modified ^{99m}Tc-Labeled RGD Peptide as an Angiogenesis Imaging Agent. *Nucl. Med. Biol.* **2013**, *40* (2), 262–272. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2012.10.015.

[170] Antunes, P.; Ginj, M.; Walter, M. A.; Chen, J.; Reubi, J.-C.; Maecke, H. R. Influence of Different Spacers on the Biological Profile of a DOTA−Somatostatin Analogue. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18* (1), 84–92. https://doi.org/10.1021/bc0601673.

[171] Nichols, B.; Qin, Z.; Yang, J.; Vera, D. R.; Devaraj, N. K. ^{68}Ga Chelating Bioorthogonal Tetrazine Polymers for the Multistep Labeling of Cancer Biomarkers. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (40), 5215–5217. https://doi.org/10.1039/C3CC49530B.

[172] Devaraj, N. K.; Hilderbrand, S.; Upadhyay, R.; Mazitschek, R.; Weissleder, R. Bioorthogonal Turn-On Probes for Imaging Small Molecules inside Living Cells. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2010**, *122* (16), 2931–2934. https://doi.org/10.1002/ange.200906120.

[173] 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. A New Highly Reactive and Low Lipophilicity Fluorine-18 Labeled Tetrazine Derivative for Pretargeted PET Imaging. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7* (1), 62–66. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00330.

[174] Battisti, U. M.; Bratteby, K.; Jørgensen, J. T.; Hvass, L.; Shalgunov, V.; Mikula, H.; Kjær, A.; Herth, M. M. Development of the First Aliphatic ^{18}F-Labeled Tetrazine Suitable for Pretargeted PET Imaging—Expanding the Bioorthogonal Tool Box. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (20), 15297–15312. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01326.

[175] Wu, M.; Wu, X.; Wang, Y.; Gu, L.; You, J.; Wu, H.; Feng, P. Alkoxy Tetrazine Substitution at a Boron Center: A Strategy for Synthesizing Highly Fluorogenic Hydrophilic Probes. *ChemBioChem* **2018**, *19* (6), 530–534. https://doi.org/10.1002/cbic.201700556.

[176] Stéen, E. J. L.; Jørgensen, J. T.; Denk, C.; Battisti, U. M.; Nørregaard, K.; Edem, P. E.; Bratteby, K.; Shalgunov, V.; Wilkovitsch, M.; Svatunek, D.; Poulie, C. B. M.; Hvass, L.; Simón, M.; Wanek, T.; Rossin, R.; Robillard, M.; Kristensen, J. L.; Mikula, H.; Kjaer, A.; Herth, M. M. Lipophilicity and Click Reactivity Determine the Performance of Bioorthogonal Tetrazine Tools in Pretargeted in Vivo Chemistry. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2021**, *4* (2), 824–833. https://doi.org/10.1021/acsptsci.1c00007.

[177] Desmettre, T.; Devoisselle, J. M.; Mordon, S. Fluorescence Properties and Metabolic Features of Indocyanine Green (ICG) as Related to Angiography. *Surv. Ophthalmol.* **2000**, *45* (1), 15–27. https://doi.org/10.1016/S0039-6257(00)00123-5.

[178] Woodroofe, C. C.; Lim, M. H.; Bu, W.; Lippard, S. J. Synthesis of Isomerically Pure Carboxylate- and Sulfonate-Substituted Xanthene Fluorophores. *Tetrahedron* **2005**, *61* (12), 3097–3105. https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.01.024.

[179] Hamann, F. M.; Brehm, R.; Pauli, J.; Grabolle, M.; Frank, W.; Kaiser, W. A.; Fischer, D.; Resch-Genger, U.; Hilger, I. Controlled Modulation of Serum Protein Binding and Biodistribution of Asymmetric Cyanine Dyes by Variation of the Number of Sulfonate Groups. *Mol. Imaging* **2011**, *10* (4), 258–269. https://doi.org/20180226022532003363.

[180] Pauff, S. M.; Miller, S. C. Synthesis of Near-IR Fluorescent Oxazine Dyes with Esterase-Labile Sulfonate Esters. *Org. Lett.* **2011**, *13* (23), 6196–6199. https://doi.org/10.1021/ol202619f.

[181] Pauff, S. M.; Miller, S. C. A Trifluoroacetic Acid-Labile Sulfonate Protecting Group and Its Use in the Synthesis of a Near-IR Fluorophore. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (2), 711–716. https://doi.org/10.1021/jo302065u.

[182] Kim, J.; Kim, Y. A Water-Soluble Sulfonate-BODIPY Based Fluorescent Probe for Selective Detection of HOCl/OCl − in Aqueous Media. *Analyst* **2014**, *139* (12), 2986–2989. https://doi.org/10.1039/C4AN00466C.

[183] Krommyda, K.; Panopoulou, C.; Moustani, C.; Anagnostopoulou, E.; Makripidi, K.; Papadogianakis, G. A Remarkable Effect of Aluminum on the Novel and Efficient Aqueous-Phase Hydrogenation of Levulinic Acid into γ-Valerolactone Using Water-Soluble Platinum Catalysts Modified with Nitrogen-Containing Ligands. *Catal. Lett.* **2019**, *149* (5), 1250–1265. https://doi.org/10.1007/s10562-019-02707-9.

[184] James, C.; Mant, T.; Rogers, H. Pharmacokinetics of Intravenous and Oral Sodium 2-Mercaptoethane Sulphonate (Mesna) in Normal Subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1987**, *23* (5), 561–568. https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1987.tb03092.x.

[185] Boven, E.; Westerman, M.; van Groeningen, C. J.; Verschraagen, M.; Ruijter, R.; Zegers, I.; van der Vijgh, W. J. F.; Giaccone, G. Phase I and Pharmacokinetic Study of the Novel Chemoprotector BNP7787 in Combination with Cisplatin and Attempt to Eliminate the Hydration Schedule. *Br. J. Cancer* **2005**, *92* (9), 1636–1643. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602553.

[186] Ogata, J.; Minami, K.; Horishita, T.; Shiraishi, M.; Okamoto, T.; Terada, T.; Sata, T. Gargling with Sodium Azulene Sulfonate Reduces the Postoperative Sore Throat After Intubation of the Trachea. *Anesth. Analg.* **2005**, *101* (1), 290–293. https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000156565.60082.7C.

[187] Elder, D. P.; Delaney, E.; Teasdale, A.; Eyley, S.; Reif, V. D.; Jacq, K.; Facchine, K. L.; Oestrich, R. S.; Sandra, P.; David, F. The Utility of Sulfonate Salts in Drug Development. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99* (7), 2948–2961. https://doi.org/10.1002/jps.22058.

[188] Masuda, N.; Negoro, S.; Hausheer, F.; Nakagawa, K.; Matsui, K.; Kudoh, S.; Takeda, K.; Yamamoto, N.; Yoshimura, N.; Ohashi, Y.; Fukuoka, M. Phase I and Pharmacologic Study of BNP7787, a Novel Chemoprotector in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2011**, *67* (3), 533–542. https://doi.org/10.1007/s00280-010-1340-y.

[189] Mao, S.; Taylor, S.; Chen, Q.; Zhang, M.; Hinek, A. Sodium Tanshinone IIA Sulfonate Prevents the Adverse Left Ventricular Remodelling: Focus on Polymorphonuclear Neutrophil-Derived Granule Components. *J. Cell. Mol. Med.* **2019**, *23* (7), 4592–4600. https://doi.org/10.1111/jcmm.14306.

[190] Bharate, S. S. Modulation of Biopharmaceutical Properties of Drugs Using Sulfonate Counterions: A Critical Analysis of FDA-Approved Pharmaceutical Salts. *J. Drug. Deliv. Sci. Technol.* **2021**, *66* (1), 102913–102925. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102913.

[191] Schmitt, S.; Bouteiller, C.; Barré, L.; Perrio, C. Sultone Opening with [^{18}F]Fluoride: An Efficient ^{18}F-Labelling Strategy for PET Imaging. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (41), 11465–11467. https://doi.org/10.1039/c1cc14435a.

[192] Erdmann, H. Die Constitution Der Isomeren Naphtalinderivate. I. Die α-α-Disubstituirten Verbindungen. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1888**, *247* (3), 306–366. https://doi.org/10.1002/jlac.18882470305.

[193] Meschkat, E.; Barratt, M. D.; Lepoittevin, J.-P. Studies of the Chemical Selectivity of Hapten, Reactivity, and Skin Sensitization Potency. 1. Synthesis and Studies on the Reactivity toward Model Nucleophiles of the ^{13}C-Labeled Skin Sensitizers Hex-1-Ene- and Hexane-1,3-Sultones. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14* (1), 110–117. https://doi.org/10.1021/tx000225n.

[194] Wang, H.; Lu, Z.; Lord, S. J.; Moerner, W. E.; Twieg, R. J. Modifications of DCDHF Single Molecule Fluorophores to Impart Water Solubility. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (19), 3471–3474. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.03.026.

[195] Wang, Y.; Han, Y.; Huang, X.; Cao, M.; Wang, Y. Aggregation Behaviors of a Series of Anionic Sulfonate Gemini Surfactants and Their Corresponding Monomeric Surfactant. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *319* (2), 534–541. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.11.021.

[196] Bachand, B.; Atfani, M.; Samim, B.; Lévesque, S.; Simard, D.; Kong, X. A Novel Synthetic Route to 2-Alkylpropane-1,3-Sultones and Its Application to the Synthesis of 2-

Alkyl Derivatives of Tramiprosate. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (49), 8587–8589. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.10.042.

[197] Koch, F. M.; Peters, R. Catalytic Enantio- and Diastereoselective Formation of β-Sultones: Ring-Strained Precursors for Enantioenriched β-Hydroxysulfonyl Derivatives. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2007**, *46* (15), 2685–2689. https://doi.org/10.1002/anie.200604796.

[198] Fang, D.; Fei, Z.; Liu, Z. The Knoevenagel Reaction in Water Catalyzed by Zwitterionic Liquids. *Monatsh. Chem.* **2008**, *139* (7), 799–803. https://doi.org/10.1007/s00706-008-0855-y.

[199] Sakai, K.; Wada, M.; Matsuda, W.; Tsuchiya, K.; Takamatsu, Y.; Tsubone, K.; Endo, T.; Torigoe, K.; Sakai, H.; Abe, M. Polymerizable Anionic Gemini Surfactants: Physicochemical Properties in Aqueous Solution and Polymerization Behavior. *J. Oleo Sci.* **2009**, *58* (8), 403–413. https://doi.org/10.5650/jos.58.403.

[200] Sakai, K.; Kaji, M.; Takamatsu, Y.; Tsuchiya, K.; Torigoe, K.; Tsubone, K.; Yoshimura, T.; Esumi, K.; Sakai, H.; Abe, M. Fluorocarbon–Hydrocarbon Gemini Surfactant Mixtures in Aqueous Solution. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2009**, *333* (1–3), 26–31. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2008.09.022.

[201] Tripathi, B. P.; Shahi, V. K. 3-[[3-(Triethoxysilyl)Propyl]Amino]Propane-1-Sulfonic Acid−Poly(Vinyl Alcohol) Cross-Linked Zwitterionic Polymer Electrolyte Membranes for Direct Methanol Fuel Cell Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2009**, *1* (5), 1002–1012. https://doi.org/10.1021/am800228s.

[202] Yang, M.; Xu, F.; Wang, C.; Liu, X.; Yan, P.; Li, P.; Welz-Biermann, U. Synthesis, Characterization, and Catalytic Properties of Two Zwitterionic Hybrid SBA-15 Mesoporous Silicas. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, *2012* (28), 4500–4506. https://doi.org/10.1002/ejic.201200498.

[203] Ma, W.; Wang, W.; Liang, Z.; Hu, S.; Shen, R.; Wu, C. Synthesis of Novel Acidic Ionic Liquid Immobilized on Silica. *Kinet. Catal.* **2014**, *55* (5), 665–670. https://doi.org/10.1134/S0023158414050115.

[204] Chen, L.; Sun, L.; Zeng, R.; Xiao, S.; Chen, Y. Cross-Linked Zwitterionic Polyelectrolytes Based on Sulfonated Poly(Ether Sulfone) with High Proton Conductivity for Direct Methanol Fuel Cells. *J. Power Sources* **2012**, *212* (1), 13–21. https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2012.04.008.

[205] Zhai, W.; Wang, M.; Song, J.; Zhang, L.; Li, X.-M.; He, T. Fouling Resistance of 3-[[3-(Trimethoxysilane)-Propyl] Amino] Propane-1-Sulfonic Acid Zwitterion Modified Poly (Vinylidene Fluoride) Membranes. *Sep. Purif. Technol.* **2020**, *239* (1), 116589–116598. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.116589.

[206] Ng, E.-P.; Mohd Subari, S. N.; Marie, O.; Mukti, R. R.; Juan, J.-C. Sulfonic Acid Functionalized MCM-41 as Solid Acid Catalyst for Tert-Butylation of Hydroquinone Enhanced by Microwave Heating. *Appl. Catal. A: Gen.* **2013**, *450* (1), 34–41. https://doi.org/10.1016/j.apcata.2012.09.055.

[207] Wang, C.; Liu, X.; Yang, M.; Ma, H.; Yan, P.; Slattery, J. M.; Gao, Y. A Green and Efficient Amine-Functionalized Ionic Liquid/H_2O Catalytic System for the Synthesis of α,A′-Bis(Substituted Benzylidene)Cyclopentanones. *RSC Adv.* **2013**, *3* (23), 8796–8805. https://doi.org/10.1039/c3ra40325d.

[208] Bouyssou, T.; Rudolf, K.; Hoenke, C.; Lustenberger, P.; Schnapp, A.; Konetzki, I. Studies towards Topical Selective B2-Adrenoceptor Agonists with a Long Duration of Action. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (17), 5237–5240. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.06.104.

[209] Bouteiller, C. Derives De Composes a Base De Sultones Substitues Par Des Nucleophiles, Notamment Des Radionucleides, Et Leur Utilisation Pour Le Marquage De Macromolecules. WO2011018467A1, February 17, **2011**.

[210] Priem, T.; Bouteiller, C.; Camporese, D.; Romieu, A.; Renard, P.-Y. Synthesis and Reactivity of a Bis-Sultone Cross-Linker for Peptideconjugation and [^{18}F]-Radiolabelling via Unusual "Double Click" Approach. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (5), 1068–1078. https://doi.org/10.1039/C1OB06600E.

[211] Qiao, Y.; Zhang, L.; Luo, S.; Cheng, J.-P. Chiral Zwitterions from Vicinal Diamines: Effective and Recoverable Asymmetric Enamine Catalysts. *Synlett* **2011**, *2011* (4), 495–498. https://doi.org/10.1055/s-0030-1259512.

[212] Wei, H.; Insin, N.; Lee, J.; Han, H.-S.; Cordero, J. M.; Liu, W.; Bawendi, M. G. Compact Zwitterion-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Biological Applications. *Nano Lett.* **2012**, *12* (1), 22–25. https://doi.org/10.1021/nl202721q.

[213] Chung, Y.-C.; Huang, J.-Y. Water-Borne Composite Coatings Using Nanoparticles Modified with Dopamine Derivatives. *Thin Solid Films* **2014**, *570* (1), 376–382. https://doi.org/10.1016/j.tsf.2014.03.031.

[214] Huang, C.-J.; Wang, L.-C.; Shyue, J.-J.; Chang, Y.-C. Developing Antifouling Biointerfaces Based on Bioinspired Zwitterionic Dopamine through PH-Modulated Assembly. *Langmuir* **2014**, *30* (42), 12638–12646. https://doi.org/10.1021/la503191b.

[215] Mondini, S.; Leonzino, M.; Drago, C.; Ferretti, A. M.; Usseglio, S.; Maggioni, D.; Tornese, P.; Chini, B.; Ponti, A. Zwitterion-Coated Iron Oxide Nanoparticles: Surface Chemistry and Intracellular Uptake by Hepatocarcinoma (HepG2) Cells. *Langmuir* **2015**, *31* (26), 7381–7390. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01496.

[216] Ruan, H.; Zheng, Z.; Pan, J.; Gao, C.; Van der Bruggen, B.; Shen, J. Mussel-Inspired Sulfonated Polydopamine Coating on Anion Exchange Membrane for Improving Permselectivity and Anti-Fouling Property. *J. Membr. Sci.* **2018**, *550*, 427–435. https://doi.org/10.1016/j.memsci.2018.01.005.

[217] Han, J.; Liang, G.; Xing, D. A PH-Sensitive Zwitterionic Iron Complex Probe with High Biocompatibility for Tumor-Specific Magnetic Resonance Imaging. *Chem. – Eur. J.* **2019**, *25* (35), 8353–8362. https://doi.org/10.1002/chem.201901117.

[218] Ding, J.; Wu, H.; Wu, P. Development of Nanofiltration Membranes Using Mussel-Inspired Sulfonated Dopamine for Interfacial Polymerization. *J. Membr. Sci.* **2020**, *598* (1), 117658–117668. https://doi.org/10.1016/j.memsci.2019.117658.

[219] MacNevin, C. J.; Gremyachinskiy, D.; Hsu, C.-W.; Li, L.; Rougie, M.; Davis, T. T.; Hahn, K. M. Environment-Sensing Merocyanine Dyes for Live Cell Imaging Applications. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24* (2), 215–223. https://doi.org/10.1021/bc3005073.

[220] Meng, Y.; Liu, J.; Li, Z.; Wei, H. Synthesis and Physicochemical Properties of Two SO_3 H-Functionalized Ionic Liquids with Hydrogen Sulfate Anion. *J. Chem. Eng. Data* **2014**, *59* (7), 2186–2195. https://doi.org/10.1021/je5001507.

[221] Yan, P.; Xu, Z.; Zhang, C.; Liu, X.; Xu, W.; Zhang, Z. C. Fractionation of Lignin from Eucalyptus Bark Using Amine-Sulfonate Functionalized Ionic Liquids. *Green Chem.* **2015**, *17* (11), 4913–4920. https://doi.org/10.1039/C5GC01035G.

[222] Yu, Y.; Li, J.; Zhang, M.; Cao, L.; Isaacs, L. Hydrophobic Monofunctionalized Cucurbit[7]Uril Undergoes Self-Inclusion Complexation and Forms Vesicle-Type Assemblies. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (18), 3762–3765. https://doi.org/10.1039/C5CC00236B.

[223] Fujisawa, K.; Humbert-Droz, M.; Letrun, R.; Vauthey, E.; Wesolowski, T. A.; Sakai, N.; Matile, S. Ion Pair−π Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (34), 11047–11056. https://doi.org/10.1021/jacs.5b05593.

[224] MacNevin, C. J.; Toutchkine, A.; Marston, D. J.; Hsu, C.-W.; Tsygankov, D.; Li, L.; Liu, B.; Qi, T.; Nguyen, D.-V.; Hahn, K. M. Ratiometric Imaging Using a Single Dye Enables Simultaneous Visualization of Rac1 and Cdc42 Activation. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (8), 2571–2575. https://doi.org/10.1021/jacs.5b09764.

[225] Yuan, L.; Gui, L.; Wang, Y.; Zhang, Q.; Zhou, L.; Wei, S. Photophysical and Photochemical Studies of a Novel Amphiphilic Zinc Phthalocyanine and Its Interaction with Calf Thymus DNA. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **2016**, *158* (1), 1–8. https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.01.011.

[226] Hwang, L.; Guardado-Alvarez, T. M.; Ayaz-Gunner, S.; Ge, Y.; Jin, S. A Family of Photolabile Nitroveratryl-Based Surfactants That Self-Assemble into Photodegradable Supramolecular Structures. *Langmuir* **2016**, *32* (16), 3963–3969. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00658.

[227] Selinger, A. J.; Macartney, D. H. Cucurbit[7]Uril Complexations of Good's Buffers. *RSC Adv.* **2017**, *7* (67), 42513–42518. https://doi.org/10.1039/C7RA08865E.

[228] Zhou, D.; Xiong, S.; Chen, L.; Cheng, X.; Xu, H.; Zhou, Y.; Liu, F.; Chen, Y. A Green Route to a Novel Hyperbranched Electrolyte Interlayer for Nonfullerene Polymer Solar Cells with over 11% Efficiency. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (5), 563–566. https://doi.org/10.1039/C7CC08604K.

