



HAL
open science

Synthèse, radiomarquage et caractérisation *in vitro* et *in vivo* de nouveaux radiotraceurs pour l'imagerie TEP de la neuroinflammation

Eugénie Pincemail

► To cite this version:

Eugénie Pincemail. Synthèse, radiomarquage et caractérisation *in vitro* et *in vivo* de nouveaux radiotraceurs pour l'imagerie TEP de la neuroinflammation. Chimie organique. Université Paris-Saclay, 2024. Français. NNT : 2024UPASF066 . tel-04864080

HAL Id: tel-04864080

<https://theses.hal.science/tel-04864080v1>

Submitted on 4 Jan 2025

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.

Synthèse, radiomarquage et caractérisation *in vitro* et *in vivo* de nouveaux radiotraceurs pour l'imagerie TEP de la neuroinflammation

*Synthesis, radiolabeling, in vitro and in vivo characterisation of new
radiotracers for PET imaging of neuroinflammation*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale °571 : sciences chimiques : molécules matériaux, instrumentation et biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat : Chimie
Graduate School : Chimie. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Laboratoire d'Imagerie Biomédicale Multimodale Paris Saclay (Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Inserm)**, sous la direction de **Bertrand KUHNAST**, ingénieur-chercheur et le co-encadrement de **Mylène RICHARD**, ingénieur-chercheur

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 27 Novembre 2024, par

Eugénie PINCEMAIL

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Valérie COLLOT Professeur des Universités, Université Caen Normandie	Président
Nadia PELLEGRINI-MOÏSE Maître de Conférences HDR, L2CM, Université de Lorraine	Rapporteur & Examineur
Philippe GARRIGUE Professeur des Universités et Praticien-Hospitalier, C2VN, Université Aix-Marseille	Rapporteur & Examineur
Annelaure DAMONT Ingénieur-chercheur, Université Paris-Saclay, CEA (SPI)	Examineur
Marie-Pierre HECK Ingénieur-chercheur HDR, Université Paris-Saclay, CEA (SCBM)	Examineur

Remerciements

Je tenais à remercier en premier lieu les membres du jury qui ont accepté de juger ces travaux en tant que rapporteurs, le docteur Nadia Pellegrini-Moïse, maître de conférences à l'université de Nancy, et le professeur Philippe Garrigue, professeur à l'université d'Aix-Marseille.

Je remercie également le docteur Annelaure Damont, ingénieur-chercheur au CEA Saclay, le docteur Marie-Pierre Heck, ingénieur-chercheur au CEA Saclay ainsi que le professeur Valérie Collot, professeur à l'université de Caen Normandie, qui ont accepté d'évaluer mes travaux.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi, le docteur Sandrine Lamandé-Langle et le docteur Fabien Chauveau, pour le temps passé à suivre mon parcours et mes travaux sur ces trois années de thèse.

Je remercie également le professeur Vincent Lebon de m'avoir accueillie dans son unité de recherche pour réaliser mon doctorat.

Je voudrais remercier chaleureusement mon directeur de thèse, le docteur Bertrand Kuhnast, qui m'a permis de réaliser ce travail au sein de son équipe. Il a toujours su être disponible malgré ses dizaines de réunions/visio et ses conseils ont toujours été d'une grande aide. Nos discussions, scientifiques et du quotidien, ont été de vrais moments de convivialité qui ont fait que ces trois années de thèse se sont passées dans la joie et la bonne humeur.

Je remercie sincèrement le docteur Mylène Richard, qui m'a encadrée lors de la thèse. Ta grande patience, ta disponibilité ainsi que tes conseils ont été essentiels pour me guider dans ces travaux. Ta gentillesse et tes encouragements ont été essentiels pour mon épanouissement à la fois professionnel et personnel. J'espère avoir coché les cases en tant que première doctorante pour que tu continues tes encadrements. 영기 et 봄미 te remercient infiniment pour avoir pris soin d'eux!

Je remercie ensuite toute l'équipe de chimie, en commençant par Simon pour ces moments de rigolades lors des pauses café/bar/congrès. Une nouvelle et belle aventure t'attend, profite en bien. Notre duo de radiochimistes de l'extrême : Françoise, ma sauveuse en tout temps, tu as sauvé plus d'une fois mes manips, sans toi je crois que l'automate serait parti en fumée et les biologistes auraient eu ma tête ! Stéphane merci de toujours intervenir en urgence quand j'en ai besoin mais je ne te remercie pas pour mes quelques manips loupées à cause de tes déconnexions de tuyaux. Votre bonne humeur et vos histoires ont toujours su me donner la pêche pour la journée. Fabien, un grand merci pour tes conseils et continue tes œuvres artistiques que j'espère voir un jour dévoilées au monde entier.