[229] Peng, Z.; Tang, L.; Yuan, Y.; Qu, J. Synthesis and Properties of Water-Dispersible Polyisocyanates Carrying Sulfonate. *J. Coat. Technol. Res.* **2020**, *17* (2), 345–359. https://doi.org/10.1007/s11998-019-00277-4.

[230] Priem, T.; Bouteiller, C.; Camporese, D.; Brune, X.; Hardouin, J.; Romieu, A.; Renard, P.-Y. A Novel Sulfonated Prosthetic Group for [^{18}F]-Radiolabelling and Imparting Water Solubility of Biomolecules and Cyanine Fluorophores. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *11* (3), 469–479. https://doi.org/10.1039/C2OB26659H.

[231] Lafargue, A.-E.; Perrio, C. Compounds Useful As Hypoxia Imaging Agent. FR3068695 A1, FR3068695B1, WO2019008119, August 16, **2019**.

[232] Lafargue, A.-E. Synthèse et Réactivité de Sultones Pour Le Développement de Diopharmaceutiques Destinés à l'imagerie Par Tomographie Par Émission de Positons. Thèse de doctorat, Normandie Université, **2016**.

[233] Maingueneau, C. Valorisation des sultones et boratranes comme plateformes de radiomarquage au fluor-18 : application au développement de radiotraceurs pour l'imagerie de l'hypoxie par Tomographie par Emission de Positons. Thèse de doctorat, Normandie Université, **2019**.

B. Chapitre 2

[234] Mustafa, A. Sultones And Sultams. In Organic Sulfur Compounds. *Elsevier*, **1961**, 183–198. https://doi.org/10.1016/B978-1-4831-9982-5.50021-X.

[235] Durst, T.; Tin, K.-C. A New Route to 5- and 6-Membered Ring Sultones. *Can. J. Chem.* **1970**, *48* (5), 845–851. https://doi.org/10.1139/v70-135.

[236] Mondal, S. Recent Developments in the Synthesis and Application of Sultones. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (10), 5339–5355. https://doi.org/10.1021/cr2003294.

[237] Pustenko, A.; Žalubovskis, R. Recent Advances in Sultone Synthesis (Microreview). *Chem. Heterocycl. Compd.* **2017**, *53* (12), 1283–1285. https://doi.org/10.1007/s10593-018-2208-z.

[238] Gaunersdorfer, C.; Waser, M. Progress in the Synthesis of δ-Sultones. *Monatsh. Chem.* **2018**, *149* (4), 701–714. https://doi.org/10.1007/s00706-017-2010-0.

[239] Azevedo, O. D. C. C.; Heron, B. M.; Zonidis, D. Synthesis, reactivity and applications of 1,2-oxathiine 2,2-dioxides. *Targets Heterocycl. Syst.* **2020**, *24* (1), 33–57. https://doi.org/10.17374/targets.2021.24.33.

[240] Xu, Y.; Zhang, Z.; Shi, J.; Liu, X.; Tang, W. Recent Developments of Synthesis and Biological Activity of Sultone Scaffolds in Medicinal Chemistry. *Arab. J. Chem.* **2021**, *14* (4), 103037–1030361. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103037.

[241] Plietker, B.; Seng, D.; Fröhlich, R.; Metz, P. High Pressure Intramolecular Diels–Alder Reactions of Vinylsulfonates and Vinylsulfonamides. *Tetrahedron* **2000**, *56* (6), 873–879. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(99)01073-X.

[242] Boyer, J. L.; Gilot, B.; Canselier, J. P. Primary And Secondary Products In The Liquid Phase So3-Sulfonation Of 1-Alkenes. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* **1984**, *20* (3), 259–271. https://doi.org/10.1080/03086648408077636.

[243] Enders, D.; Wallert, S.; Runsink, J. Asymmetric Synthesis of β-AminoCyclohexyl Sulfonates, β-Sultams and γ-Sultones. *Synthesis* **2003**, *2003* (12), 1856–1868. https://doi.org/10.1055/s-2003-41029.

[244] Karsch, S.; Schwab, P.; Metz, P. Synthesis of Sultones by Ring Closing Metathesis. *Synlett* **2002**, *2002* (12), 2019–2022. https://doi.org/10.1055/s-2002-35560.

[245] Majumdar, K. C.; Mondal, S.; Ghosh, D. Synthesis of Tricyclic and Tetracyclic Sultones by Pd-Catalyzed Intramolecular Cyclization. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (33), 4781–4784. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.06.028.

[246] Wolckenhauer, S. A.; Devlin, A. S.; Du Bois, J. δ-Sultone Formation Through Rh-Catalyzed C−H Insertion. *Org. Lett.* **2007**, *9* (21), 4363–4366. https://doi.org/10.1021/ol701950d.

[247] Smith, M. B.; Wolinsky, J. Lithium Aluminum Hydride-Aluminum Hydride Reduction of Sultones. *J. Org. Chem.* **1981**, *46* (1), 101–106. https://doi.org/10.1021/jo00314a022.

[248] Durst, T.; Manoir, J. du. Metallation of 5- and 6-Membered Ring Sultones. *Can. J. Chem.* **1969**, *47* (7), 1230–1233. https://doi.org/10.1139/v69-199.

[249] Faust, A.; Hermann, S.; Roth, J.; Schaefers, M.; Vogl, T. Quinoline-3-Carboxamide Compounds and Their Use in Diagnosis. WO2016067238A1, May 6, **2016**.

[250] Margelefsky, E. L.; Zeidan, R. K.; Dufaud, V.; Davis, M. E. Organized Surface Functional Groups: Cooperative Catalysis via Thiol/Sulfonic Acid Pairing. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (44), 13691–13697. https://doi.org/10.1021/ja074761e.

[251] Chang, C.-C.; Letteri, R.; Hayward, R. C.; Emrick, T. Functional Sulfobetaine Polymers: Synthesis and Salt-Responsive Stabilization of Oil-in-Water Droplets. *Macromolecules* **2015**, *48* (21), 7843–7850. https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b01861.

[252] Bouteiller, C. Derives De Composes à Base De Sultones Substitues Par Des Nucléophiles, Notamment Des Radionucléides, Et Leur Utilisation Pour Le Marquage De Macromolecules. WO2011018467A1, February 17, **2011**.

[253] Priem, T.; Bouteiller, C.; Camporese, D.; Romieu, A.; Renard, P.-Y. Nouveaux Composés Sulfonés Réactifs Avec Des Nucléophiles Pour Le (Radio)Marquage De (Bio)Molécules ; Précurseurs Et Conjugués Correspondants. WO2014079979A1, May 30, **2014**.

[254] Quinton, C. Dérivés de s-tétrazine et de triphénylamine : du design aux applications. Thèse de doctorat, École normale supérieure de Cachan - ENS Cachan, **2013**, 131.

[255] Wieczorek, A.; Werther, P.; Euchner, J.; Wombacher, R. Green- to Far-Red-Emitting Fluorogenic Tetrazine Probes – Synthetic Access and No-Wash Protein Imaging inside Living Cells. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (2), 1506–1510. https://doi.org/10.1039/C6SC03879D.

[256] Williard, P. G.; Li, W.; Kagan, G.; Hopson, R. Application of ^{6}Li Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy (DOSY) to Confirming the Solution Structure of n-Butyllithium. *Arkivoc* **2011**, *2011* (5), 180–187. https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0012.515.

[257] Bulling, B. W. Reaction Mechanism of Solvated *n*-BuLi with Thiophene in THF: A Theoretical and Spectroscopic Study. Dissertation, University of Pretoria, **2018**.

[258] Wu, H.; You, J. Tetrazine Compound, Method for Preparing Same and Application of Tetrazine Compound. CN106317112A, January 11, **2017**.

[259] Baalmann, M.; Ziegler, M. J.; Werther, P.; Wilhelm, J.; Wombacher, R. Enzymatic and Site-Specific Ligation of Minimal-Size Tetrazines and Triazines to Proteins for Bioconjugation and Live-Cell Imaging. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30* (5), 1405–1414. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00157.

[260] Lang, J. S. A.; Cohen, E.; Sloboda, A. E. Compositions of Matter and Method of Use of Phenyl and Substituted Phenyl Tetrazines. US3863010A, January 28, **1975**.

[261] Hu, W.-X.; Xu, F. Synthesis, Structures of Some Unsymmetrical 3,6-Disubstituted-1,2,4,5-Tetrazines. *J. Heterocycl. Chem.* **2008**, *45* (6), 1745–1750. https://doi.org/10.1002/jhet.5570450628.

[262] Xiong, H.; Gu, Y.; Zhang, S.; Lu, F.; Ji, Q.; Liu, L.; Ma, P.; Yang, G.; Hou, W.; Xu, H. Iridium-Catalyzed C–H Amidation of s-Tetrazines. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (34), 4692–4695. https://doi.org/10.1039/D0CC01647K.

[263] Liu, Z.; Tang, H.; Hu, Q.; Chen, W.; Zheng, C. Synthesis Method of 1, 2, 4, 5-Tetrazine Compound. CN114213351A, March 22, **2022**.

[264] Barluenga, J.; Campos-Gómez, E.; Rodríguez, D.; González-Bobes, F.; González, J. M. New Iodination Reactions of Saturated Hydrocarbons. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2005**, *117* (36), 6001–6004. https://doi.org/10.1002/ange.200501195.

[265] Ling, X.-G.; Xiong, Y.; Zhang, S.-T.; Huang, R.-F.; Zhang, X.-H. Effective Synthesis of Benzyl Halides Triggered by in Situ Prepared Hypervalent Halides. *Chin. Chem. Lett.* **2013**, *24* (1), 45–48. https://doi.org/10.1016/j.cclet.2012.12.013.

[266] Chinchilla, R.; Nájera, C. The Sonogashira Reaction: A Booming Methodology in Synthetic Organic Chemistry. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (3), 874–922. https://doi.org/10.1021/cr050992x.

[267] Casado, A. L.; Espinet, P. On the Configuration Resulting from Oxidative Addition of RX to $Pd(PPh_3)_4$ and the Mechanism of the Cis-to-Trans Isomerization of $[PdRX(PPh_3)_2]$ Complexes (R = Aryl, X = Halide). *Organometallics* **1998**, *17* (5), 954–959. https://doi.org/10.1021/om9709502.

[268] Amatore, C.; Bensalem, S.; Ghalem, S.; Jutand, A.; Medjour, Y. Decelerating Effect of Alkynes in the Oxidative Addition of Phenyl Iodide to Palladium(0) Complexes in Palladium-Catalyzed Multicomponent Reactions and Sonogashira Reactions. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *2004* (2), 366–371. https://doi.org/10.1002/ejoc.200300618.

[269] Jutand, A.; Négri, S.; Principaud, A. Formation of ArPdXL(Amine) Complexes by Substitution of One Phosphane Ligand by an Amine in Trans-$ArPdX(PPh_3)_2$ Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, *2005* (4), 631–635. https://doi.org/10.1002/ejic.200400413.

[270] He, C.; Ke, J.; Xu, H.; Lei, A. Synergistic Catalysis in the Sonogashira Coupling Reaction: Quantitative Kinetic Investigation of Transmetalation. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2013**, *125* (5), 1567–1570. https://doi.org/10.1002/ange.201207970.

[271] Joussot, J. Stratégies de Synthèse d'un Nouvel Antipsychotique Potentiel : Cascades Réactionnelles Palladocatalysées : Un Outil Puissant Pour La Synthèse de Structures Polycycliques Complexes et Hautement Fonctionnalisées. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, **2015**.

[272] Sikk, L.; Tammiku-Taul, J.; Burk, P. Computational Study of Copper-Free Sonogashira Cross-Coupling Reaction. *Organometallics* **2011**, *30* (21), 5656–5664. https://doi.org/10.1021/om2004817.

[273] García-Melchor, M.; Pacheco, M. C.; Nájera, C.; Lledós, A.; Ujaque, G. Mechanistic Exploration of the Pd-Catalyzed Copper-Free Sonogashira Reaction. *ACS Catal.* **2012**, *2* (1), 135–144. https://doi.org/10.1021/cs200526x.

[274] Wang, X.; Song, Y.; Qu, J.; Luo, Y. Mechanistic Insights into the Copper-Cocatalyzed Sonogashira Cross-Coupling Reaction: Key Role of an Anion. *Organometallics* **2017**, *36* (5), 1042–1048. https://doi.org/10.1021/acs.organomet.7b00010.

[275] Casalnuovo, A. L.; Calabrese, J. C. Palladium-Catalyzed Alkylations in Aqueous Media. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (11), 4324–4330. https://doi.org/10.1021/ja00167a032.

[276] Bergbreiter, D. E.; Liu, Y.-S. Water-Soluble Polymer-Bound, Recoverable Palladium(0)-Phosphine Catalysts. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (45), 7843–7846. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)10130-7.

[277] Dibowski, H.; Schmidtchen, F. P. Sonogashira Cross-Couplings Using Biocompatible Conditions in Water. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (7), 525–528. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)10674-8.

[278] Bong, D. T.; Ghadiri, M. R. Chemoselective Pd(0)-Catalyzed Peptide Coupling in Water. *Org. Lett.* **2001**, *3* (16), 2509–2511. https://doi.org/10.1021/ol016169e.

[279] Novák, Z.; Kotschy, A. First Cross-Coupling Reactions on Tetrazines. *Org. Lett.* **2003**, *5* (19), 3495–3497. https://doi.org/10.1021/ol035312w.

[280] Fitton, P.; Rick, E. A. The Addition of Aryl Halides to Tetrakis(Triphenylphosphine)Palladium(0). *J. Organomet. Chem.* **1971**, *28* (2), 287–291. https://doi.org/10.1016/S0022-328X(00)84578-7.

[281] Ros, E.; Prades, A.; Forson, D.; Smyth, J.; Verdaguer, X.; Pouplana, L. R. de; Riera, A. Synthesis of 3-Alkyl-6-Methyl-1,2,4,5-Tetrazines via a Sonogashira-Type Cross-Coupling Reaction. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (75), 11086–11089. https://doi.org/10.1039/D0CC03482G.

[282] Wieczorek, A.; Buckup, T.; Wombacher, R. Rigid Tetrazine Fluorophore Conjugates with Fluorogenic Properties in the Inverse Electron Demand Diels–Alder Reaction. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (24), 4177–4185. https://doi.org/10.1039/C4OB00245H.

[283] Wang, J.; Li, S.; Chen, H.; Hu, R.; Li, M.; Lv, F.; Liu, L.; Ma, Y.; Wang, S. An Intracellular Anchor Regulates the Distribution of Bioactive Molecules. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (73), 11004–11007. https://doi.org/10.1039/C6CC05385H.

[284] Novak, Z.; Bostai, B.; Csekei, M. Selective Nucleophilic Substitutions on Tetrazines. *Heterocycles* **2003**, *60* (12), 2653–2668. https://doi.org/10.3987/COM-03-9875.

[285] Audebert, P.; Miomandre, F.; Clavier, G.; Vernières, M.-C.; Badré, S.; Méallet-Renault, R. Synthesis and Properties of New Tetrazines Substituted by Heteroatoms: Towards the World's Smallest Organic Fluorophores. *Chem. – Eur. J.* **2005**, *11* (19), 5667–5673. https://doi.org/10.1002/chem.200401252.

[286] Schembri, L. S.; Stoddart, L. A.; Briddon, S. J.; Kellam, B.; Canals, M.; Graham, B.; Scammells, P. J. Synthesis, Biological Evaluation, and Utility of Fluorescent Ligands Targeting the μ-Opioid Receptor. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (24), 9754–9767. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01664.

[287] Wu, D.; O'Shea, D. F. Fluorogenic NIR-Probes Based on 1,2,4,5-Tetrazine Substituted BF_2-Azadipyrromethenes. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (78), 10804–10807. https://doi.org/10.1039/C7CC06545K.

[288] Yang, G.; Zhao, Z.; Wang, S.; Hu, R.; Li, S. Hydrogen Sulfide Fluorescent Probe as Well as Preparation Method and Application Thereof. CN107286186A, October 24, **2017** ; Zhao, Z.; Cao, L.; Zhang, T.; Hu, R.; Wang, S.; Li, S.; Li, Y.; Yang, G. Novel Reaction-Based Fluorescence Probes for the Detection of Hydrogen Sulfide in Living Cells. *ChemistrySelect* **2016**, *1* (11), 2581–2585. https://doi.org/10.1002/slct.201600382.

[289] Ledovskaya, M. S.; Polynski, M. V.; Ananikov, V. P. One-Pot and Two-Chamber Methodologies for Using Acetylene Surrogates in the Synthesis of Pyridazines and Their D-Labeled Derivatives. *Chem. Asian J.* **2021**, *16* (16), 2286–2297. https://doi.org/10.1002/asia.202100562.

[290] Fan, X.; Ge, Y.; Lin, F.; Yang, Y.; Zhang, G.; Ngai, W. S. C.; Lin, Z.; Zheng, S.; Wang, J.; Zhao, J.; Li, J.; Chen, P. R. Optimized Tetrazine Derivatives for Rapid Bioorthogonal Decaging in Living Cells. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2016**, *55* (45), 14046–14050. https://doi.org/10.1002/anie.201608009.

[291] Gong, Y.-H.; Audebert, P.; Clavier, G.; Miomandre, F.; Tang, J.; Badré, S.; Méallet-Renault, R.; Naidus, E. Preparation and Physicochemical Studies of New Multiple Rings S-Tetrazines. *New J. Chem.* **2008**, *32* (7), 1235–1242. https://doi.org/10.1039/B717998G.

[292] Lang Jr., S. A.; Johnson, B. D.; Cohen, E. Novel Synthesis of Unsymmetrically Substituted S-Tetrazines. *J. Heterocycl. Chem.* **1975**, *12* (6), 1143–1153. https://doi.org/10.1002/jhet.5570120612.

[293] Lang, S. A.; Johnson, B. D.; Cohen, E.; Sloboda, A. E.; Greenblatt, E. Aryl-s-Tetrazines with Antiinflammatory Activity. *J. Med. Chem.* **1976**, *19* (12), 1404–1409. https://doi.org/10.1021/jm00234a011.

[294] Lambert, W. D.; Fang, Y.; Mahapatra, S.; Huang, Z.; am Ende, C. W.; Fox, J. M. Installation of Minimal Tetrazines through Silver-Mediated Liebeskind–Srogl Coupling with Arylboronic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (43), 17068–17074. https://doi.org/10.1021/jacs.9b08677.

[295] Suh, S.-E.; Barros, S. A.; Chenoweth, D. M. Triple Aryne–Tetrazine Reaction Enabling Rapid Access to a New Class of Polyaromatic Heterocycles. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (9), 5128–5132. https://doi.org/10.1039/C5SC01726B.

[296] Knorr, G.; Kozma, E.; Herner, A.; Lemke, E. A.; Kele, P. New Red-Emitting Tetrazine-Phenoxazine Fluorogenic Labels for Live-Cell Intracellular Bioorthogonal Labeling Schemes. *Chem. – Eur. J.* **2016**, *22* (26), 8972–8979. https://doi.org/10.1002/chem.201600590.

[297] Kozma, E.; Girona, G. E.; Paci, G.; Lemke, E. A.; Kele, P. Bioorthogonal Double-Fluorogenic Siliconrhodamine Probes for Intracellular Super-Resolution Microscopy. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (50), 6696–6699. https://doi.org/10.1039/C7CC02212C.

[298] Qu, Y.; Pander, P.; Bucinskas, A.; Vasylieva, M.; Tian, Y.; Miomandre, F.; Dias, F. B.; Clavier, G.; Data, P.; Audebert, P. Convenient One-Pot Synthesis of 1,2,3,4-Thiatriazoles Towards a Novel Electron Acceptor for Highly-Efficient Thermally-Activated Delayed-Fluorescence Emitters. *Chem. – Eur. J.* **2019**, *25* (10), 2457–2462. https://doi.org/10.1002/chem.201805358.

[299] Graziotto, M. E.; Adair, L. D.; Kaur, A.; Vérité, P.; Ball, S. R.; Sunde, M.; Jacquemin, D.; New, E. J. Versatile Naphthalimide Tetrazines for Fluorogenic Bioorthogonal Labelling. *RSC Chem. Biol.* **2021**, *2* (5), 1491–1498. https://doi.org/10.1039/D1CB00128K.

[300] Yang, J.; Karver, M. R.; Li, W.; Sahu, S.; Devaraj, N. K. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2012**, *51* (21), 5222–5225.

[301] Devaraj, N. K.; Yang, J.; Seckute, J. Novel tetrazines and method of synthesizing the same, WO2013152359A1, October 10, **2013**.

[302] Navarro, L.; Berdal, M.; Chérel, M.; Pecorari, F.; Gestin, J.-F.; Guérard, F. Prosthetic Groups for Radioiodination and Astatination of Peptides and Proteins: A Comparative Study of Five Potential Bioorthogonal Labeling Strategies. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27* (1), 167–174. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.11.034.

[303] Karaki, F.; Kiguchi, T.; Itoh, K.; Sato, N.; Konishi, K.; Fujii, H. Catalyst-Free Photooxidation Reaction from 1,4-Dihydropyridazine to Pyridazine under Air. *Tetrahedron* **2021**, *97* (1), 132411–132421. https://doi.org/10.1016/j.tet.2021.132411.

[304] Battisti, U. M.; Herth, M. M.; Kjær, A.; Garcia, R. Nuclide labelled H-tetrazines and use thereof for pet and spect pretargeted imaging and radionuclide therapy. WO2021228992A1, November 18, **2021**.

[305] Gothelf, K. V.; Jørgensen, K. A. Asymmetric 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (2), 863–910. https://doi.org/10.1021/cr970324e.

[306] Padwa, A. *1, 3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*; *Wiley-Intersci. Publ. (N.Y.)*, **1984**, *1* (13), 817–818. https://doi.org.fr/10.1002/jhet.5570230658.

[307] W. Roush, Stereochemical and Synthetic Studies of the Intramolecular Diels–Alder Reaction, in Advances in Cycloaddition, *ed. D. P. Curran, JAI Press*, London, **1990**, *2* (1), 91–146.

[308] A. Padwa, I. M. Fleming, B. Trost, Intermolecular 1,3-Dipolar Cycloadditions, *Comp. Org. Synth.*, **1991**, *4* (1), 1069-1071.

[309] Michael, A.; Auf, U. D. E. V. D. Acetylendicarbonsäuremethylester. *J. Prakt. Chem.* **1893**, *48* (1), 94–95. https://doi.org/10.1002/prac.18930480114.

[310] Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem. - Int. Ed. Eng.* **1963**, *2* (10), 565–598. https://doi.org/10.1002/anie.196305651.

[311] Huisgen, R. Kinetics and Reaction Mechanisms: Selected Examples from the Experience of Forty Years. *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61* (4), 613–628. https://doi.org/10.1351/pac198961040613.

[312] Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2002**, *114* (14), 2708–2711. https://doi.org/10.1002/1521-3757(20020715)114:14<2708::AID-ANGE2708>3.0.CO;2-0.

[313] Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057–3064. https://doi.org/10.1021/jo011148j.

[314] Wu, P.; Fokin, V. V. Catalytic Azide-Alkyne Cycloaddition: Reactivity and Applications. *Aldrichimica Acta* **2007**, *40* (1), 7–17. ;Wu, P.; Fokin, V. V. Catalytic Azide—Alkyne Cycloaddition: Reactivity and Applications. *Chem. Inform.* **2007**, *38* (36), 7–17. https://doi.org/10.1002/chin.200736242.

[315] Chassaing, S.; Kumarraja, M.; Sani Souna Sido, A.; Pale, P.; Sommer, J. Click Chemistry in CuI-Zeolites: The Huisgen [3 + 2]-Cycloaddition. *Org. Lett.* **2007**, *9* (5), 883–886. https://doi.org/10.1021/ol0631152.

[316] Pachón, L. D.; van Maarseveen, J. H.; Rothenberg, G. Click Chemistry: Copper Clusters Catalyse the Cycloaddition of Azides with Terminal Alkynes. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347* (6), 811–815. https://doi.org/10.1002/adsc.200404383.

[317] Kamijo, S.; Jin, T.; Huo, Z.; Yamamoto, Y. A One-Pot Procedure for the Regiocontrolled Synthesis of Allyltriazoles via the Pd−Cu Bimetallic Catalyzed Three-Component Coupling Reaction of Nonactivated Terminal Alkynes, Allyl Carbonate, and Trimethylsilyl Azide. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (7), 2386–2393. https://doi.org/10.1021/jo035292b.

[318] Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (1), 210–216. https://doi.org/10.1021/ja0471525.

[319] Wu, Y.-M.; Deng, J.; Fang, X.; Chen, Q.-Y. Regioselective Synthesis of Fluoroalkylated [1,2,3]-Triazoles by Huisgen Cycloaddition. *J. Fluorine Chem.* **2004**, *125* (10), 1415–1423. https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2004.02.016.

[320] Pérez-Balderas, F.; Ortega-Muñoz, M.; Morales-Sanfrutos, J.; Hernández-Mateo, F.; Calvo-Flores, F. G.; Calvo-Asín, J. A.; Isac-García, J.; Santoyo-González, F. Multivalent Neoglycoconjugates by Regiospecific Cycloaddition of Alkynes and Azides Using Organic-Soluble Copper Catalysts. *Org. Lett.* **2003**, *5* (11), 1951–1954. https://doi.org/10.1021/ol034534r.

[321] Malkoch, M.; Schleicher, K.; Drockenmuller, E.; Hawker, C. J.; Russell, T. P.; Wu, P.; Fokin, V. V. Structurally Diverse Dendritic Libraries: A Highly Efficient Functionalization Approach Using Click Chemistry. *Macromolecules* **2005**, *38* (9), 3663–3678. https://doi.org/10.1021/ma047657f.

[322] Wu, P.; Feldman, A. K.; Nugent, A. K.; Hawker, C. J.; Scheel, A.; Voit, B.; Pyun, J.; Fréchet, J. M. J.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Efficiency and Fidelity in a Click-Chemistry Route to Triazole Dendrimers by the Copper(I)-Catalyzed Ligation of Azides and Alkynes. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2004**, *116* (30), 4018–4022. https://doi.org/10.1002/ange.200454078.

[323] Gujadhur, R.; Venkataraman, D.; Kintigh, J. T. Formation of Aryl-nitrogen Bonds Using a Soluble Copper(I) Catalyst. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (29), 4791–4793. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)00888-7.

[324] F. Straub, B. M-Acetylide and μ-Alkenylidene Ligands in "Click" Triazole Syntheses. *Chem. Commun.* **2007**, *0* (37), 3868–3870. https://doi.org/10.1039/B706926J.

[325] Appukkuttan, P.; Dehaen, W.; Fokin, V. V.; Van der Eycken, E. A Microwave-Assisted Click Chemistry Synthesis of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles via a Copper(I)-Catalyzed Three-Component Reaction. *Org. Lett.* **2004**, *6* (23), 4223–4225. https://doi.org/10.1021/ol048341v.

[326] Lewis, W. G.; Magallon, F. G.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. Discovery and Characterization of Catalysts for Azide−Alkyne Cycloaddition by Fluorescence Quenching. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (30), 9152–9153. https://doi.org/10.1021/ja048425z.

[327] Orgueira, H. A.; Fokas, D.; Isome, Y.; Chan, P. C.-M.; Baldino, C. M. Regioselective Synthesis of [1,2,3]-Triazoles Catalyzed by Cu(I) Generated in Situ from Cu(0) Nanosize Activated Powder and Amine Hydrochloride Salts. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (16), 2911–2914. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.02.127.

[328] Meldal, M.; Tornøe, C. W. Cu-Catalyzed Azide−Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (8), 2952–3015. https://doi.org/10.1021/cr0783479.

[329] Nolte, C.; Mayer, P.; Straub, B. F. Isolation of a Copper(I) Triazolide: A "Click" Intermediate. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2007**, *46* (12), 2101–2103. https://doi.org/10.1002/anie.200604444.

[330] Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science* **2013**, *340* (6131), 457–460. https://doi.org/10.1126/science.1229506.

[331] Jin, L.; Tolentino, D. R.; Melaimi, M.; Bertrand, G. Isolation of Bis(Copper) Key Intermediates in Cu-Catalyzed Azide-Alkyne "Click Reaction." *Sci. adv.* **2015**, *1* (5), e1500304–e1500309. https://doi.org/10.1126/sciadv.1500304.

[332] Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. CuI-Catalyzed Alkyne–Azide "Click" Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. *Eur. J. Org. Chem. 2006*, **2006** (1), 51–68. https://doi.org/10.1002/ejoc.200500483.

[333] Helms, B.; Mynar, J. L.; Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. Dendronized Linear Polymers via "Click Chemistry." *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15020–15021. https://doi.org/10.1021/ja044744e.

[334] Lee, J. W.; Kim, J. H.; Kim, B.-K.; Shin, W. S.; Jin, S.-H. Synthesis of Fréchet Type Dendritic Benzyl Propargyl Ether and Fréchet Type Triazole Dendrimer. *Tetrahedron* **2006**, *62* (5), 894–900. https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.10.039.

[335] Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Alkynes and Organic Azides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (46), 15998–15999. https://doi.org/10.1021/ja054114s.

[336] Rodionov, V. O.; Presolski, S. I.; Díaz Díaz, D.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. Ligand-Accelerated Cu-Catalyzed Azide−Alkyne Cycloaddition: A Mechanistic Report. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (42), 12705–12712. https://doi.org/10.1021/ja072679d.

[337] Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis. *Org. Lett.* **2004**, *6* (17), 2853–2855. https://doi.org/10.1021/ol0493094.

[338] Meng, J.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. Kinetic Resolution by Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (27), 4543–4546. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.05.019.

[339] Golas, P. L.; Tsarevsky, N. V.; Sumerlin, B. S.; Matyjaszewski, K. Catalyst Performance in "Click" Coupling Reactions of Polymers Prepared by ATRP: Ligand and Metal Effects. *Macromolecules* **2006**, *39* (19), 6451–6457. https://doi.org/10.1021/ma061592u.

[340] Uttamapinant, C.; Tangpeerachaikul, A.; Grecian, S.; Clarke, S.; Singh, U.; Slade, P.; Gee, K. R.; Ting, A. Y. Fast, Cell-Compatible Click Chemistry with Copper-Chelating Azides for Biomolecular Labeling. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2012**, *51* (24), 5852–5856. https://doi.org/10.1002/anie.201108181.

[341] Bevilacqua, V.; King, M.; Chaumontet, M.; Nothisen, M.; Gabillet, S.; Buisson, D.; Puente, C.; Wagner, A.; Taran, F. Copper-Chelating Azides for Efficient Click Conjugation Reactions

in Complex Media. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2014**, *126* (23), 5982–5986. https://doi.org/10.1002/ange.201310671.

[342] Su, Y.; Li, L.; Wang, H.; Wang, X.; Zhang, Z. All-in-One Azides: Empowered Click Reaction for in Vivo Labeling and Imaging of Biomolecules. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (10), 2185–2188. https://doi.org/10.1039/C5CC08466K.

[343] Feldman, A. K.; Colasson, B.; Fokin, V. V. One-Pot Synthesis of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles from In Situ Generated Azides. *Org. Lett.* **2004**, *6* (22), 3897–3899. https://doi.org/10.1021/ol048859z.

[344] Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2009**, *48* (38), 6974–6998. https://doi.org/10.1002/anie.200900942.

[345] 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. Copper-Free Click Chemistry for Dynamic in Vivo Imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (43), 16793–16797. https://doi.org/10.1073/pnas.0707090104.

[346] C. Jewett, J.; R. Bertozzi, C. Cu-Free Click Cycloaddition Reactions in Chemical Biology. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1272–1279. https://doi.org/10.1039/B901970G.

[347] Molteni, G.; Del Buttero, P. 1,3-Dipolar Cycloadditions of MeOPEG-Bounded Azides. *Tetrahedron* **2005**, *61* (21), 4983–4987. https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.03.049.

[348] Girard, C.; Önen, E.; Aufort, M.; Beauvière, S.; Samson, E.; Herscovici, J. Reusable Polymer-Supported Catalyst for the [3+2] Huisgen Cycloaddition in Automation Protocols. *Org. Lett.* **2006**, *8* (8), 1689–1692. https://doi.org/10.1021/ol060283l.

[349] Jlalia, I.; Beauvineau, C.; Beauvière, S.; Önen, E.; Aufort, M.; Beauvineau, A.; Khaba, E.; Herscovici, J.; Meganem, F.; Girard, C. Automated Synthesis of a 96 Product-Sized Library of Triazole Derivatives Using a Solid Phase Supported Copper Catalyst. *Molecules* **2010**, *15* (5), 3087–3120. https://doi.org/10.3390/molecules15053087.

[350] Li, L.; Zhang, Z. Development and Applications of the Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC) as a Bioorthogonal Reaction. *Molecules* **2016**, *21* (10), 1393–1415. https://doi.org/10.3390/molecules21101393.

[351] Ghule, V. D.; Sarangapani, R.; Jadhav, P. M.; Tewari, S. P. Quantum-Chemical Investigation of Substituted s-Tetrazine Derivatives as Energetic Materials. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2012**, *33* (2), 564–570. https://doi.org/10.5012/bkcs.2012.33.2.564.

[352] Chavez, D. E.; Hiskey, M. A. 1,2,4,5-Tetrazine Based Energetic Materials. *J. Energ. Mater.* **1999**, *17* (4), 357–377. https://doi.org/10.1080/07370659908201796.

[353] Gozin, M.; Aizikovich, A.; Shlomovich, A.; Cohen, A.; Pechersky, T. Energetic Compounds and Compositions. WO2016067292A1, May 6, **2016**.

[354] Kar, P.; Drew, M. G. B.; Gómez-García, C. J.; Ghosh, A. Coordination Polymers Containing Manganese(II)-Azido Layers Connected by Dipyridyl-Tetrazine and 4,4′-Azobis(Pyridine) Linkers. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (3), 1640–1649. https://doi.org/10.1021/ic302548z.

[355] Lin, C.-H.; Lieber, E.; Horwitz, J. P. The Synthesis of Sym-Diaminotetrazine1a,1b. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76* (2), 427–430. https://doi.org/10.1021/ja01631a031.

[356] Weinreb, S. M.; Bohle, M. Product Class 3: Six-Membered Hetarenes with More Than Three Heteroatoms, *2004th ed.; Thieme Verlag*, **2004**, *17* (2), 585–597. https://doi.org/10.1055/sos-SD-017-00928.

[357] Li, Z.; Wang, D.; Li, L.; Pan, S.; Na, Z.; Tan, C. Y. J.; Yao, S. Q. "Minimalist" Cyclopropene-Containing Photo-Cross-Linkers Suitable for Live-Cell Imaging and Affinity-Based Protein Labeling. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (28), 9990–9998. https://doi.org/10.1021/ja502780z.

[358] Kramer, J. R.; Onoa, B.; Bustamante, C.; Bertozzi, C. R. Chemically Tunable Mucin Chimeras Assembled on Living Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, *112* (41), 12574–12579. https://doi.org/10.1073/pnas.1516127112.

[359] Pan, S.; Jang, S.-Y.; Wang, D.; Liew, S. S.; Li, Z.; Lee, J.-S.; Yao, S. Q. A Suite of "Minimalist" Photo-Crosslinkers for Live-Cell Imaging and Chemical Proteomics: Case Study with BRD4 Inhibitors. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2017**, *56* (39), 11816–11821. https://doi.org/10.1002/anie.201706076.

[360] Yoo, J. S.; Bhise, A.; Lee, W. H. Immuno-Conjugates And Uses Thereof. KR20200125472A, November 4, **2020**.

[361] Li, J.; Chen, M.; Liu, Z.; Zhang, L.; Felding, B. H.; Moremen, K. W.; Lauvau, G.; Abadier, M.; Ley, K.; Wu, P. A Single-Step Chemoenzymatic Reaction for the Construction of Antibody–Cell Conjugates. *ACS Cent. Sci.* **2018**, *4* (12), 1633–1641. https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00552.

[362] Lee, W.; Sarkar, S.; Pal, R.; Kim, J. Y.; Park, H.; Huynh, P. T.; Bhise, A.; Bobba, K. N.; Kim, K. I.; Ha, Y. S.; Soni, N.; Kim, W.; Lee, K.; Jung, J.-M.; Rajkumar, S.; Lee, K. C.; Yoo, J. Successful Application of CuAAC Click Reaction in Constructing ^{64}Cu-Labeled Antibody Conjugates for Immuno-PET Imaging. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, *4* (3), 2544–2557. https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01555.

[363] Walker, J. A.; Bohn, J. J.; Ledesma, F.; Sorkin, M. R.; Kabaria, S. R.; Thornlow, D. N.; Alabi, C. A. Substrate Design Enables Heterobifunctional, Dual "Click" Antibody Modification via Microbial Transglutaminase. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30* (9), 2452–2457. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00522.

[364] Gulumkar, V.; Tähtinen, V.; Ali, A.; Rahkila, J.; Valle-Delgado, J. J.; Äärelä, A.; Österberg, M.; Yliperttula, M.; Virta, P. Synthesis of an Azide- and Tetrazine-Functionalized [60]Fullerene and Its Controlled Decoration with Biomolecules. *ACS Omega* **2022**, *7* (1), 1329–1336. https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05955.

[365] Meinecke, J.; Koert, U. Copper-Free Click Reaction Sequence: A Chemoselective Layer-by-Layer Approach. *Org. Lett.* **2019**, *21* (18), 7609–7612. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b02891.

[366] Ershov, V. A.; Postovskii, I. Ya, s-Tetrazine chemistry. IV. Azide-tetrazole tautomerism of s-tetrazine monoazides, *Khim. Geterotsikl. Soedin.*, **1971**, 7(5), 711-715.

[367] Duddu, R.; Dave, P. R.; Damavarapu, R.; Surapaneni, R.; Gilardi, R.; Parrish, D. Synthesis of Azido Heterocycles. *Synth. Commun.* **2008**, *38* (5), 767–774. https://doi.org/10.1080/00397910701820459. ; Duddu, R.; Dave, P.; Damavarapu, R.; Surapaneni, R. Synthesis of Azido Heterocycles. US8153786B1, April 10, **2012**.

[368] Mboyi, C. D.; Vivier, D.; Daher, A.; Fleurat-Lessard, P.; Cattey, H.; Devillers, C. H.; Bernhard, C.; Denat, F.; Roger, J.; Hierso, J.-C. Bridge-Clamp Bis(Tetrazine)s with [N]8 π-Stacking Interactions and Azido-s-Aryl Tetrazines: Two Classes of Doubly Clickable Tetrazines. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2020**, *59* (3), 1149–1154. https://doi.org/10.1002/anie.201911947.

[369] Devaraj, N. K.; Karver, M. R.; Hilderbrand, S. a; Weissleder, R. Functionalized 1,2,4,5-Tetrazine Compounds for Use in Bioorthogonal Coupling Reactions. WO2014065860A1, May 1, **2014**.

[370] Syvänen, S.; Fang, X. T.; Faresjö, R.; Rokka, J.; Lannfelt, L.; Olberg, D. E.; Eriksson, J.; Sehlin, D. Fluorine-18 Labeled Antibody Ligands for PET Imaging of Amyloid-β in Brain. *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, *11* (24), 4460–4468. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.0c00652.

[371] Da Pieve, C.; Allott, L.; Martins, C. D.; Vardon, A.; Ciobota, D. M.; Kramer-Marek, G.; Smith, G. Efficient [^{18}F]AlF Radiolabeling of ZHER3:8698 Affibody Molecule for Imaging of HER3 Positive Tumors. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (8), 1839–1849. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00259.

[372] Cui, M.; Liu, B.; Zhang, X. 1,2,4,5-Tetrazine Compound for Bioorthogonal Reaction as Well as Preparation Method and Application Thereof. CN107522673A, December 29, **2017**.

[373] Zhang, P.; Gao, D.; An, K.; Shen, Q.; Wang, C.; Zhang, Y.; Pan, X.; Chen, X.; Lyv, Y.; Cui, C.; Liang, T.; Duan, X.; Liu, J.; Yang, T.; Hu, X.; Zhu, J.-J.; Xu, F.; Tan, W. A Programmable Polymer Library That Enables the Construction of Stimuli-Responsive Nanocarriers Containing Logic Gates. *Nat. Chem.* **2020**, *12* (4), 381–390. https://doi.org/10.1038/s41557-020-0426-3.