Je remercie Marie-Anne pour les manip effectuées ensemble qui m'ont permis d'apprendre plein de nouvelles choses dans le domaine. Bon courage pour la suite et j'espère un jour voir une nouvelle espèce d'insecte ayant ton nom au vu de cet incroyable écosystème qu'est ton jardin.

Je remercie également Maxime et Julien d'avoir effectué les irradiations pour les radiosynthèses à toute heure.

Je remercie aussi Zélie, Alexandre, Steve et Maxime pour ces bons moments passés ensemble à diverses occasions que nous avons pu trouver. Zélie et Alexandre, bon courage pour la suite de vos thèses, vous verrez, on tient le bon bout. Steve et Maxime, bon courage pour la suite de vos aventures.

Salla, je sais que tu pourras comprendre ces quelques mots ! Kiitos pour tous ces bons moments passés ensemble au labo, au bar et en congrès. J'espère que tu arriveras à agrandir ta collection de verres à bière et que tu continueras tes vidéos d'aventurière expatriée. Kippis !

Je voudrais finir par remercier mes collègues devenus amis Julien et Sébastien. Ce trio que nous avons formé a été ma force durant ces trois années de thèse. Tous ces moments partagés ensemble au bureau, au labo, aux congrès, aux bars et nos week-ends resteront à jamais gravés dans ma mémoire. Julien, on a commencé et on termine ensemble l'aventure SHFJ. Je te souhaite bon courage pour la suite à Dijon. Seb, je te souhaite de continuer à t'épanouir à Curium en te baladant aux 4 coins de l'Europe.

Je remercie également les biologistes Alexandra, Caroline et Hayet pour toutes les manip TEP et autoradiographies ainsi que les petits goûters improvisés. Votre patience face à mes questions font de vous des personnes incroyables. Alexandra, il faudra que tu me donnes la recette du Feuerzangenbowle !!

Je remercie également Sébastien, Maud, Sophie pour leur soutien lors des manip TEP.

Enfin, je voudrais remercier mes autres compatriotes du labo, mon coven, Sarah, Soizic, Sophie, Gaëlle, Amélie ainsi que Goran, Marie, Ambre, Cassandre, Léa. Nos moments partagés ont su rythmer ma vie au labo. Merci également à toutes les personnes que j'ai pu croiser durant mon aventure à BioMaps.

Je remercie également mes amis issus de divers horizons : team 77/91, team master, team AirFrance, team P13, team Canada, team Orgenoy et tous les autres qui ont suivi de près et de loin mon parcours de thésarde. A défaut de comprendre ce que je fais, votre soutien a été d'une grande aide émotionnelle et non les amis ce n'est pas avec une thèse que l'on gagne un prix Nobel.

Pour finir, je voudrais remercier ma famille qui a été d'un soutien indéfectible lors de ces trois années malgré ses hauts et ses bas. Merci à vous chers parents, de m'avoir apporté toutes ces chances pour en arriver ici et à vous mon cher frère et ma chère belle-sœur pour toujours trouver le moyen de me remonter le moral (les sushis c'est la vie !).

Et merci à mes deux petits soleils Maxence et Gaël, tata Ninie vous aime !!

Abréviations

AAV	Associated adeno virus
AC	Adénylyl cyclase
ACN	Acétonitrile
AcOEt	Acétate d'éthyle
ADK	Adénosine kinase
ADO	Adénosine
ADP	Adénosine dihosphate
AiO	AllInOne
A _M	Activité molaire
AMP	Adénosine monophosphate
Aq.	Aqueux / aqueuse
Ar	Aromatique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BEMP	2- <i>tert</i> -Butylimino-2-diethylamino-1,3-dimethylperhydro-1,3,2-diazaphosphorine
BHE	Barrière hémato-encéphalique
Boc	<i>Tert</i> -butoxycarbonyle
cAMP	Adénosine monophosphate cyclique
CCM	Chromatographie sur couche mince
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène
DCM	Dichlorométhane
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMA	<i>N,N</i> -diméthylacétamide
DMAP	<i>N,N</i> -diméthyl-4-aminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMF-DMA	<i>N,N</i> -diméthylformamide diméthyle acétal
DMI	1,3-diméthyl-2-imidazolidinone
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EC ₅₀	Concentration efficace médiane
EC ₈₀	Concentration efficace à 80 %
ED ₅₀	Dose efficace médiane