[374] Deutsch, H. M.; Ye, X.; Shi, Q.; Liu, Z.; Schweri, M. M. Synthesis and Pharmacology of Site Specific Cocaine Abuse Treatment Agents: A New Synthetic Methodology for Methylphenidate Analogs Based on the Blaise Reaction. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36* (4), 303–311. https://doi.org/10.1016/S0223-5234(01)01230-2.

[375] Epple, R.; Cow, C.; Azimioara, M.; Russo, R.; Xie, Y.; Wang, X. Compounds and Compositions as Ppar Modulators. WO2007056366A2, May 18, **2007**.

[376] Gong, Q.; Wu, H.; Dong, P. Preparation Method of BODIPY-Tetrazine Bio-Orthogonal Probe. CN108997402A, December 14, **2018**.

[377] Hansell, C. F.; Lu, A.; Patterson, J. P.; O'Reilly, R. K. Exploiting the Tetrazine–Norbornene Reaction for Single Polymer Chain Collapse. *Nanoscale* **2014**, *6* (8), 4102–4107. https://doi.org/10.1039/C3NR06706H.

[378] Lorenzo, M. M.; Decker, C. G.; Kahveci, M. U.; Paluck, S. J.; Maynard, H. D. Homodimeric Protein–Polymer Conjugates via the Tetrazine–Trans-Cyclooctene Ligation. *Macromolecules* **2016**, *49* (1), 30–37. https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b02323.

[379] Werther, P.; Möhler, J. S.; Wombacher, R. A Bifunctional Fluorogenic Rhodamine Probe for Proximity-Induced Bioorthogonal Chemistry. *Chem. – Eur. J.* **2017**, *23* (72), 18216–18224. https://doi.org/10.1002/chem.201703607.

[380] Sen, R.; Gahtory, D.; Escorihuela, J.; Firet, J.; Pujari, S. P.; Zuilhof, H. Approach Matters: The Kinetics of Interfacial Inverse-Electron Demand Diels–Alder Reactions. *Chem. – Eur. J.* **2017**, *23* (53), 13015–13022. https://doi.org/10.1002/chem.201703103.

[381] Macias-Contreras, M.; He, H.; Little, K. N.; Lee, J. P.; Campbell, R. P.; Royzen, M.; Zhu, L. SNAP/CLIP-Tags and Strain-Promoted Azide–Alkyne Cycloaddition (SPAAC)/Inverse Electron Demand Diels–Alder (IEDDA) for Intracellular Orthogonal/Bioorthogonal Labeling. *Bioconjugate Chem.* **2020**, *31* (5), 1370–1381. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00107.

C. Chapitre 3

[382] Bratteby, K.; Shalgunov, V.; Battisti, U. M.; Petersen, I. N.; van den Broek, S. L.; Ohlsson, T.; Gillings, N.; Erlandsson, M.; Herth, M. M. Insights into Elution of Anion Exchange Cartridges: Opening the Path toward Aliphatic ^{18}F-Radiolabeling of Base-Sensitive Tracers. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2021**, *4* (5), 1556–1566. https://doi.org/10.1021/acsptsci.1c00133.

[383] Andersen, I. V.; García-Vázquez, R.; Battisti, U. M.; Herth, M. M. Optimization of Direct Aromatic ^{18}F-Labeling of Tetrazines. *Molecules* **2022**, *27* (13), 4022–4033. https://doi.org/10.3390/molecules27134022.

[384] Bratteby, K.; Shalgunov, V.; Herth, M. M. Aliphatic ^{18}F-Radiofluorination: Recent Advances in the Labeling of Base-Sensitive Substrates. *ChemMedChem* **2021**, *16* (17), 2612–2622. https://doi.org/10.1002/cmdc.202100303.

[385] Nickerl, G.; Senkovska, I.; Kaskel, S. Tetrazine Functionalized Zirconium MOF as an Optical Sensor for Oxidizing Gases. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (12), 2280–2282. https://doi.org/10.1039/C4CC08136F.

[386] Ortiz-Gomez, I.; Ortega-Muñoz, M.; Salinas-Castillo, A. Álvarez-Bermejo, J. A.; Ariza-Avidad, M.; de Orbe-Payá, I.; Santoyo-Gonzalez, F.; Capitan-Vallvey, L. F. Tetrazine-Based Chemistry for Nitrite Determination in a Paper Microfluidic Device. *Talanta* **2016**, *160* (1), 721–728. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.08.021.

[387] Razavi, S. A. A.; Masoomi, M. Y.; Morsali, A. Stimuli-Responsive Metal–Organic Framework (MOF) with Chemo-Switchable Properties for Colorimetric Detection of $CHCl_3$. *Chem. – Eur. J.* **2017**, *23* (51), 12559–12564. https://doi.org/10.1002/chem.201702127.

[388] Vallabhajosula S., Springer: Dordrecht, **2009**. ; Clanton, J.; Sandler, M. P. Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT. *J. Nucl. Med.* **2010**, *51* (4), 660–661. https://doi.org/10.2967/jnumed.109.072645.

D. Chapitre 4

[389] *Cancer*. https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer (consulté le 2022-03-01).

[390] Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Fuchs, H. E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71* (1), 7–33. https://doi.org/10.3322/caac.21654.

[391] Perou, C. M.; Sørlie, T.; Eisen, M. B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S. S.; Rees, C. A.; Pollack, J. R.; Ross, D. T.; Johnsen, H.; Akslen, L. A.; Fluge, Ø.; Pergamenschikov, A.; Williams, C.; Zhu, S. X.; Lønning, P. E.; Børresen-Dale, A.-L.; Brown, P. O.; Botstein, D. Molecular Portraits of Human Breast Tumours. *Nature* **2000**, *406* (6797), 747–752. https://doi.org/10.1038/35021093.

[392] Cornelio, D. B.; Roesler, R.; Schwartsmann, G. Gastrin-Releasing Peptide Receptor as a Molecular Target in Experimental Anticancer Therapy. *Ann. Oncol.* **2007**, *18* (9), 1457–1466. https://doi.org/10.1093/annonc/mdm058.

[393] Moody, T. GRPR (Gastrin-Releasing Peptide Receptor). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* **2014**, *18* (10), 711–714. https://doi.org/10.4267/2042/54130.

[394] Dalm, S. U.; Verzijlbergen, J. F.; De Jong, M. Review: Receptor Targeted Nuclear Imaging of Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (2), 260–278. https://doi.org/10.3390/ijms18020260.

[395] Santos-Cuevas, C. L.; Ferro-Flores, G.; Arteaga de Murphy, C.; Pichardo-Romero, P. A. Targeted Imaging of Gastrin-Releasing Peptide Receptors with 99mTc-EDDA/HYNIC-[Lys3]-Bombesin: Biokinetics and Dosimetry in Women. *Nucl. Med. Commun.* **2008**, *29* (8), 741–747. https://doi.org/10.1097/MNM.0b013e3282ffb45c.

[396] De Vincentis, G.; Scopinaro, F.; Varvarigou, A.; Ussof, W.; Schillaci, O.; Archimandritis, S.; Corleto, V.; Longo, F.; Fave, G. D. Phase I Trial of Technetium [Leu13] Bombesin as Cancer Seeking Agent: Possible Scintigraphic Guide for Surgery? *Tumori J.* **2002**, *88* (3), S28–S30. https://doi.org/10.1177/030089160208800332.

[397] Kramer, G.; Steiner, G. E.; Gröbl, M.; Hrachowitz, K.; Reithmayr, F.; Paucz, L.; Newman, M.; Madersbacher, S.; Gruber, D.; Susani, M.; Marberger, M. Response to Sublethal Heat Treatment of Prostatic Tumor Cells and of Prostatic Tumor Infiltrating T-Cells. *The Prostate* **2004**, *58* (2), 109–120. https://doi.org/10.1002/pros.10314.

[398] Kelley, M. J.; Linnoila, R. I.; Avis, I. L.; Georgiadis, M. S.; Cuttitta, F.; Mulshine, J. L.; Johnson, B. E. Antitumor Activity of a Monoclonal Antibody Directed Against Gastrin-Releasing Peptide in Patients With Small Cell Lung Cancer. *Chest* **1997**, *112* (1), 256–261. https://doi.org/10.1378/chest.112.1.256.

[399] Gandhi, L.; Camidge, D. R.; Ribeiro de Oliveira, M.; Bonomi, P.; Gandara, D.; Khaira, D.; Hann, C. L.; McKeegan, E. M.; Litvinovich, E.; Hemken, P. M.; Dive, C.; Enschede, S. H.; Nolan, C.; Chiu, Y.-L.; Busman, T.; Xiong, H.; Krivoshik, A. P.; Humerickhouse, R.; Shapiro, G. I.; Rudin, C. M. Phase I Study of Navitoclax (ABT-263), a Novel Bcl-2 Family Inhibitor, in

Patients With Small-Cell Lung Cancer and Other Solid Tumors. *JCO* **2011**, *29* (7), 909–916. https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.6208.

[400] Rudin, C. M.; Hann, C. L.; Garon, E. B.; Ribeiro de Oliveira, M.; Bonomi, P. D.; Camidge, D. R.; Chu, Q.; Giaccone, G.; Khaira, D.; Ramalingam, S. S.; Ranson, M. R.; Dive, C.; McKeegan, E. M.; Chyla, B. J.; Dowell, B. L.; Chakravartty, A.; Nolan, C. E.; Rudersdorf, N.; Busman, T. A.; Mabry, M. H.; Krivoshik, A. P.; Humerickhouse, R. A.; Shapiro, G. I.; Gandhi, L. Phase II Study of Single-Agent Navitoclax (ABT-263) and Biomarker Correlates in Patients with Relapsed Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18* (11), 3163–3169. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3090.

[401] Sjölund, K.; Fasth, S.; Ekman, R.; Hultén, L.; Jiborn, H.; Nordgren, S.; Sundler, F. Neuropeptides in Idiopathic Chronic Constipation (Slow Transit Constipation). *Neurogastroenterol. Motil.* **1997**, *9* (3), 143–150. https://doi.org/10.1046/j.1365-2982.1997.d01-46.x.

[402] Schwartsmann, G.; DiLeone, L. P.; Horowitz, M.; Schunemann, D.; Cancella, A.; Pereira, A. S.; Richter, M.; Souza, F.; da Rocha, A. B.; Souza, F. H.; Pohlmann, P.; De Nucci, G. A Phase I Trial of the Bombesin/Gastrin-Releasing Peptide (BN/GRP) Antagonist RC3095 in Patients with Advanced Solid Malignancies. *Invest. New Drugs* **2006**, *24* (5), 403–412. https://doi.org/10.1007/s10637-006-6886-5.

[403] Markwalder, R.; Reubi, J. C. Gastrin-Releasing Peptide Receptors in the Human Prostate: Relation to Neoplastic Transformation. *Cancer Res.* **1999**, *59* (5), 1152–1159.

[404] Sun, B.; Schally, A. V.; Halmos, G. The Presence of Receptors for Bombesin/GRP and MRNA for Three Receptor Subtypes in Human Ovarian Epithelial Cancers. *Regul. Pept.* **2000**, *90* (1), 77–84. https://doi.org/10.1016/S0167-0115(00)00114-2.

[405] Fleischmann, A.; Waser, B.; Gebbers, J.-O.; Reubi, J. C. Gastrin-Releasing Peptide Receptors in Normal and Neoplastic Human Uterus: Involvement of Multiple Tissue Compartments. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90* (8), 4722–4729. https://doi.org/2019041121560650700.

[406] Reubi, C.; Gugger, M.; Waser, B. Co-Expressed Peptide Receptors in Breast Cancer as a Molecular Basis for in Vivo Multireceptor Tumour Targeting. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2002**, *29* (7), 855–862. https://doi.org/10.1007/s00259-002-0794-5.

[407] Gugger, M.; Reubi, J. C. Gastrin-Releasing Peptide Receptors in Non-Neoplastic and Neoplastic Human Breast. *Am. J. Pathol.* **1999**, *155* (6), 2067–2076. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65525-3.

[408] Dalm, S. U.; Martens, J. W. M.; Sieuwerts, A. M.; Deurzen, C. H. M. van; Koelewijn, S. J.; Blois, E. de; Maina, T.; Nock, B. A.; Brunel, L.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Jong, M. de; Melis, M. In Vitro and In Vivo Application of Radiolabeled Gastrin-Releasing Peptide Receptor Ligands in Breast Cancer. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56* (5), 752–757. https://doi.org/10.2967/jnumed.114.153023.

[409] Dalm, S. U.; Sieuwerts, A. M.; Look, M. P.; Melis, M.; Deurzen, C. H. M. van; Foekens, J. A.; Jong, M. de; Martens, J. W. M. Clinical Relevance of Targeting the Gastrin-Releasing Peptide Receptor, Somatostatin Receptor 2, or Chemokine C-X-C Motif Receptor 4 in Breast Cancer for Imaging and Therapy. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56* (10), 1487–1493. https://doi.org/10.2967/jnumed.115.160739.

[410] Nomura, N.; Pastorino, S.; Jiang, P.; Lambert, G.; Crawford, J. R.; Gymnopoulos, M.; Piccioni, D.; Juarez, T.; Pingle, S. C.; Makale, M.; Kesari, S. Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA) Expression in Primary Gliomas and Breast Cancer Brain Metastases. *Cancer Cell Int.* **2014**, *14* (1), 26–34. https://doi.org/10.1186/1475-2867-14-26.

[411] Evans, J. C.; Malhotra, M.; Cryan, J. F.; O'Driscoll, C. M. The Therapeutic and Diagnostic Potential of the Prostate Specific Membrane Antigen/Glutamate Carboxypeptidase II (PSMA/GCPII) in Cancer and Neurological Disease. *Br. J. Pharmacol.* **2016**, *173* (21), 3041–3079. https://doi.org/10.1111/bph.13576.

[412] Visser, M. de; Weerden, W. M. van; Ridder, C. M. A. de; Reneman, S.; Melis, M.; Krenning, E. P.; Jong, M. de. Androgen-Dependent Expression of the Gastrin-Releasing Peptide Receptor in Human Prostate Tumor Xenografts. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48* (1), 88–93.

[413] Lappano, R.; Jacquot, Y.; Maggiolini, M. GPCR Modulation in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (12), 3840–3876. https://doi.org/10.3390/ijms19123840.

[414] Bednarova, S.; Lindenberg, M. L.; Vinsensia, M.; Zuiani, C.; Choyke, P. L.; Turkbey, B. Positron Emission Tomography (PET) in Primary Prostate Cancer Staging and Risk Assessment. *Transl. Androl. Urol.* **2017**, *6* (3), 41323–41423. https://doi.org/10.21037/tau.2017.03.53.

[415] Liolios, C.; Sachpekidis, C.; Schäfer, M.; Kopka, K. Bispecific Radioligands Targeting Prostate-Specific Membrane Antigen and Gastrin-Releasing Peptide Receptors on the Surface of Prostate Cancer Cells. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **2019**, *62* (8), 510–522. https://doi.org/10.1002/jlcr.3749.

[416] Schollhammer, R.; De Clermont Gallerande, H.; Yacoub, M.; Quintyn Ranty, M.-L.; Barthe, N.; Vimont, D.; Hindié, E.; Fernandez, P.; Morgat, C. Comparison of the Radiolabeled PSMA-Inhibitor ^{111}In-PSMA-617 and the Radiolabeled GRPR Antagonist ^{111}In-RM2 in Primary Prostate Cancer Samples. *EJNMMI Res.* **2019**, *9* (1), 52–59. https://doi.org/10.1186/s13550-019-0517-6.

[417] Hoberück, S.; Michler, E.; Wunderlich, G.; Löck, S.; Hölscher, T.; Froehner, M.; Braune, A.; Ivan, P.; Seppelt, D.; Zöphel, K.; Kotzerke, J. ^{68}Ga-RM2 PET in PSMA- Positive and -Negative Prostate Cancer Patients. *Nuklearmedizin* **2019**, *58* (5), 352–362. https://doi.org/10.1055/a-0990-8898.

[418] Cultrara, C. N.; Shah, S.; Antuono, G.; Heller, C. J.; Ramos, J. A.; Samuni, U.; Zilberberg, J.; Sabatino, D. Size Matters: Arginine-Derived Peptides Targeting the PSMA Receptor Can Efficiently Complex but Not Transfect SiRNA. *Mol. Ther. Nucleic. Acids* **2019**, *18*, 863–870. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.10.013.

[419] Yordanova, A.; Linden, P.; Hauser, S.; Feldmann, G.; Brossart, P.; Fimmers, R.; Essler, M.; Holdenrieder, S.; Ahmadzadehfar, H. The Value of Tumor Markers in Men with Metastatic Prostate Cancer Undergoing [^{177}Lu]Lu-PSMA Therapy. *The Prostate* **2020**, *80* (1), 17–27. https://doi.org/10.1002/pros.23912.

[420] Liolios, C.; Koutsikou, T. S.; Salvanou, E.-A.; Kapiris, F.; Machairas, E.; Stampolaki, M.; Kolocouris, A.; Efthimiadou, E. K.; Bouziotis, P. Synthesis and in Vitro Proof-of-Concept Studies on Bispecific Iron Oxide Magnetic Nanoparticles Targeting PSMA and GRP Receptors for PET/MR Imaging of Prostate Cancer. *Int. J. Pharm.* **2022**, *624*, 122008–122022. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122008.

[421] Giovacchini, G.; Giovannini, E.; Riondato, M.; Ciarmiello, A. Radiopharmaceuticals for the Diagnosis and Therapy of Neuroendocrine Differentiated Prostate Cancer. *Curr. Radiopharm.* **2017**, *10* (1), 6–15. https://doi.org/10.2174/1874471009666161229123126.

[422] Bandari, R. P.; Jiang, Z.; Reynolds, T. S.; Bernskoetter, N. E.; Szczodroski, A. F.; Bassuner, K. J.; Kirkpatrick, D. L.; Rold, T. L.; Sieckman, G. L.; Hoffman, T. J.; Connors, J. P.; Smith, C. J. Synthesis and Biological Evaluation of Copper-64 Radiolabeled [DUPA-6-Ahx-(NODA-GA)-5-Ava-BBN(7-14)NH_2], a Novel Bivalent Targeting Vector Having Affinity for Two Distinct Biomarkers (GRPr/PSMA) of Prostate Cancer. *Nucl. Med. Biol.* **2014**, *41* (4), 355–363. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2014.01.001.

[423] Lebacq-Verheyden, A.-M.; Bertness, V.; Kirsch, I.; Hollis, G. F.; McBride, O. W.; Battey, J. Human Gastrin-Releasing Peptide Gene Maps to Chromosome Band 18q21. *Somat. Cell. Mol. Genet.* **1987**, *13* (1), 81–86. https://doi.org/10.1007/BF02422302.

[424] Justice, M. J.; Gilbert, B. J.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Buchberg, A. M.; Ceci, J. D.; Matsuda, Y.; Chapman, V. M.; Patriotis, C.; Makris, A.; Tsichlis, P. N.; Jenkins, N. A.; Copeland, N. G. A Molecular Genetic Linkage Map of Mouse Chromosome 18 Reveals Extensive Linkage Conservation with Human Chromosomes 5 and 18. *Genomics* **1992**, *13* (4), 1281–1288. https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90047-V.

[425] Anastasi, A.; Erspamer, V.; Bucci, M. Isolation and Amino Acid Sequences of Alytesin and Bombesin, Two Analogous Active Tetradecapeptides from the Skin of European Discoglossid Frogs. *Arch. Biochem. Biophys.* **1972**, *148* (2), 443–446. https://doi.org/10.1016/0003-9861(72)90162-2.

[426] Smith, C. J.; Volkert, W. A.; Hoffman, T. J. Gastrin Releasing Peptide (GRP) Receptor Targeted Radiopharmaceuticals: A Concise Update. *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30* (8), 861–868. https://doi.org/10.1016/S0969-8051(03)00116-1.

[427] Jensen, R. T.; Battey, J. F.; Spindel, E. R.; Benya, R. V. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian Bombesin Receptors: Nomenclature, Distribution, Pharmacology, Signaling, and Functions in Normal and Disease States. *Pharmacol. Rev.* **2008**, *60* (1), 1–42. https://doi.org/10.1124/pr.107.07108.

[428] Roesler, R.; Schwartsmann, G. Gastrin-Releasing Peptide Receptors in the Central Nervous System: Role in Brain Function and as a Drug Target. *Front. Endocrinol.* **2012**, *159* (3), 1–12. https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00159.