EDC	1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
Et ₂ O	Diéthyléther
Et ₃ N	Triéthylamine
eq	Equivalent
FDG	2-fluoro-2-désoxy-D-glucose
G6PD	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
HATU	Hexafluorophosphate de (diméthylamino)- <i>N,N</i> -diméthyl(3 <i>H</i> -[1,2,3]triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridin-3-yloxy)méthaniminium
HLM	Human liver microsomes (microsomes hépatiques humains)
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HPLC	High performance liquid chromatography (chromatographie liquide haute performance)
HRMS	High resolution mass spectrometry (spectrométrie de masse haute résolution)
IC ₅₀	Concentration inhibant 50 % de la liaison ligand-récepteur
IRM	Imagerie par résonance magnétique
J	Constante de couplage (Hz)
K ₂₂₂	4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosane
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LPC	Lysophosphatidylcholine
LPS	Lipopolysaccharide
MAO-B	Monoamine oxydase-B
Me	Méthyle
MeOH	Méthanol
MND	Maladies neurodégénératives
Ms	Mésyle (méthylsulfonyl)
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NI	Neuroinflammation
Nu	Nucléophile
P450	Cytochrome P450
P2Y ₁₂ R	récepteur P2Y ₁₂
Pd/C	Palladium sur charbon
PEG	Polyéthylène glycol
P-gp	Glycoprotéine-P
Ph	Phényle

PMB	<i>para</i> -méthoxybenzylamine
Py	Pyridine
ppm	Partie par million
QMA	Quaternary méthyl ammonium
quant.	Quantitatif
RAS	Radioactivité spécifique
RCPG	Récepteurs couplé aux protéines G
RLM	Rat liver microsomes (microsomes hépatiques de rats)
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RCC	Conversion radiochimique
S _N 2	Substitution nucléophile d'ordre 2
S _N Ar	Substitution nucléophile aromatique
SNC	Système nerveux central
SUV	Standardized uptake value ou valeur de fixation normalisée
t _{1/2}	Période radioactive d'un radioisotope
TEMP	Tomographie par émission monophotonique
TEP	Tomographie par émission de positons
THF	Tétrahydrofurane
TLE	Transfert linéique d'énergie
TFA	Acide trifluoroacétique
TSPO	Protéine translocatrice 18 kDa
UV	Ultraviolet

Avant-propos

A propos de la thèse

Cette thèse a été réalisée du 8 octobre 2021 au 7 octobre 2024 au sein de l'équipe Développement de Radiopharmaceutiques et d'agents d'Imagerie (DRIM) du laboratoire d'imagerie BIOMédicale MultimodAle Paris-Saclay (BioMaps, UMR CEA-INSERM-Université Paris-Saclay) au Service Hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ) à Orsay. Le SHFJ est une composante de l'institut Joliot, lui-même rattaché à la Direction de la Recherche Fondamentale (DRF) du Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA). Ce service est un centre d'imagerie médicale implanté sur le site hospitalier d'Orsay assurant le rôle à la fois d'un service de médecine nucléaire et d'un laboratoire de recherche et de développement dans les domaines de l'oncologie et de la neurologie principalement.

L'imagerie médicale regroupe l'ensemble des différentes techniques d'imagerie qui permettent d'acquérir des informations sur l'anatomie ou le fonctionnement des organes. L'objectif est d'établir des diagnostics, d'effectuer un suivi thérapeutique ou d'analyser et comprendre des processus biologiques impliqués dans des pathologies. Parmi ces différentes techniques, l'imagerie TEP est une modalité d'imagerie moléculaire qui présente un intérêt particulier pour l'imagerie en oncologie ou des pathologies du système nerveux central. Cette technique repose sur l'injection et le suivi de la biodistribution d'un radiotracer, une molécule possédant un atome émetteur de positons qui doit être le plus spécifique possible du biomarqueur d'intérêt. La disponibilité et la spécificité des radiotraceurs sont des aspects limitants et leur développement est long et coûteux. Actuellement, la recherche en TEP s'oriente vers le développement de radiotraceurs plus spécifiques qui permettent d'aller plus loin dans la compréhension des phénomènes biologiques et qui conduisent à des diagnostics plus précoces et plus précis. C'est dans ce contexte que s'inscrivent mes travaux de thèse sur le développement de nouveaux radiotraceurs ciblant des biomarqueurs spécifiques de la neuroinflammation, un phénomène récurrent de nombreuses pathologies neurologiques, pour une utilisation en imagerie TEP. Pour étudier ce phénomène, deux composantes du système nerveux central ont été ciblées : les microglies et les astrocytes. Ces cellules jouent un rôle immunitaire essentiel de soutien et de protection du système nerveux central et sont activées lors d'un événement inflammatoire.