[429] Laukkanen, M. O.; Castellone, M. D. Gastrin-Releasing Peptide Receptor Targeting in Cancer Treatment: Emerging Signaling Networks and Therapeutic Applications. *Curr. Drug Targets* **2016**, *17* (5), 508–514. https://doi.org/10.2174/1389450116666151001112130.

[430] Roesler, R.; Luft, T.; Schwartsmann, G. Targeting the Gastrin-Releasing Peptide Receptor Pathway to Treat Cognitive Dysfunction Associated with Alzheimer's Disease. *Dement. neuropsychol.* **2007**, *1*, 118–123. https://doi.org/10.1590/S1980-57642008DN10200002.

[431] Roesler, R.; Kent, P.; Luft, T.; Schwartsmann, G.; Merali, Z. Gastrin-Releasing Peptide Receptor Signaling in the Integration of Stress and Memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* **2014**, *112*, 44–52. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.08.013.

[432] Mansi, R.; Wang, X.; Forrer, F.; Kneifel, S.; Tamma, M.-L.; Waser, B.; Cescato, R.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R. Evaluation of a 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-Tetraacetic Acid–Conjugated Bombesin-Based Radioantagonist for the Labeling with Single-Photon Emission Computed Tomography, Positron Emission Tomography, and Therapeutic Radionuclides. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15* (16), 5240–5249. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-3145.

[433] Ischia, J.; Patel, O.; Shulkes, A.; Baldwin, G. S. Gastrin-Releasing Peptide: Different Forms, Different Functions. *BioFactors* **2009**, *35* (1), 69–75. https://doi.org/10.1002/biof.10.

[434] Tokita, K.; Katsuno, T.; Hocart, S. J.; Coy, D. H.; Llinares, M.; Martinez, J.; Jensen, R. T. Molecular Basis for Selectivity of High Affinity Peptide Antagonists for the Gastrin-Releasing Peptide Receptor. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (39), 36652–36663. https://doi.org/10.1074/jbc.M104566200.

[435] Coy, D. H.; Heinz-Erian, P.; Jiang, N. Y.; Sasaki, Y.; Taylor, J.; Moreau, J. P.; Wolfrey, W. T.; Gardner, J. D.; Jensen, R. T. Probing Peptide Backbone Function in Bombesin. A Reduced Peptide Bond Analogue with Potent and Specific Receptor Antagonist Activity. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263* (11), 5056–5060. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)60678-7.

[436] Lantry, L. E.; Cappelletti, E.; Maddalena, M. E.; Fox, J. S.; Feng, W.; Chen, J.; Thomas, R.; Eaton, S. M.; Bogdan, N. J.; Arunachalam, T.; Reubi, J. C.; Raju, N.; Metcalfe, E. C.; Lattuada, L.; Linder, K. E.; Swenson, R. E.; Tweedle, M. F.; Nunn, A. D. 177Lu-AMBA: Synthesis and Characterization of a Selective 177Lu-Labeled GRP-R Agonist for Systemic Radiotherapy of Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.* **2006**, *47* (7), 1144–1152.

[437] Schuhmacher, J.; Zhang, H.; Doll, J.; Mäcke, H. R.; Matys, R.; Hauser, H.; Henze, M.; Haberkorn, U.; Eisenhut, M. GRP Receptor-Targeted PET of a Rat Pancreas Carcinoma Xenograft in Nude Mice with a ^{68}Ga-Labeled Bombesin(6–14) Analog. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46* (4), 691–699.

[438] Marsouvanidis, P. J.; Maina, T.; Sallegger, W.; Krenning, E. P.; de Jong, M.; Nock, B. A. Tumor Diagnosis with New 111In-Radioligands Based on Truncated Human Gastrin Releasing Peptide Sequences: Synthesis and Preclinical Comparison. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (21), 8579–8587. https://doi.org/10.1021/jm4010237.

[439] Azay, J.; Nagain, C.; Llinares, M.; Devin, C.; Fehrentz, J. A.; Bernad, N.; Roze, C.; Martinez, J. Comparative Study of In Vitro and In Vivo Activities of Bombesin Pseudopeptide Analogs Modified on the C-Terminal Dipeptide Fragment. *Peptides* **1998**, *19* (1), 57–63. https://doi.org/10.1016/S0196-9781(97)00275-1.

[440] Biddlecombe, G. B.; Rogers, B. E.; de Visser, M.; Parry, J. J.; de Jong, M.; Erion, J. L.; Lewis, J. S. Molecular Imaging of Gastrin-Releasing Peptide Receptor-Positive Tumors in Mice Using 64Cu- and 86Y-DOTA−(Pro1,Tyr4)-Bombesin(1−14). *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18* (3), 724–730. https://doi.org/10.1021/bc0602811.

[441] G. Correia, J. D.; Paulo, A.; D. Raposinho, P.; Santos, I. Radiometallated Peptides for Molecular Imaging and Targeted Therapy. *Dalton Trans.* **2011**, *40* (23), 6144–6167. https://doi.org/10.1039/C0DT01599G.

[442] Wieser, G.; Popp, I.; Mansi, R.; Grosu, A.; Schultze-Seemann, W.; Maecke, H.; Müller, A.; Weber, W.; Meyer, P. GRPR Antagonist 68Ga-RM2 as PET Tracer for Imaging Prostate Cancer: Initial Experiences. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55* (supplement 1), 17–17.

[443] Varasteh, Z.; Velikyan, I.; Lindeberg, G.; Sörensen, J.; Larhed, M.; Sandström, M.; Selvaraju, R. K.; Malmberg, J.; Tolmachev, V.; Orlova, A. Synthesis and Characterization of a High-Affinity NOTA-Conjugated Bombesin Antagonist for GRPR-Targeted Tumor Imaging. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24* (7), 1144–1153. https://doi.org/10.1021/bc300659k.

[444] Wagh, N. K.; Zhou, Z.; Ogbomo, S. M.; Shi, W.; Brusnahan, S. K.; Garrison, J. C. Development of Hypoxia Enhanced ^{111}In-Labeled Bombesin Conjugates: Design, Synthesis, and *In Vitro* Evaluation in PC-3 Human Prostate Cancer. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23* (3), 527–537. https://doi.org/10.1021/bc200600w.

[445] Abiraj, K.; Mansi, R.; Tamma, M.-L.; Fani, M.; Forrer, F.; Nicolas, G.; Cescato, R.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R. Bombesin Antagonist–Based Radioligands for Translational Nuclear Imaging of Gastrin-Releasing Peptide Receptor–Positive Tumors. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52* (12), 1970–1978. https://doi.org/10.2967/jnumed.111.094375.

[446] Pan, D.; Xu, Y. P.; Yang, R. H.; Wang, L.; Chen, F.; Luo, S.; Yang, M.; Yan, Y. A New 68Ga-Labeled BBN Peptide with a Hydrophilic Linker for GRPR-Targeted Tumor Imaging. *Amino Acids* **2014**, *46* (6), 1481–1489. https://doi.org/10.1007/s00726-014-1718-y.

[447] Gourni, E.; Mansi, R.; Jamous, M.; Waser, B.; Smerling, C.; Burian, A.; Buchegger, F.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R. N-Terminal Modifications Improve the Receptor Affinity and Pharmacokinetics of Radiolabeled Peptidic Gastrin-Releasing Peptide Receptor Antagonists: Examples of 68Ga- and 64Cu-Labeled Peptides for PET Imaging. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55* (10), 1719–1725. https://doi.org/10.2967/jnumed.114.141242.

[448] Sun, Y.; Ma, X.; Zhang, Z.; Sun, Z.; Loft, M.; Ding, B.; Liu, C.; Xu, L.; Yang, M.; Jiang, Y.; Liu, J.; Xiao, Y.; Cheng, Z.; Hong, X. Preclinical Study on GRPR-Targeted 68Ga-Probes for PET Imaging of Prostate Cancer. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (8), 1857–1864. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00279.

[449] Maina, T.; Bergsma, H.; Kulkarni, H. R.; Mueller, D.; Charalambidis, D.; Krenning, E. P.; Nock, B. A.; de Jong, M.; Baum, R. P. Preclinical and First Clinical Experience with the Gastrin-Releasing Peptide Receptor-Antagonist [68Ga]SB3 and PET/CT. *Eur. J. Nucl. Med. Mol Imaging* **2016**, *43* (5), 964–973. https://doi.org/10.1007/s00259-015-3232-1.

[450] Pujatti, P. B.; Massicano, A. V. F.; Mengatti, J.; de Araújo, E. B. Preparation of [In-111]-Labeled-DTPA-Bombesin Conjugates at High Specific Activity and Stability: Evaluation of Labeling Parameters and Potential Stabilizers. *Appl. Radiat. Isot.* **2012**, *70* (5), 856–863. https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2012.02.064.

[451] Akbar, M. J.; Ferreira, P. C. L.; Giorgetti, M.; Stokes, L.; Morris, C. J. Bombesin Receptor-Targeted Liposomes for Enhanced Delivery to Lung Cancer Cells. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2019**, *10* (1), 2553–2562. https://doi.org/10.3762/bjnano.10.246.

[452] Nock, B. A.; Kaloudi, A.; Lymperis, E.; Giarika, A.; Kulkarni, H. R.; Klette, I.; Singh, A.; Krenning, E. P.; Jong, M. de; Maina, T.; Baum, R. P. Theranostic Perspectives in Prostate Cancer with the Gastrin-Releasing Peptide Receptor Antagonist NeoBOMB1: Preclinical and First Clinical Results. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (1), 75–80. https://doi.org/10.2967/jnumed.116.178889.

[453] Lau, J.; Rousseau, E.; Zhang, Z.; Uribe, C. F.; Kuo, H.-T.; Zeisler, J.; Zhang, C.; Kwon, D.; Lin, K.-S.; Bénard, F. Positron Emission Tomography Imaging of the Gastrin-Releasing Peptide Receptor with a Novel Bombesin Analogue. *ACS Omega* **2019**, *4* (1), 1470–1478. https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03293.

[454] Wang, L.; Zhang, Z.; Merkens, H.; Zeisler, J.; Zhang, C.; Roxin, A.; Tan, R.; Bénard, F.; Lin, K.-S. 68Ga-Labeled [Leu13ψThz14]Bombesin(7–14) Derivatives: Promising GRPR-Targeting PET Tracers with Low Pancreas Uptake. *Molecules* **2022**, *27* (12), 3777–3791. https://doi.org/10.3390/molecules27123777.

[455] Nanda, P. K.; Wienhoff, B. E.; Rold, T. L.; Sieckman, G. L.; Szczodroski, A. F.; Hoffman, T. J.; Rogers, B. E.; Smith, C. J. Positron-Emission Tomography (PET) Imaging Agents for Diagnosis of Human Prostate Cancer: Agonist vs. Antagonist Ligands. In Vivo **2012**, *26* (4), 583–592.

[456] Mather, S. J.; Nock, B. A.; Maina, T.; Gibson, V.; Ellison, D.; Murray, I.; Sobnack, R.; Colebrook, S.; Wan, S.; Halberrt, G.; Szysko, T.; Powles, T.; Avril, N. GRP Receptor Imaging of Prostate Cancer Using [^{99m}Tc]Demobesin 4: A First-in-Man Study. *Mol. Imaging Biol.* **2014**, *16* (6), 888–895. https://doi.org/10.1007/s11307-014-0754-z.

[457] Wiele, C. V. de; Dumont, F.; Dierckx, R. A.; Peers, S. H.; Thornback, J. R.; Slegers, G.; Thierens, H. Biodistribution and Dosimetry of 99mTc-RP527, a Gastrin-Releasing Peptide

(GRP) Agonist for the Visualization of GRP Receptor–Expressing Malignancies. *J. Nucl. Med.* **2001**, *42* (11), 1722–1727.

[458] Mansi, R.; Wang, X.; Forrer, F.; Waser, B.; Cescato, R.; Graham, K.; Borkowski, S.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R. Development of a Potent DOTA-Conjugated Bombesin Antagonist for Targeting GRPr-Positive Tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, *38* (1), 97–107. https://doi.org/10.1007/s00259-010-1596-9.

[459] Wieser, G.; Mansi, R.; Grosu, A. L.; Schultze-Seemann, W.; Dumont-Walter, R. A.; Meyer, P. T.; Maecke, H. R.; Reubi, J. C.; Weber, W. A. Positron Emission Tomography (PET) Imaging of Prostate Cancer with a Gastrin Releasing Peptide Receptor Antagonist - from Mice to Men. *Theranostics* **2014**, *4* (4), 412–419. https://doi.org/10.7150/thno.7324.

[460] Kähkönen, E.; Jambor, I.; Kemppainen, J.; Lehtiö, K.; Grönroos, T. J.; Kuisma, A.; Luoto, P.; Sipilä, H. J.; Tolvanen, T.; Alanen, K.; Silén, J.; Kallajoki, M.; Roivainen, A.; Schäfer, N.; Schibli, R.; Dragic, M.; Johayem, A.; Valencia, R.; Borkowski, S.; Minn, H. In Vivo Imaging of Prostate Cancer Using [^{68}Ga]-Labeled Bombesin Analog BAY86-7548. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19* (19), 5434–5443. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3490.

[461] Bratanovic, I. J.; Zhang, C.; Zhang, Z.; Kuo, H.-T.; Colpo, N.; Zeisler, J.; Merkens, H.; Uribe, C.; Lin, K.-S.; Bénard, F. A Novel Radiotracer for Molecular Imaging and Therapy of Gastrin-Releasing Peptide Receptor Positive Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.* **2021**. https://doi.org/10.2967/jnumed.120.257758.

[462] Mitran, B.; Varasteh, Z.; Selvaraju, R. K.; Lindeberg, G.; Sörensen, J.; Larhed, M.; Tolmachev, V.; Rosenström, U.; Orlova, A. Selection of Optimal Chelator Improves the Contrast of GRPR Imaging Using Bombesin Analogue RM26. *Int. J. Oncol.* **2016**, *48* (5), 2124–2134. https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3429.

[463] Varasteh, Z.; Mitran, B.; Rosenström, U.; Velikyan, I.; Rosestedt, M.; Lindeberg, G.; Sörensen, J.; Larhed, M.; Tolmachev, V.; Orlova, A. The Effect of Macrocyclic Chelators on the Targeting Properties of the ^{68}Ga-Labeled Gastrin Releasing Peptide Receptor Antagonist PEG_2-RM26. *Nucl. Med. Biol.* **2015**, *42* (5), 446–454. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2014.12.009.

[464] Roivainen, A.; Kähkönen, E.; Luoto, P.; Borkowski, S.; Hofmann, B.; Jambor, I.; Lehtiö, K.; Rantala, T.; Rottmann, A.; Sipilä, H.; Sparks, R.; Suilamo, S.; Tolvanen, T.; Valencia, R.; Minn, H. Plasma Pharmacokinetics, Whole-Body Distribution, Metabolism, and Radiation Dosimetry of ^{68}Ga Bombesin Antagonist BAY 86-7548 in Healthy Men. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54* (6), 867–872. https://doi.org/10.2967/jnumed.112.114082.

[465] Guenther, T.; Deiser, S.; Felber, V.; Beck, R.; Wester, H.-J. Substitution of L-Trp by α-Methyl-L-Trp in ^{177}Lu-RM2 Results in ^{177}Lu-AMTG, a High Affinity GRPR Ligand with Improved in Vivo Stability. *J. Nucl. Med.* **2022**, *63* (9), 1364–1370. https://doi.org/10.2967/jnumed.121.263323.

[466] Garrison, J. C.; Rold, T. L.; Sieckman, G. L.; Naz, F.; Sublett, S. V.; Figueroa, S. D.; Volkert, W. A.; Hoffman, T. J. Evaluation of the Pharmacokinetic Effects of Various Linking Group

Using the ^{111}In-DOTA-X-BBN(7−14)NH_2 Structural Paradigm in a Prostate Cancer Model. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (9), 1803–1812. https://doi.org/10.1021/bc8001375.

[467] Schroeder, R. P. J.; Weerden, W. M. van; Bangma, C.; Krenning, E. P.; Jong, M. de. Peptide Receptor Imaging of Prostate Cancer with Radiolabelled Bombesin Analogues. *Methods* **2009**, *48* (2), 200–204. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.04.002.

[468] Heimbrook, D. C.; Saari, W. S.; Balishin, N. L.; Fisher, T. W.; Friedman, A.; Kiefer, D. M.; Rotberg, N. S.; Wallen, J. W.; Oliff, A. Gastrin Releasing Peptide Antagonists with Improved Potency and Stability. *J. Med. Chem.* **1991**, *34* (7), 2102–2107. https://doi.org/10.1021/jm00111a027.

[469] Varasteh, Z.; Rosenström, U.; Velikyan, I.; Mitran, B.; Altai, M.; Honarvar, H.; Rosestedt, M.; Lindeberg, G.; Sörensen, J.; Larhed, M.; Tolmachev, V.; Orlova, A. The Effect of Mini-PEG-Based Spacer Length on Binding and Pharmacokinetic Properties of a 68Ga-Labeled NOTA-Conjugated Antagonistic Analog of Bombesin. *Molecules* **2014**, *19* (7), 10455–10472. https://doi.org/10.3390/molecules190710455.

[470] Xu, B.; Varasteh, Z.; Orlova, A.; Andersson, K.; Larhammar, D.; Björkelund, H. Detecting Ligand Interactions with G Protein-Coupled Receptors in Real-Time on Living Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *441* (4), 820–824. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.149.

[471] Inkster, J.; Lin, K.-S.; Ait-Mohand, S.; Gosselin, S.; Bénard, F.; Guérin, B.; Pourghiasian, M.; Ruth, T.; Schaffer, P.; Storr, T. 2-Fluoropyridine Prosthetic Compounds for the ^{18}F Labeling of Bombesin Analogues. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (13), 3920–3926. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.04.060.

[472] Jamous, M.; Tamma, M. L.; Gourni, E.; Waser, B.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R.; Mansi, R. PEG Spacers of Different Length Influence the Biological Profile of Bombesin-Based Radiolabeled Antagonists. *Nucl. Med. Biol.* **2014**, *41* (6), 464–470. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2014.03.014.

[473] Gourni, E.; Del Pozzo, L.; Kheirallah, E.; Smerling, C.; Waser, B.; Reubi, J.-C.; Paterson, B. M.; Donnelly, P. S.; Meyer, P. T.; Maecke, H. R. Copper-64 Labeled Macrobicyclic Sarcophagine Coupled to a GRP Receptor Antagonist Shows Great Promise for PET Imaging of Prostate Cancer. *Mol. Pharmaceutics* **2015**, *12* (8), 2781–2790. https://doi.org/10.1021/mp500671j.

[474] Valverde, I. E.; Vomstein, S.; Mindt, T. L. Toward the Optimization of Bombesin-Based Radiotracers for Tumor Targeting. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (8), 3867–3877. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00025.

[475] Maina, T.; Kaloudi, A.; Valverde, I. E.; Mindt, T. L.; Nock, B. A. Amide-to-Triazole Switch vs. in Vivo NEP-Inhibition Approaches to Promote Radiopeptide Targeting of GRPR-Positive Tumors. *Nucl. Med. Biol.* **2017**, *52* (1), 57–62. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2017.06.001.

[476] Mansour, N.; Paquette, M.; Ait-Mohand, S.; Dumulon-Perreault, V.; Guérin, B. Evaluation of a Novel GRPR Antagonist for Prostate Cancer PET Imaging: [^{64}Cu]-DOTHA2-PEG-RM26. *Nucl. Med. Biol.* **2018**, *56* (1), 31–38. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2017.10.006.

[477] Cheng, S.; Lang, L.; Wang, Z.; Jacobson, O.; Yung, B.; Zhu, G.; Gu, D.; Ma, Y.; Zhu, X.; Niu, G.; Chen, X. Positron Emission Tomography Imaging of Prostate Cancer with Ga-68-Labeled Gastrin-Releasing Peptide Receptor Agonist BBN[7–14] and Antagonist RM26. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29* (2), 410–419. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00726.

[478] Kanellopoulos, P.; Lymperis, E.; Kaloudi, A.; de Jong, M.; Krenning, E. P.; Nock, B. A.; Maina, T. [^{99m}Tc]Tc-DB1 Mimics with Different-Length PEG Spacers: Preclinical Comparison in GRPR-Positive Models. *Molecules* **2020**, *25* (15), 3418–3431. https://doi.org/10.3390/molecules25153418.

[479] Zhang, W.; Fan, W.; Ottemann, B. M.; Alshehri, S.; Garrison, J. C. Development of Improved Tumor-Residualizing, GRPR-Targeted Agents: Preclinical Comparison of an Endolysosomal Trapping Approach in Agonistic and Antagonistic Constructs. *J. Nucl. Med.* **2020**, *61* (3), 443–450. https://doi.org/10.2967/jnumed.119.231282.

[480] Chen, X.; Hou, Y.; Tohme, M.; Park, R.; Khankaldyyan, V.; Gonzales-Gomez, I.; Bading, J. R.; Laug, W. E.; Conti, P. S. Pegylated Arg-Gly-Asp Peptide: ^{64}Cu Labeling and PET Imaging of Brain Tumor Avβ3-Integrin Expression. *J. Nucl. Med.* **2004**, *45* (10), 1776–1783.

[481] Rogers, B. E.; Della Manna, D.; Safavy, A. In Vitro and In Vivo Evaluation of a ^{64}Cu-Labeled Polyethylene Glycol-Bombesin Conjugate. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2004**, *19* (1), 25–34. https://doi.org/10.1089/108497804773391649.

[482] A.; Mannucci, S.; Nicolato, E.; Vurro, F.; Diaferia, C.; Bontempi, P.; Marzola, P.; Morelli, G. Easy Formulation of Liposomal Doxorubicin Modified with a Bombesin Peptide Analogue for Selective Targeting of GRP Receptors Overexpressed by Cancer Cells. *Drug Deliv. and Transl. Res.* **2019**, 9 (1), 215–226. https://doi.org/10.1007/s13346-018-00606-x.

[483] Faintuch, B. L.; Núñez, G. E. F.; Teodoro, R.; Moro, A. M.; Mengatti, J. Radiolabeled Nano-Peptides Show Specificity for an Animal Model of Human PC3 Prostate Cancer Cells. *Clinics* **2011**, *66* (2), 327–336. https://doi.org/10.1590/S1807-59322011000200024.

[484] Litau, S.; Seibold, U.; Wängler, B.; Schirrmacher, R.; Wängler, C. IEDDA Conjugation Reaction in Radiometal Labeling of Peptides with ^{68}Ga and ^{64}Cu: Unexpected Findings. *ACS Omega* **2018**, *3* (10), 14039–14053. https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01926.

[485] Dalm, S. U.; Bakker, I. L.; Blois, E. de; Doeswijk, G. N.; Konijnenberg, M. W.; Orlandi, F.; Barbato, D.; Tedesco, M.; Maina, T.; Nock, B. A.; Jong, M. de. ^{68}Ga/^{177}Lu-NeoBOMB1, a Novel Radiolabeled GRPR Antagonist for Theranostic Use in Oncology. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (2), 293–299. https://doi.org/10.2967/jnumed.116.176636.

[486] Pretze, M.; Reffert, L.; Diehl, S.; Schönberg, S. O.; Wängler, C.; Hohenberger, P.; Wängler, B. GMP-Compliant Production of [^{68}Ga]Ga-NeoB for Positron Emission Tomography Imaging

of Patients with Gastrointestinal Stromal Tumor. *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2021**, *6* (1), 22–35. https://doi.org/10.1186/s41181-021-00137-w.

[487] Handula, M.; Verhoeven, M.; Chen, K.-T.; Haeck, J.; de Jong, M.; Dalm, S. U.; Seimbille, Y. Towards Complete Tumor Resection: Novel Dual-Modality Probes for Improved Image-Guided Surgery of GRPR-Expressing Prostate Cancer. *Pharmaceutics* **2022**, *14* (1), 195–213. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010195.

[488] Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33* (3), 239–254. https://doi.org/10.1385/MB:33:3:239.

[489] Behrendt, R.; White, P.; Offer, J. Advances in Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis. *J. Pept. Sci.* **2016**, *22* (1), 4–27. https://doi.org/10.1002/psc.2836.

[490] Bonkowski, B.; Wieczorek, J.; Patel, M.; Craig, C.; Gravelin, A.; Boncher, T. Basic Concepts of Using Solid Phase Synthesis to Build Small Organic Molecules Using 2-Chlorotrityl Chloride Resin. *Mod. Chem. Appl.* **2013**, *1* (113), 1–4. http://dx.doi.org/10.4172/2329-6798.1000113.

[491] Magtaan, J. K.; Devocelle, M.; Kelleher, F. Assessing the Correlation of Microscopy-Based and Volumetry-Based Measurements for Resin Swelling in a Range of Potential Greener Solvents for SPPS. *J. Pept. Sci.* **2020**, *26* (6), e3250–e3261. https://doi.org/10.1002/psc.3250.

[492] Santini, R.; Griffith, M. C.; Qi, M. A Measure of Solvent Effects on Swelling of Resins for Solid Phase Organic Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (49), 8951–8954. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(98)02069-3.

[493] Barlos, K.; Chatzi, O.; Gatos, D.; Stavropoulos, G. 2-Chlorotrityl Chloride Resin. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 513–520.

[494] Eissler, S.; Kley, M.; Bächle, D.; Loidl, G.; Meier, T.; Samson, D. Substitution Determination of Fmoc-Substituted Resins at Different Wavelengths. *J. Pept. Sci.* **2017**, *23* (10), 757–762. https://doi.org/10.1002/psc.3021.

[495] Al Musaimi, O.; Basso, A.; de la Torre, B. G.; Albericio, F. Calculating Resin Functionalization in Solid-Phase Peptide Synthesis Using a Standardized Method Based on Fmoc Determination. *ACS Comb. Sci.* **2019**, *21* (11), 717–721. https://doi.org/10.1021/acscombsci.9b00154.

[496] Grun, J.; Revell, J. D.; Conza, M.; Wennemers, H. Peptide–Polyethylene Glycol Conjugates: Synthesis and Properties of Peptides Bearing a C-Terminal Polyethylene Glycol Chain. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (18), 6197–6201. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.05.079.

[497] García Castañeda, J. E.; Vergel Galeano, C. F.; Rivera Monroy, Z. J.; Rosas Pérez, J. E. Efficient Synthesis of Peptides with 4-Methylpiperidine as Fmoc Removal Reagent by Solid Phase Synthesis. *J. Mex. Chem. Soc.* **2017**, *58* (4), 386–392. https://doi.org/10.29356/jmcs.v58i4.47.

[498] Al Musaimi, O.; El-Faham, A.; Almarhoon, Z.; Basso, A.; de la Torre, B. G.; Albericio, F. Bypassing Osmotic Shock Dilemma in a Polystyrene Resin Using the Green Solvent Cyclopentyl Methyl Ether (CPME): A Morphological Perspective. *Polymers* **2019**, *11* (5), 874–887. https://doi.org/10.3390/polym11050874.

[499] Nock, B.; Kaloudi, A.; Lymperis, E.; Giarika, A.; Bergsma, H.; Mueller, D.; Krenning, E.; Jong, M. de; Maina, T.; Baum, R. [^{68}Ga]NeoBOMB1, a New Potent GRPR-Antagonist for PET Imaging - Preclinical and First Clinical Evaluation in Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57* (2), 583–583.

[500] Manne, S. R.; Torre, B. G. de la; El-Faham, A.; Albericio, F. OxymaPure Coupling Reagents: Beyond Solid-Phase Peptide Synthesis. *Synthesis* **2020**, *52* (21), 3189–3210. https://doi.org/10.1055/s-0040-1706296.

[501] Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. Oxyma: An Efficient Additive for Peptide Synthesis to Replace the Benzotriazole-Based HOBt and HOAt with a Lower Risk of Explosion. *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15* (37), 9394–9403. https://doi.org/10.1002/chem.200900614.

[502] Simpson, E. J.; Gobbo, P.; Bononi, F. C.; Murrell, E.; Workentin, M. S.; Luyt, L. G. Bombesin-Functionalized Water-Soluble Gold Nanoparticles for Targeting Prostate Cancer. *J. Interdiscip. Nanomed.* **2017**, *2* (4), 174–187. https://doi.org/10.1002/jin2.33.

[503] Co, C. M.; Izuagbe, S.; Zhou, J.; Zhou, N.; Sun, X.; Borrelli, J.; Tang, L. Click Chemistry-Based Pre-Targeting Cell Delivery for Cartilage Regeneration. *Regen. Biomater.* **2021**, *8* (3), 1–11. https://doi.org/10.1093/rb/rbab018.

[504] Juen, L.; Gely, C.; Huet, E. Compounds Capable of Binding to Proteins and Conjugates Obtained from These Compounds. WO2022018371A1, January 27, **2022**.

[505] Otaru, S.; Paulus, A.; Imlimthan, S.; Kuurne, I.; Virtanen, H.; Liljenbäck, H.; Tolvanen, T.; Auchynnikava, T.; Roivainen, A.; Helariutta, K.; Sarparanta, M.; Airaksinen, A. J. Development of [^{18}F]AmBF3 Tetrazine for Radiolabeling of Peptides: Preclinical Evaluation and PET Imaging of [^{18}F]AmBF3-PEG$_7$-Tyr3-Octreotide in an AR42J Pancreatic Carcinoma Model. *Bioconjugate Chem.* **2022**, *33* (7), 1393–1404. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.2c00231.

[506] Chang, T.-W.; Chu, H.-M.; Lin, C.-J.; Lin, C.-Y. Peptide Core-Based Multi-Arm Linkers for Treating Infectious Diseases. US9994638B2, June 12, **2018**.

[507] Yang, Y. Site-Specific Antibody Conjugates and the Methods for Preparation of the Same. WO2022037665A1, February 24, **2022**.

[508] Jo, S.; Engel, P. S.; Mikos, A. G. Synthesis of Poly(Ethylene Glycol)-Tethered Poly(Propylene Fumarate) and Its Modification with GRGD Peptide. *Polymer* **2000**, *41* (21), 7595–7604. https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00117-8.

[509] Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M. N-Hydroxysuccinimide Esters in Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (19), 3039–3039. https://doi.org/10.1021/ja00902a047.

[510] Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M. The Use of Esters of N-Hydroxysuccinimide in Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (9), 1839–1842. https://doi.org/10.1021/ja01063a037.

[511] Däpp, S.; Garayoa, E. G.; Maes, V.; Brans, L.; Tourwé, D. A.; Müller, C.; Schibli, R. PEGylation of 99mTc-Labeled Bombesin Analogues Improves Their Pharmacokinetic Properties. *Nucl. Med. Biol.* **2011**, *38* (7), 997–1009. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2011.02.014.

[512] Yang, Y.; Neef, T.; Mittelholzer, C.; Garcia Garayoa, E.; Bläuenstein, P.; Schibli, R.; Aebi, U.; Burkhard, P. The Biodistribution of Self-Assembling Protein Nanoparticles Shows They Are Promising Vaccine Platforms. *J. Nanobiotechnology* **2013**, *11* (1), 36–46. https://doi.org/10.1186/1477-3155-11-36.

[513] Han, S.-Y.; Kim, Y.-A. Recent Development of Peptide Coupling Reagents in Organic Synthesis. *Tetrahedron* **2004**, *60* (11), 2447–2467. https://doi.org/10.1016/j.tet.2004.01.020.

[514] Hachmann, J.; Lebl, M. Search for Optimal Coupling Reagent in Multiple Peptide Synthesizer. *Peptide Sci.* **2006**, *84* (3), 340–347. https://doi.org/10.1002/bip.20482.

[515] El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (11), 6557–6602. https://doi.org/10.1021/cr100048w.

[516] Al-Warhi, T. I.; Al-Hazimi, H. M. A.; El-Faham, A. Recent Development in Peptide Coupling Reagents. *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, *16* (2), 97–116. https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.12.006.

[517] Pearson, D. A.; Blanchette, M.; Baker, M. L.; Guindon, C. A. Trialkylsilanes as Scavengers for the Trifluoroacetic Acid Deblocking of Protecting Groups in Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30* (21), 2739–2742. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)99113-5.

[518] Béquignat, J.-B.; Ty, N.; Rondon, A.; Taiariol, L.; Degoul, F.; Canitrot, D.; Quintana, M.; Navarro-Teulon, I.; Miot-Noirault, E.; Boucheix, C.; Chezal, J.-M.; Moreau, E. Optimization of IEDDA Bioorthogonal System: Efficient Process to Improve Trans-Cyclooctene/Tetrazine Interaction. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *203* (1), 112574–112584. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112574.

[519] Darko, A.; Wallace, S.; Dmitrenko, O.; Machovina, M. M.; Mehl, R. A.; Chin, J. W.; Fox, J. M. Conformationally Strained Trans-Cyclooctene with Improved Stability and Excellent Reactivity in Tetrazine Ligation. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (10), 3770–3776. https://doi.org/10.1039/C4SC01348D.

[520] Morpurgo, M.; Veronese, F. M. Conjugates of Peptides and Proteins to Polyethylene Glycols. *In Bioconjugation Protocols: Strategies and Methods*; Niemeyer, C. M., Ed.; *Methods*

mol. biol., Humana Press: Totowa, NJ, **2004**, 45–70. https://doi.org/10.1385/1-59259-813-7:045.

[521] Mant, C. T.; Chen, Y.; Yan, Z.; Popa, T. V.; Kovacs, J. M.; Mills, J. B.; Tripet, B. P.; Hodges, R. S. HPLC Analysis and Purification of Peptides. *In Peptide Characterization and Application Protocols*; Fields, G. B., Ed.; *Methods mol. biol.*, Humana Press: Totowa, NJ, **2007**, 3–55. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-430-8_1.

[522] Chen, X.; Sievers, E.; Hou, Y.; Park, R.; Tohme, M.; Bart, R.; Bremner, R.; Bading, J. R.; Conti, P. S. Integrin Aβ3-Targeted Imaging of Lung Cancer. *Neoplasia* **2005**, *7* (3), 271–279. https://doi.org/10.1593/neo.04538.

[523] Karathanasis, E.; Ayyagari, A. L.; Bhavane, R.; Bellamkonda, R. V.; Annapragada, A. V. Preparation of in Vivo Cleavable Agglomerated Liposomes Suitable for Modulated Pulmonary Drug Delivery. *J. Control Release* **2005**, *103* (1), 159–175. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.11.009.

[524] Tomlinson, I. D.; Warnerment, M. R.; Mason, J. N.; Vergne, M. J.; Hercules, D. M.; Blakely, R. D.; Rosenthal, S. J. Synthesis and Characterization of a Pegylated Derivative of 3-(1,2,3,6-Tetrahydro-Pyridin-4yl)-1H-Indole (IDT199): A High Affinity SERT Ligand for Conjugation to Quantum Dots. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (20), 5656–5660. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.07.061.

[525] Almutairi, A.; Rossin, R.; Shokeen, M.; Hagooly, A.; Ananth, A.; Capoccia, B.; Guillaudeu, S.; Abendschein, D.; Anderson, C. J.; Welch, M. J.; Fréchet, J. M. J. Biodegradable Dendritic Positron-Emitting Nanoprobes for the Noninvasive Imaging of Angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (3), 685–690. https://doi.org/10.1073/pnas.0811757106.

[526] Wang, Y.; Wang, Y.; Xiang, J.; Yao, K. Target-Specific Cellular Uptake of Taxol-Loaded Heparin-PEG-Folate Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (12), 3531–3538. https://doi.org/10.1021/bm101013s.

[527] Chan, D. P. Y.; Owen, S. C.; Shoichet, M. S. Double Click: Dual Functionalized Polymeric Micelles with Antibodies and Peptides. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24* (1), 105–113. https://doi.org/10.1021/bc300511a.

[528] Stasiuk, G. J.; Holloway, P. M.; Rivas, C.; Trigg, W.; Luthra, S. K.; Iveson, V. M.; Gavins, F. N. E.; Long, N. J. ^{99m}Tc SPECT Imaging Agent Based on CFLFLFK for the Detection of FPR1 in Inflammation. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (11), 4986–4993. https://doi.org/10.1039/C4DT02980A.

[529] Kuruvilla, S. P.; Tiruchinapally, G.; Kaushal, N.; ElSayed, M. E. H. Effect of N-Acetylgalactosamine Ligand Valency on Targeting Dendrimers to Hepatic Cancer Cells. *Int. J. Pharm.* **2018**, *545* (1), 27–36. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.04.028.

[530] Nilsson, R.; Sandberg, B.; Wilbur, S. Macromolecule Conjugate. WO2007080114A2, July 19, **2007** (composé n° Cas 944251-17-6).

[531] Bhatt, R.; Conrad, M. J.; Bencheikh, A.; Xiong, Y. Novel Green and Orange Fluorescent Labels and Their Uses. WO2004027388A2, April 1, **2004**. (composé n° Cas 1931948-20-7)

[532] Prabhu, G.; Basavaprabhu; Narendra, N.; Vishwanatha, T. M.; Sureshbabu, V. V. Amino Acid Chlorides: A Journey from Instability and Racemization toward Broader Utility in Organic Synthesis Including Peptides and Their Mimetics. *Tetrahedron* **2015**, *71* (19), 2785–2832. https://doi.org/10.1016/j.tet.2015.03.026.

[533] Singh, S. P.; Schwartz, M. P.; Lee, J. Y.; Fairbanks, B. D.; Anseth, K. S. A Peptide Functionalized Poly(Ethylene Glycol) (PEG) Hydrogel for Investigating the Influence of Biochemical and Biophysical Matrix Properties on Tumor Cell Migration. *Biomater. Sci.* **2014**, *2* (7), 1024–1034. https://doi.org/10.1039/C4BM00022F.

[534] Wahab, S. A.; Matsuura, H. IR Spectroscopic Study of Conformational Properties of a Short-Chain Poly(Oxyethylene) (C1E3C1) in Binary Mixtures with Liquids of Different Hydrogen-Bonding Abilities. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3* (21), 4689–4695. https://doi.org/10.1039/B104109F.

[535] Singelenberg, F. A. J.; Lutz, E. T. G.; van der Maas, J. H.; Jalsovszky, G. Solvent Dependence of Intramolecular Hydrogen-Bonds in Ethylene Glycol Derivatives: An FT-IR Study. *J. Mol. Struct.* **1991**, *245* (3), 173–182. https://doi.org/10.1016/0022-2860(91)87094-X.

[536] Albright, J. G.; Paduano, L.; Sartorio, R.; Vergara, A.; Vitagliano, V. Multicomponent Diffusion in Systems Containing Molecules of Different Size. 1. Mutual Diffusion in the Ternary System Poly(Ethylene Glycol) 2000 + Poly(Ethylene Glycol) 200 + Water. *J. Chem. Eng. Data* **2001**, *46* (5), 1283–1291. https://doi.org/10.1021/je0100894.

[537] Holyst, R.; Bielejewska, A.; Szymański, J.; Wilk, A.; Patkowski, A.; Gapiński, J.; Żywociński, A.; Kalwarczyk, T.; Kalwarczyk, E.; Tabaka, M.; Ziębacz, N.; Wieczorek, S. A. Scaling Form of Viscosity at All Length-Scales in Poly(Ethylene Glycol) Solutions Studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy and Capillary Electrophoresis. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11* (40), 9025–9032. https://doi.org/10.1039/B908386C.

[538] Povey, J. F.; Smales, C. M.; Hassard, S. J.; Howard, M. J. Comparison of the Effects of 2,2,2-Trifluoroethanol on Peptide and Protein Structure and Function. *J. Struct. Biol.* **2007**, *157* (2), 329–338. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.07.008.

[539] Yamada, S.; Hongo, C.; Yoshioka, R.; Chibata, I. Method for the Racemization of Optically Active Amino Acids. *J. Org. Chem.* **1983**, *48* (6), 843–846. https://doi.org/10.1021/jo00154a019.

[540] Conlon, J. M. Purification of Naturally Occurring Peptides by Reversed-Phase HPLC. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (1), 191–197. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.437.

[541] Yoo, B.; Ma, K.; Zhang, L.; Burns, A.; Sequeira, S.; Mellinghoff, I.; Brennan, C.; Wiesner, U.; Bradbury, M. S. Ultrasmall Dual-Modality Silica Nanoparticle Drug Conjugates: Design, Synthesis, and Characterization. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (22), 7119–7130. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.09.050.

[542] Diaferia, C.; Sibillano, T.; Altamura, D.; Roviello, V.; Vitagliano, L.; Giannini, C.; Morelli, G.; Accardo, A. Structural Characterization of PEGylated Hexaphenylalanine Nanostructures Exhibiting Green Photoluminescence Emission. *Chem. – Eur. J.* **2017**, *23* (56), 14039–14048. https://doi.org/10.1002/chem.201703055.

[543] Deak, P. E.; Kim, B.; Abdul Qayum, A.; Shin, J.; Vitalpur, G.; Kloepfer, K. M.; Turner, M. J.; Smith, N.; Shreffler, W. G.; Kiziltepe, T.; Kaplan, M. H.; Bilgicer, B. Designer Covalent Heterobivalent Inhibitors Prevent IgE-Dependent Responses to Peanut Allergen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116* (18), 8966–8974. https://doi.org/10.1073/pnas.1820417116.

[544] Dirks, A. (Ton) J.; Cornelissen, J. J. L. M.; Nolte, R. J. M. Monitoring Protein−Polymer Conjugation by a Fluorogenic Cu(I)-Catalyzed Azide−Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20* (6), 1129–1138. https://doi.org/10.1021/bc8004667.

[545] Nairn, N. W.; Shanebeck, K. D.; Wang, A.; Graddis, T. J.; VanBrunt, M. P.; Thornton, K. C.; Grabstein, K. Development of Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition for Increased in Vivo Efficacy of Interferon β-1b by Site-Specific PEGylation. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23* (10), 2087–2097. https://doi.org/10.1021/bc300295x.

[546] Nairn, N. W.; Bariola, P. A.; Graddis, T. J.; VanBrunt, M. P.; Wang, A.; Li, G.; Grabstein, K. Cysteine as a Monothiol Reducing Agent to Prevent Copper-Mediated Oxidation of Interferon Beta During PEGylation by CuAAC. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26* (10), 2070–2075. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00320.

[547] Tully, M.; Wedepohl, S.; Kutifa, D.; Weise, C.; Licha, K.; Schirner, M.; Haag, R. Prolonged Activity of Exenatide: Detailed Comparison of Site-Specific Linear Polyglycerol- and Poly(Ethylene Glycol)-Conjugates. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2021**, *164* (1), 105–113. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.04.019.

[548] Inoue, N.; Onoda, A.; Hayashi, T. Site-Specific Modification of Proteins through N-Terminal Azide Labeling and a Chelation-Assisted CuAAC Reaction. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30* (9), 2427–2434. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00515.

[549] Xiao, Q.; Ashton, D. S.; Jones, Z. B.; Thompson, K. P.; Price, J. L. Long-Range PEG Stapling: Macrocyclization for Increased Protein Conformational Stability and Resistance to Proteolysis. *RSC Chem. Biol.* **2020**, *1* (4), 273–280. https://doi.org/10.1039/D0CB00075B.

[550] Zhou, R.; Zhang, M.; He, J.; Liu, J.; Sun, X.; Ni, P. Functional CRGD-Conjugated Polymer Prodrug for Targeted Drug Delivery to Liver Cancer Cells. *ACS Omega* **2022**, *7* (24), 21325–21336. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c02683.

[551] Thoreau, F.; Vanwonterghem, L.; Henry, M.; Coll, J.-L.; Boturyn, D. Design of RGD–ATWLPPR Peptide Conjugates for the Dual Targeting of AVβ3 Integrin and Neuropilin-1. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (22), 4101–4107. https://doi.org/10.1039/C8OB00669E.

[552] Majewski, M. W.; Gandhi, D. M.; Rosas, R.; Kodali, R.; Arnold, L. A.; Dockendorff, C. Design and Evaluation of Heterobivalent PAR1–PAR2 Ligands as Antagonists of Calcium

Mobilization. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10* (1), 121–126. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.8b00538.

[553] Keen, N.; Mcdonnell, K.; Park, P.; Upadhyaya, P. Heterotandem Bicyclic Peptide Complexes. WO2019193328A1, October 10, **2019**.

[554] Chen, L.; Lani, R.; Mcdonnell, K.; Mudd, G.; Park, P.; Upadhyaya, P. Multimeric Bicyclic Peptide Ligands. WO2019162682A1, August 29, **2019**.

[555] Sakamuri, S.; Bradshaw, C. W.; Eltepu, L.; Meade, B. R.; Lam, S. Polynucleotide Constructs. WO2018035380A1, February 22, **2018**.

[556] Keen, N.; Mudd, G.; Brandish, P.; Gaynor, K.; Chen, L.; Dufort, F.; Leitheiser, C.; Mcdonnell, K.; Repash, L.; Uhlenbroich, S. Heterotandem Bicyclic Peptide Complexes. WO2022148975A1, July 14, **2022**.

[557] Valverde, I. E.; Huxol, E.; Mindt, T. L. Radiolabeled Antagonistic Bombesin Peptidomimetics for Tumor Targeting. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **2014**, *57* (4), 275–278. https://doi.org/10.1002/jlcr.3162.

[558] Mion, G.; Mari, C.; Da Ros, T.; Rubbiani, R.; Gasser, G.; Gianferrara, T. Towards the Synthesis of New Tumor Targeting Photosensitizers for Photodynamic Therapy and Imaging Applications. *ChemistrySelect* **2017**, *2* (1), 190–200. https://doi.org/10.1002/slct.201601960.

[559] Hayashi, G.; Kamo, N.; Okamoto, A. Chemical Synthesis of Dual Labeled Proteins via Differently Protected Alkynes Enables Intramolecular FRET Analysis. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (43), 5918–5921. https://doi.org/10.1039/C7CC02612A.

[560] Wood, T. M.; Slingerland, C. J.; Martin, N. I. A Convenient Chemoenzymatic Preparation of Chimeric Macrocyclic Peptide Antibiotics with Potent Activity against Gram-Negative Pathogens. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (15), 10890–10899. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00176.

[561] Punna, S.; Kuzelka, J.; Wang, Q.; Finn, M. G. Head-to-Tail Peptide Cyclodimerization by Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2005**, *44* (15), 2215–2220. https://doi.org/10.1002/anie.200461656.

[562] Jagasia, R.; Holub, J. M.; Bollinger, M.; Kirshenbaum, K.; Finn, M. G. Peptide Cyclization and Cyclodimerization by CuI-Mediated Azide−Alkyne Cycloaddition. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (8), 2964–2974. https://doi.org/10.1021/jo802097m.

[563] Fumagalli, G.; Carbajo, R. J.; Nissink, J. W. M.; Tart, J.; Dou, R.; Thomas, A. P.; Spring, D. R. Targeting a Novel KRAS Binding Site: Application of One-Component Stapling of Small (5–6-Mer) Peptides. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (23), 17287–17303. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01334.

[564] Jølck, R. I.; Berg, R. H.; Andresen, T. L. Solid-Phase Synthesis of PEGylated Lipopeptides Using Click Chemistry. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21* (5), 807–810. https://doi.org/10.1021/bc100002a.

[565] Mousa, S. a; Hay, B. A. Composition Of Scalable Thyrointegrin Antagonists With Improved Blood Brain Barrier Penetration And Retention In Brain Tumors. WO2021221836A1, November 4, **2021**.

[566] Dehigaspitiya, D. C.; Anglin, B. L.; Smith, K. R.; Weber, C. S.; Lynch, R. M.; Mash, E. A. Linear Scaffolds for Multivalent Targeting of Melanocortin Receptors. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (47), 11507–11517. https://doi.org/10.1039/C5OB01779C.

[567] Oude Blenke, E.; Sleszynska, M.; Evers, M. J. W.; Storm, G.; Martin, N. I.; Mastrobattista, E. Strategies for the Activation and Release of the Membranolytic Peptide Melittin from Liposomes Using Endosomal PH as a Trigger. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28* (2), 574–582. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00677.

[568] Lundquist; Pelletier, J. C. Improved Solid-Phase Peptide Synthesis Method Utilizing α-Azide-Protected Amino Acids. *Org. Lett.* **2001**, *3* (5), 781–783. https://doi.org/10.1021/ol0155485.

[569] Wängler, C.; Maschauer, S.; Prante, O.; Schäfer, M.; Schirrmacher, R.; Bartenstein, P.; Eisenhut, M.; Wängler, B. Multimerization of CRGD Peptides by Click Chemistry: Synthetic Strategies, Chemical Limitations, and Influence on Biological Properties. *Chem. – Eur. J. Chem. Bio.* **2010**, *11* (15), 2168–2181. https://doi.org/10.1002/cbic.201000386.

[570] Pechar, M.; Pola, R.; Laga, R.; Ulbrich, K.; Bednárová, L.; Maloň, P.; Sieglová, I.; Král, V.; Fábry, M.; Vaněk, O. Coiled Coil Peptides as Universal Linkers for the Attachment of Recombinant Proteins to Polymer Therapeutics. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (10), 3645–3655. https://doi.org/10.1021/bm200897b.

[571] Smolensky, E. D.; Marjańska, M.; Pierre, V. C. A Responsive Particulate MRI Contrast Agent for Copper(I): A Cautionary Tale. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (26), 8039–8046. https://doi.org/10.1039/C2DT30416C.

[572] Feldborg, L. N.; Jølck, R. I.; Andresen, T. L. Quantitative Evaluation of Bioorthogonal Chemistries for Surface Functionalization of Nanoparticles. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23* (12), 2444–2450. https://doi.org/10.1021/bc3005057.

[573] Barkey, N. M.; Tafreshi, N. K.; Josan, J. S.; De Silva, C. R.; Sill, K. N.; Hruby, V. J.; Gillies, R. J.; Morse, D. L.; Vagner, J. Development of Melanoma-Targeted Polymer Micelles by Conjugation of a Melanocortin 1 Receptor (MC1R) Specific Ligand. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (23), 8078–8084. https://doi.org/10.1021/jm201226w.

[574] Kulkarni, P.; Haldar, M. K.; Katti, P.; Dawes, C.; You, S.; Choi, Y.; Mallik, S. Hypoxia Responsive, Tumor Penetrating Lipid Nanoparticles for Delivery of Chemotherapeutics to Pancreatic Cancer Cell Spheroids. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (8), 1830–1838. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00241.

[575] Lu, L.; Zhao, X.; Fu, T.; Li, K.; He, Y.; Luo, Z.; Dai, L.; Zeng, R.; Cai, K. An IRGD-Conjugated Prodrug Micelle with Blood-Brain-Barrier Penetrability for Anti-Glioma Therapy. *Biomaterials* **2020**, *230*, 119666–119681. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119666.

[576] Hussein, W. M.; Toth, I. Peptide-Pegylated Lipid Conjugation Via Copper-Catalyzed Alkyne-Azide 1,3-Dipolar Cycloaddition. *In Peptide Conjugation: Methods and Protocols*; Hussein, W. M., Stephenson, R. J., Toth, I., Eds.; *Methods mol. biol.*; Springer US: New York, NY, **2021**; 57–64. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1617-8_6.

[577] Sears, G. W. Determination of Specific Surface Area of Colloidal Silica by Titration with Sodium Hydroxide. *Anal. Chem.* **1956**, *28* (12), 1981–1983. https://doi.org/10.1021/ac60120a048.

[578] Kellum, G. E.; Hahn, J. R. Surface Area-Hydroxyl Correlation Employing Trimethylsiloxy-Treated Ammonium Silicates. *Anal. Chem.* **1968**, *40* (6), 952–956. https://doi.org/10.1021/ac60262a004.

[579] Kobayashi, H. Surface Treatment of Fumed Silica with Oligodimethylsiloxane-α,ω-Diol. *J. Colloid Interface Sci.* **1993**, *156* (2), 294–298. https://doi.org/10.1006/jcis.1993.1114.

[580] 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. ^{18}F-Based Pretargeted PET Imaging Based on Bioorthogonal Diels–Alder Click Chemistry. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (2), 298–301. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00504.

[581] Evans, H. L.; Nguyen, Q.-D.; Carroll, L. S.; Kaliszczak, M.; Twyman, F. J.; Spivey, A. C.; Aboagye, E. O. A Bioorthogonal ^{68}Ga-Labelling Strategy for Rapid in Vivo Imaging. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (67), 9557–9560. https://doi.org/10.1039/C4CC03903C.

[582] Bilton, H. A.; Ahmad, Z.; Janzen, N.; Czorny, S.; Valliant, J. F. Preparation and Evaluation of ^{99m}Tc-labeled Tridentate Chelates for Pre-targeting Using Bioorthogonal Chemistry. *J. Vis. Exp.* **2017**, *120* (1), e55188–e55195. https://doi.org/10.3791/55188.

[583] Läppchen, T.; Rossin, R.; van Mourik, T. R.; Gruntz, G.; Hoeben, F. J. M.; Versteegen, R. M.; Janssen, H. M.; Lub, J.; Robillard, M. S. DOTA-Tetrazine Probes with Modified Linkers for Tumor Pretargeting. *Nucl. Med. Biol.* **2017**, *55* (1), 19–26. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2017.09.001.

[584] Vu, T. T.; Gulfam, M.; Jo, S.-H.; Park, S.-H.; Lim, K. T. Injectable and Biocompatible Alginate-Derived Porous Hydrogels Cross-Linked by IEDDA Click Chemistry for Reduction-Responsive Drug Release Application. *Carbohydr. Polym.* **2022**, *278* (1), 118964–118977. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118964.

[585] Ali, I.; Gulfam, M.; Jo, S.-H.; Seo, J.-W.; Rizwan, A.; Park, S.-H.; Lim, K. T. Reduction-Responsive and Bioorthogonal Carboxymethyl Cellulose Based Soft Hydrogels Cross-Linked via IEDDA Click Chemistry for Cancer Therapy Application. *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *219* (1), 109–120. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.229.

[586] Atherton, J. C. Acid–Base Balance: Maintenance of Plasma PH. *Anaesth. Intensive Care Med.* **2009**, *10* (11), 557–561. https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2009.08.005.

[587] Poty, S.; Membreno, R.; Glaser, J. M.; Ragupathi, A.; Scholz, W. W.; Zeglis, B. M.; Lewis, J. S. The Inverse Electron-Demand Diels–Alder Reaction as a New Methodology for the Synthesis of ^{225}Ac-Labelled Radioimmunoconjugates. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (21), 2599–2602. https://doi.org/10.1039/C7CC09129J.

[588] Membreno, R.; Cook, B. E.; Fung, K.; Lewis, J. S.; Zeglis, B. M. Click-Mediated Pretargeted Radioimmunotherapy of Colorectal Carcinoma. *Mol. Pharm.* **2018**, *15* (4), 1729–1734. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00093.

[589] Membreno, R.; Keinänen, O. M.; Cook, B. E.; Tully, K. M.; Fung, K. C.; Lewis, J. S.; Zeglis, B. M. Toward the Optimization of Click-Mediated Pretargeted Radioimmunotherapy. *Mol. Pharm.* **2019**, *16* (5), 2259–2263. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00062.

[590] Keinänen, O.; Brennan, J. M.; Membreno, R.; Fung, K.; Gangangari, K.; Dayts, E. J.; Williams, C. J.; Zeglis, B. M. Dual Radionuclide Theranostic Pretargeting. *Mol. Pharm.* **2019**, *16* (10), 4416–4421. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00746.

[591] Sarrett, S. M.; Keinänen, O.; Dayts, E. J.; Dewaele-Le Roi, G.; Rodriguez, C.; Carnazza, K. E.; Zeglis, B. M. Inverse Electron Demand Diels–Alder Click Chemistry for Pretargeted PET Imaging and Radioimmunotherapy. *Nat. Protoc.* **2021**, *16* (7), 3348–3381. https://doi.org/10.1038/s41596-021-00540-2.

[592] Izawa, A.; Ogawa, Y.; Ichikawa, H.; Kawatani, M.; Takemori, H.; Okumura, Y. Method for Producing Radioactive Metal-Labeled Antibody. WO2021075546A1, April 22, **2021**.

[593] Zeglis, B.; Lewis, J.; Reiner, T.; Houghton, J. L.; Meyer, J.-P.; Brand, C. Radioligands for Pretargeted Pet Imaging and Methods of Their Therapeutic Use. WO2016182804A1, November 17, **2016**.

[594] Meyer, J.-P.; Tully, K. M.; Jackson, J.; Dilling, T. R.; Reiner, T.; Lewis, J. S. Bioorthogonal Masking of Circulating Antibody–TCO Groups Using Tetrazine-Functionalized Dextran Polymers. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29* (2), 538–545. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00028.

[595] Cook, B. E.; Membreno, R.; Zeglis, B. M. Dendrimer Scaffold for the Amplification of In Vivo Pretargeting Ligations. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29* (8), 2734–2740. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00385.

[596] Poty, S.; Carter, L. M.; Mandleywala, K.; Membreno, R.; Abdel-Atti, D.; Ragupathi, A.; Scholz, W. W.; Zeglis, B. M.; Lewis, J. S. Leveraging Bioorthogonal Click Chemistry to Improve ^{225}Ac-Radioimmunotherapy of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25* (2), 868–880. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1650.

[597] Houghton, J. L.; Membreno, R.; Abdel-Atti, D.; Cunanan, K. M.; Carlin, S.; Scholz, W. W.; Zanzonico, P. B.; Lewis, J. S.; Zeglis, B. M. Establishment of the In Vivo Efficacy of

Pretargeted Radioimmunotherapy Utilizing Inverse Electron Demand Diels-Alder Click Chemistry. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16* (1), 124–133. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0503.

[598] Membreno, R.; Cook, B. E.; Zeglis, B. M. Pretargeted Radioimmunotherapy Based on the Inverse Electron Demand Diels-Alder Reaction. *J. Vis. Exp.* **2019**, *143* (1), 59041–59067. https://doi.org/10.3791/59041.

[599] Blois, E. de; Chan, H. S.; Konijnenberg, M.; Zanger, R. de; Breeman, W. A. P. Effectiveness of Quenchers to Reduce Radiolysis of ^{111}In- or ^{177}Lu-Labelled Methionine-Containing Regulatory Peptides. Maintaining Radiochemical Purity as Measured by HPLC. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12* (23), 2677–2685. https://doi.org/10.2174/1568026611212230005.

[600] Baudhuin, H.; Cousaert, J.; Vanwolleghem, P.; Raes, G.; Caveliers, V.; Keyaerts, M.; Lahoutte, T.; Xavier, C. 68Ga-Labeling: Laying the Foundation for an Anti-Radiolytic Formulation for NOTA-SdAb PET Tracers. *Pharmaceuticals* **2021**, *14* (5), 448. https://doi.org/10.3390/ph14050448.

[601] Pawlak, D.; Rangger, C.; Kolenc Peitl, P.; Garnuszek, P.; Maurin, M.; Ihli, L.; Kroselj, M.; Maina, T.; Maecke, H.; Erba, P.; Kremser, L.; Hubalewska-Dydejczyk, A.; Mikołajczak, R.; Decristoforo, C. From Preclinical Development to Clinical Application: Kit Formulation for Radiolabelling the Minigastrin Analogue CP04 with In-111 for a First-in-Human Clinical Trial. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *85 (1)*, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.01.023.

[602] Breeman, W. A. P.; de Jong, M.; Visser, T. J.; Erion, J. L.; Krenning, E. P. Optimising Conditions for Radiolabelling of DOTA-Peptides with ^{90}Y, ^{111}In and ^{177}Lu at High Specific Activities. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30* (6), 917–920. https://doi.org/10.1007/s00259-003-1142-0.

[603] Breeman, W. A.; van der Wansem, K.; Bernard, B. F.; van Gameren, A.; Erion, J. L.; Visser, T. J.; Krenning, E. P.; de Jong, M. The Addition of DTPA to [^{177}Lu-DOTA0,Tyr^{3}]Octreotate Prior to Administration Reduces Rat Skeleton Uptake of Radioactivity. *Eur. J. Nucl. Med.* **2003**, *30* (2), 312–315. https://doi.org/10.1007/s00259-002-1054-4.

[604] Breeman, W. A. P.; de Jong, M.; de Blois, E.; Bernard, B. F.; Konijnenberg, M.; Krenning, E. P. Radiolabelling DOTA-Peptides with ^{68}Ga. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2005**, *32* (4), 478–485. https://doi.org/10.1007/s00259-004-1702-y.

[605] Liu, S.; Edwards, D. S. Stabilization of 90Y-Labeled DOTA-Biomolecule Conjugates Using Gentisic Acid and Ascorbic Acid. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12* (4), 554–558. https://doi.org/10.1021/bc000145v.

[606] Liu, S.; Ellars, C. E.; Edwards, D. S. Ascorbic Acid: Useful as a Buffer Agent and Radiolytic Stabilizer for Metalloradiopharmaceuticals. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14* (5), 1052–1056. https://doi.org/10.1021/bc034109i.

[607] Chen, J.; Linder, K. E.; Cagnolini, A.; Metcalfe, E.; Raju, N.; Tweedle, M. F.; Swenson, R. E. Synthesis, Stabilization and Formulation of [^{177}Lu]Lu-AMBA, a Systemic Radiotherapeutic

Agent for Gastrin Releasing Peptide Receptor Positive Tumors. *Appl. Radiat. Isot.* **2008**, *66* (4), 497–505. https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2007.11.007.

[608] Reiter, R. J. Melatonin: Clinical Relevance. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2003**, *17* (2), 273–285. https://doi.org/10.1016/S1521-690X(03)00016-2.

[609] Reiter, R. J.; Tan, D.-X.; Mayo, J. C.; Sainz, R. M.; Leon, J.; Czarnocki, Z. Melatonin as an Antioxidant: Biochemical Mechanisms and Pathophysiological Implications in Humans. *Acta Biochim. Pol.* **2003**, *50* (4), 1129–1146. https://doi.org/10.18388/abp.2003_3637.

[610] Keithahn, C.; Lerchl, A. 5-Hydroxytryptophan Is a More Potent *in Vitro* Hydroxyl Radical Scavenger than Melatonin or Vitamin C. *J. Pineal Res.* **2005**, *38* (1), 62–66. https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2004.00177.x.

[611] Yung-Chi, C.; Prusoff, W. H. Relationship between the Inhibition Constant (KI) and the Concentration of Inhibitor Which Causes 50 per Cent Inhibition (IC_{50}) of an Enzymatic Reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22* (23), 3099–3108. https://doi.org/10.1016/0006-2952(73)90196-2.

[612] Knauer, S.; Koch, N.; Uth, C.; Meusinger, R.; Avrutina, O.; Kolmar, H. Sustainable Peptide Synthesis Enabled by a Transient Protecting Group. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2020**, *59* (31), 12984–12990. https://doi.org/10.1002/anie.202003676.

E. Partie expérimentale : Chapitre 2 et 3

[613] Coenen, H. H.; Gee, A. D.; Adam, M.; Antoni, G.; Cutler, C. S.; Fujibayashi, Y.; Jeong, J. M.; Mach, R. H.; Mindt, T. L.; Pike, V. W.; Windhorst, A. D. Consensus Nomenclature Rules for Radiopharmaceutical Chemistry — Setting the Record Straight. *Nucl. Med. Biol.* **2017**, *55* (1), v–xi. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2017.09.004.

[614] Fujita, T.; Iwasa, J.; Hansch, C. A New Substituent Constant, π, Derived from Partition Coefficients. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (23), 5175–5180. https://doi.org/10.1021/ja01077a028.

[615] Vollmar, S.; Michel, C.; Treffert, J. T.; Newport, D. F.; Casey, M.; Kn\textdollarouml\textdollarss, C.; Wienhard, K.; Liu, X.; Defrise, M.; Heiss, W.-D. HeinzelCluster: Accelerated Reconstruction for FORE and OSEM3D. *Phys. Med. Biol.* **2002**, *47* (15), 2651–2658. https://doi.org/10.1088/0031-9155/47/15/307.

[616] Schmitt, S.; Bouteiller, C.; Barré, L.; Perrio, C. Sultone Opening with [^{18}F]Fluoride: An Efficient ^{18}F-Labelling Strategy for PET Imaging. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (41), 11465–11467. https://doi.org/10/c8j6sc.

[617] Chang, C.-C.; Letteri, R.; Hayward, R. C.; Emrick, T. Functional Sulfobetaine Polymers: Synthesis and Salt-Responsive Stabilization of Oil-in-Water Droplets. *Macromolecules* **2015**, *48* (21), 7843–7850. https://doi.org/10/f7x668.

[618] Lafargue, A.-E.; Perrio, C. Triazole Derivatives Used as a Hypoxia Imaging Agent. WO2019008119A1, January 10, **2019**.

[619] Davies, S.; Oliveira, B. L.; Bernades, G. J. L. Development of a self-immolative linker for tetrazine-triggered release of alcohols in cells, *Org. Biomol. Chem.*, **2019**, *17* (1), 5725–5730, https://doi.org/10.1039/C9OB01167F.

[620] Carlson, J.; Mikula, H.; Weissleder, R. Lieurs Et Réactions Bioorthogonaux. WO2022072949A2, April 7, **2022**.

[621] Rainsford, K. D. Structure-Activity Relationships of Non-Steroid Anti-Inflammatory Drugs 1. Gastric Ulcerogenic Activity. *Agents and Actions* **1978**, *8* (6), 587–605. https://doi.org/10.1007/BF01998888.

[622] Wlostowski, M.; Zachara, J.; Olszewski, A. Production Method of S-Tetrazines, December 21, **2006**. https://patents.google.com/patent/PL210746B1/en.

[623] Robins, L. I.; Carpenter, R. D.; Fettinger, J. C.; Haddadin, M. J.; Tinti, D. S.; Kurth, M. J. Diazocinones: Synthesis and Conformational Analysis. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (6), 2480–2485. https://doi.org/10.1021/jo052577a.

[624] Liu, H.; Wei, Y. Novel Synthesis of 3,6-Disubstituted-1,2,4,5-Tetrazine Derivatives from Hydrazones by Using [Hydroxyl(Tosyloxy)Iodo]Benzene. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54* (35), 4645–4648. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.06.053.

[625] Counotte-Potman, A.; Van der Plas, H. C.; Van Veldhuizen, B. Nuclear Magnetic Resonance of Adducts of Heterocyclic Systems with Nucleophiles. 27. 1,2,4,5-Tetrazine and Its Derivatives. 4. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Investigations of the Anionic Homoaromatic. Adducts Formed between Liquid Ammonia and 1,2,4,5-Tetrazines. *J. Org. Chem.* **1981**, *46* (19), 3805–3810. https://doi.org/10.1021/jo00332a008.

[626] Kong, K.; Zhang, J.; Zhao, P.; Lu, H.; Chen, Z.; Cao, W.; Chen, J.; Chen, Y. One-Step Synthesis of Benzo[g]Phthalazines and Naphtho[2,3-g]Phthalazines from Benzo- or Naphtho-Oxabicyclic Alkene. *Tetrahedron* **2017**, *73* (48), 6742–6746. https://doi.org/10.1016/j.tet.2017.10.028.

[627] Hu, W.-X.; Rao, G.-W.; Sun, Y.-Q. Synthesis and Antitumor Activity of S-Tetrazine Derivatives. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (5), 1177–1181. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2003.12.056.

[628] Kjaer, A.; Herth, M. M.; Battisti, U. M.; Garcia, R. Nuclide Labelled H-Tetrazines and Use Thereof for Pet and Spect Pretargeted Imaging and Radionuclide Therapy, EP3909944A1, May 14, **2020**.

[629] Zaschke, H.; Wolff, R.; Pelzl, G.; Demus, D. Nematic Liquid Crystal Mixtures. US4348298A, March 31, **1980**.

[630] Xu, F.; Hu, W.-X.; Zhou, W.; Xia, C.-N. 3-(4-Chlorophenyl)-6-Methyl-1,6-Dihydro-1,2,4,5-Tetrazine. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **2006**, *62* (7), o2875–o2876. https://doi.org/10.1107/S1600536806022641.

[631] Kobayashi, K.; Suginome, H. Synthesis of 2-Pyrrolidinylideneacetates by Means of a Reaction of Magnesium Ester Enolate with γ-Cyanoalkyl Tosylates. *Bull. Chem. Soc. Japon* **1986**, *59* (8), 2635–2636. https://doi.org/10.1246/bcsj.59.2635.

[632] Anonymous, Research Disclosure, **1980**, *189* (1), 3–4.

[633] Yitzhaki, O.; Hoz, S. Reversed Electron Apportionment in Mesolytic Cleavage: The Reduction of Benzyl Halides by SmI_2. *Chem. – Eur. J.* **2015**, *21* (25), 9242–9248. https://doi.org/10.1002/chem.201500519.

[634] Fujio, M.; Goto, M.; Susuki, T.; Akasaka, I.; Mishima, M.; Tsuno, Y. Substituent Effects. XXI. Solvolysis of Benzyl Tosylates. *Bull. Chem. Soc. Japon* **1990**, *63* (4), 1146–1153. https://doi.org/10.1246/bcsj.63.1146.

[635] Martins, F.; Duarte, M. F.; Fernandez, M. T.; Langley, G. J.; Rodrigues, P.; Barros, M. T.; Costa, M. L. Electron Ionization Mass Spectrometry in the Characterization of Azidonitriles. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18* (3), 363–366. https://doi.org/10.1002/rcm.1331.

[636] Algarra, M.; Soto, J. Insights into the Thermal and Photochemical Reaction Mechanisms of Azidoacetonitrile. Spectroscopic and MS-CASPT2 Calculations. *ChemPhysChem* **2020**, *21* (11), 1126–1133. https://doi.org/10.1002/cphc.202000201.

[637] Golas, P. L.; Tsarevsky, N. V.; Matyjaszewski, K. Structure–Reactivity Correlation in "Click" Chemistry: Substituent Effect on Azide Reactivity. *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, *29* (12–13), 1167–1171. https://doi.org/10.1002/marc.200800118.

[638] Verkhozina, O. N.; Kizhnyaev, V. N.; Vereshchagin, L. I.; Rokhin, A. V.; Smirnov, A. I. Synthesis of Polynuclear Nonfused Azoles. *Russ. J. Org. Chem.* **2003**, *39* (12), 1792–1796. https://doi.org/10.1023/B:RUJO.0000019746.10504.f3.

[639] Ryu, J. S.; Lee, so Y. 1, 2, 3-Triazole Derivative Compound as Hsp90 Inhibitor, and Use Thereof. WO2021137665A1, July 8, **2021**.

[640] Chen, G.; Zhou, Y.; Cai, C.; Lu, J.; Zhang, X. Synthesis and Antifungal Activity of Benzamidine Derivatives Carrying 1,2,3-Triazole Moieties. *Molecules* **2014**, *19* (5), 5674–5691. https://doi.org/10.3390/molecules19055674.

[641] Yuan, H.; Silverman, R. B. New Substrates and Inhibitors of γ-Aminobutyric Acid Aminotransferase Containing Bioisosteres of the Carboxylic Acid Group: Design, Synthesis, and Biological Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (5), 1331–1338. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.09.067.

[642] Díez-González, S.; Nolan, S. P. [(NHC)$_2$Cu]X Complexes as Efficient Catalysts for Azide–Alkyne Click Chemistry at Low Catalyst Loadings. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2008**, *47* (46), 8881–8884. https://doi.org/10.1002/anie.200803289.

[643] Colombano, G.; Travelli, C.; Galli, U.; Caldarelli, A.; Chini, M. G.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Bifulco, G.; Tron, G. C.; Genazzani, A. A. A Novel Potent Nicotinamide Phosphoribosyl transferase Inhibitor Synthesized via Click Chemistry. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (2), 616–623. https://doi.org/10.1021/jm9010669.

[644] Xu, X.; Zhong, Y.; Xing, Q.; Gao, Z.; Gou, J.; Yu, B. Ytterbium-Catalyzed Intramolecular [3 + 2] Cycloaddition Based on Furan Dearomatization to Construct Fused Triazoles. *Org. Lett.* **2020**, *22* (13), 5176–5181. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c01780.

[645] Berridge, M. S.; Franceschini, M. P.; Rosenfeld, E.; Tewson, T. J. Cyclic Sulfates: Useful Substrates for Selective Nucleophilic Substitution. *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (4), 1211–1217. https://doi.org/10.1021/jo00291a020.

[646] Wasserscheid, P.; Paape, N.; Boesmann, A.; Schulz, P. Preparation of ionic liquids and their application. WO2009152902A2, US8642778B2, December 23, **2009**.

[647] Helberger, J. H.; Manecke, G. Halogen-containing sulfonates. DE895559, November 05, **1953**.

[648] Helberger, J. H.; Manecke, G.; Heyden, R. Organic sulfonic acids. III. Alkylation reactions of the sultones, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1949**, *565* (1), 23–35.

F. Partie expérimentale : Chapitre 4

[649] Resin Loading Measurement by Fmoc Cleavage, Aaptec, *Technical Support Information Bulletin 1198*, https://www.peptide.com/custdocs/1198r1.pdf?osCsid=nf5b6ms0da50s49kb6abtb84j5 (see 01/02/2021).

[650] Kaiser Test (Ninhydrin Test), Aaptec, *Technical Support Information Bulletin 1188.*, https://www.peptide.com/custdocs/1188%20ninhydrin%20test.pdf?osCsid=nf5b6ms0da50s49kb6abtb84j5 (see 01/02/2021).

[651] Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. *Anal. Biochern.* **1970**, *34* (2), 595–598. https://doi.org/10.1016/0003-2697(70)90146-6.

[652] Sarin, V. K.; Kent, S. B. H.; Tam, J. P.; Merrifield, R. B. Quantitative Monitoring of Solid-Phase Peptide Synthesis by the Ninhydrin Reaction. *Anal. Biochem.* **1981**, *117* (1), 147–157. https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90704-1.

[653] Wellings, D. A.; Atherton, E. Standard Fmoc Protocols. *Meth. Enzymol.*; Solid-Phase Peptide Synthesis; Academic Press, **1997,** *289* (1), 44–67. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)89043-X.

[654] Satake, K.; Okuyama, T.; Ohashi, M.; Shinoda, T. The Spectrophotometric Determination of Amine, Amino Acid and Peptide with 2, 4, 6-Trinitrobenzene 1-Sulfonic Acid. *J. Biochem.* **1960**, *47* (5), 654–660. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a127107.

[655] Snyder, S. L.; Sobocinski, P. Z. An Improved 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic Acid Method for the Determination of Amines. *Anal. Biochem.* **1975**, *64* (1), 284–288. https://doi.org/10.1016/0003-2697(75)90431-5.

[656] Fields, R. The Rapid Determination of Amino Groups with TNBS. *Meth. Enzymol.,* Enzyme Structure, Part B; Academic Press, **1972**, *25* (1), 464–468. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(72)25042-X.

Résumé

Titre : Nouveaux réactifs de chimie bio-orthogonale pour l'imagerie *in vivo* et la thérapie des cancers

Résumé : Les travaux de thèse ont porté sur l'étude de l'impact de la présence d'un groupe sulfo sur une tétrazine radiofluorée, et d'une chaine PEG sur un vecteur TCO, pour des applications par réaction IEDDA *in vivo* en imagerie et théranostiques afin d'en améliorer les performances. Dans une première partie, la synthèse de tétrazinesultones originales, envisagées comme précurseurs des sulfotétrazines, a été explorée selon trois stratégies : la fonctionnalisation de la butanesultone avec un dérivé halométhyltétrazinique approprié, le couplage de Sonogashira entre une halotétrazine et la butanesultone propargylique, et le réaction de CuAAC entre une azidotétrazine et la butanesultone propargylique. La voie par réaction de CuAAC s'est avérée la plus efficace. Elle a conduit à une tétrazinesultone inédite. La seconde partie de thèse a été dédiée à la synthèse d'une sulfotétrazine radiofluorée à partir d'un précurseur sultone par réaction d'ouverture du cycle avec le [^{18}F]-fluorure. La radiosynthèse de la [^{18}F]-fluorosulfotétrazine a été réalisée selon la voie CuAAC en 3 étapes avec un RCY de 63% manuellement, et de 27-31% sur l'automate GE TRACERlab FX N Pro et un temps total de synthèse de 90-95 min. Les valeurs de Log P (-1,3) et Log D (-1,7) ont confirmé les propriétés hydrophiles de la [^{18}F]-fluorosulfotétrazine. Les investigations par imagerie TEP ont révélé une élimination rapide par voie rénale et urinaire majoritairement ainsi qu'une totale stabilité. Des analogues sulfotétrazines portant une entité fluorescente ou chélatante ont été également. D'autre part, le peptide NeoBOMB1, ligand antagoniste du récepteur du peptide libérant de la gastrine (GRPR), a été fonctionnalisé par différentes longueurs de chaine de polyéthylène glycol l'écartant du *trans*-cyclooctène (TCO). Ces TCO-PEG$_n$-NeoBOMB1 ont été marqués par l'indium-111 ou le lutétium-177 dans l'objectif d'être utilisé dans des applications théranostiques. Ces NeoBOMB1 ont finalement été évalués dans un essai de pré-ciblage avec une tétrazine de référence ([^{111}In]In-DOTA-PEG$_{11}$-Tz) sur membranes cellulaires, et ont révélés un optimum pour un espaceur PEG$_{12}$.

Mots clés : imagerie médicale, tomographie par émission de positrons (TEP), chimie « click », bioorthogonale, pré-ciblage, réaction de Diels-Alder à demande inverse d'électron (IEDDA), tétrazine (Tz), fluor-18 (^{18}F), radiochimie, marquage, radiofluoration, Huisgen (CuAAC), sultone, fluorosulfonate, fluorosulfotétrazine, radiométaux, indium-111 (^{111}In), lutétium-177 (^{177}Lu), NeoBOMB1 (NeoB), polyéthylène glycol (PEG), synthèse peptidique en phase solide (SPPS) et *trans*-cyclooctène (TCO).

Abstract

Title: New bio-orthogonal chemistry reagents for *in vivo* imaging and cancer therapy

Abstract: The objective of the project was the study of the influence of a sulfo group on a radiofluorinated tetrazine, and of a PEG chain on a TCO vector, for applications by *in vivo* IEDDA reaction in imaging and theranostics. In a first part, the synthesis of original tetrazinesultones as precursors of sulfotetrazines, was explored according to three strategies: the functionalization of butanesultone with an appropriate halomethyltetrazine derivative, the Sonogashira coupling between a halotetrazine and propargyl butanesultone, and the CuAAC reaction between an azidotetrazine and propargyl butanesultone. The CuAAC reaction route has been proved to be the method of choice leading to a novel tetrazinesultone. The second part of the thesis was dedicated to the synthesis of a radiofluorinated sulfotetrazine based on the ring opening reaction with [^{18}F]-fluoride from a sultone precursor. The radiosynthesis of [^{18}F]-fluorosulfotetrazine was carried out according to the CuAAC route in 3 steps with an RCY of 63% manually, and 27-31% on the GE TRACERlab FX N Pro automaton, and a total synthesis time of 90 -95 mins. Log P (-1.3) and Log D (-1.7) values confirmed the hydrophilic properties of [^{18}F]-fluorosulfotetrazine. Investigations by PET imaging revealed rapid elimination mainly via renal and urinary route, as well as a total stability. Sulfotetrazine analogs bearing a fluorescent or a chelating moiety have also been developed. In a third part, the peptide NeoBOMB1, an antagonistic ligand of the gastrin releasing peptide receptor (GRPR), was functionalized with polyethylene glycol chains of different lengths in the view of separating peptide from *trans*-cyclooctene (TCO). The obtained TCO-PEG$_n$-NeoBOMB1 were labeled with indium-111 and lutetium-177 for theragnostic applications. The radioactive NeoBOMB1 were finally evaluated in a pre-targeting assay with a reference tetrazine ([^{111}In] In-DOTA-PEG$_{11}$-Tz) on cell membranes, and revealed an optimum for a PEG$_{12}$ spacer.

Keywords: medical imaging, positron emission tomography (PET), bioorthogonal « click » chemistry, pre-targeting, inverse electron-demand Diels–Alder reaction (IEDDA), tetrazine (Tz), fluorine-18 (^{18}F), radiochemistry, labelling, radiofluorination, Huisgen (CuAAC), sultone, fluorosulfonate, fluorosulfotetrazine, radiometals, indium-111 (^{111}In), lutetium-177 (^{177}Lu), NeoBOMB1 (NeoB), polyethylene glycol (PEG), solid phase peptide synthesis (SPPS) and *trans*-cyclooctene (TCO).