A propos du manuscrit

Ce manuscrit est constitué de quatre parties. La première partie est consacrée au contexte scientifique des travaux effectués lors de la thèse. Elle introduit les notions d'imagerie TEP ainsi que les différentes réactions de marquage possibles au carbone-11 et au fluor-18. Elle présente également des notions sur le mécanisme de la neuroinflammation ainsi que les cibles et les traceurs associés pouvant servir d'outils de diagnostic de la neuroinflammation. Les deuxième et troisième parties sont dédiées aux résultats obtenus selon les cibles visées, les microglies ou les astrocytes. Ces deux parties rapportent les synthèses mises au point pour développer de nouveaux ligands, leur radiomarquage au carbone-11 ou au fluor-18 ainsi que leur évaluation *in vitro* et *in vivo*. Pour finir, la dernière partie regroupe les protocoles expérimentaux de synthèse organique, de radiochimie ainsi que des évaluations biologiques qui ont été menés tout au long de ce projet. Cette dernière partie a volontairement été rédigée en anglais afin de faciliter sa diffusion. Des sections dédiées aux références, aux formations et productions scientifiques effectuées viennent compléter ce manuscrit.

A propos des productions scientifiques

Publication:

- E. Pincemail, M.A. Peyronneau, C. Denis, N. Van Camp, A. Bemelmans, H. Pigeon, S. Goutal, H. Al Hroub, M. Théry, S. Beuché, C. Muller, B. Kuhnast, A. Winkeler, M. Richard, Synthesis, labelling and biological evaluation of original P2Y₁₂ radioligands for TEP imaging of neuroinflammation, en cours de rédaction.

Communications orales:

- New astrocytes radioligands for PET imaging of neuroinflammation.
Journée de l'école doctorale 2MIB, Saclay, France, juin **2024**
NOMaten RADiopharmaceuticals, Varsovie, Pologne, juin **2024**
- Original radiotracers targeting P2Y₁₂ receptors for neuroinflammation imaging: from synthesis to biological evaluation.
REncontres en Chimie Organique Biologique, Aussois, France, mars **2024**
- Synthesis and radiolabeling of new tracers targeting P2Y₁₂ receptors for imaging of neuroinflammation.
Groupe De Recherche Agents d'Imagerie Moléculaire, Orléans, France, octobre **2022**.
- Synthesis, radiolabeling and *in vitro* and *in vivo* characterization of novel P2Y₁₂ purinergic receptor radiotracers.
Ecole d'automne NOMATEN, Espoo, Finlande, septembre **2022**

Communications par posters:

- New radiotracers for PET imaging of neuroinflammation: synthesis, radiolabeling and biological evaluation.
Groupe De Recherche Agents d'imagerie moléculaire, Paris, France, octobre **2023**
NOMaten RADiopharmaceuticals, Varsovie, Pologne, juin **2024**
- P2Y₁₂ receptors, targets of new PET radiotracers for imaging of neuroinflammation.
European Molecular Imaging Meeting, Salzburg, Autriche, mars **2023**
Journée de l'école doctorale 2MIB, Saclay, France, juin **2023** (prix du meilleur poster)
- Synthesis and optimization of radiotracers targeting P2Y₁₂ receptors for positron emission tomography imaging of neuroinflammation.
International Symposium of Radiopharmaceutical Sciences, Nantes, France, mai **2022**
Journée de l'école doctorale 2MIB, Saclay, France, mai **2022**

A propos des formations effectuées

- Echange au laboratoire du Dr Christa Müller de la faculté de Pharmacie de l'université de Bonn, **2023**, Bonn, Allemagne (1 mois)
- Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche, **2021** (16 h)
- Formation Complémentaire en Radioprotection, **2022** (11 h)
- Formation « Réussir votre projet professionnel et vos entretiens de recrutement », **2024** (21 h)
- Formation « Enjeux de la transition écologique », **2024** (12 h)
- Formation Crises environnementales : Comprendre les enjeux et solutions, **2024** (12 h)
- Formation « Agir contre les violences sexistes et sexuelles », **2024** (3 h)
- 3^{èmes} Journées du Groupe De Recherche « Agents d'Imagerie Moléculaire », **2021**, Grenoble, France (18 h)
- 4^{èmes} Journées du Groupe De Recherche « Agents d'Imagerie Moléculaire », **2022**, Orléans, France (18 h)
- Journée d'hiver du Club des Radiopharmaceutiques, Laboratoire Cyceron, **2023**, Caen, France (8 h)
- Journée d'hiver du Club des Radiopharmaceutiques, Nancyclotep, **2024**, Nancy, France (8 h)
- Séminaire de printemps du Club Français des Radiopharmaceutiques, **2024**, Montpellier, France (8 h)
- Journée de l'Ecole Doctorale 2MIB, **2022**, Saclay, France (6 h)
- Journée de l'Ecole Doctorale 2MIB, **2023**, Saclay, France (6 h)
- Journée de l'Ecole Doctorale 2MIB, **2024**, Saclay, France (6 h)
- Ecole d'été HEALTHI « Therapeutic Innovations », **2022**, Saint Rémy-lès-Chevreuse, France (20 h)
- Ecole d'automne NOMATEN, **2022**, Espoo, Finlande (22 h)
- International Symposium of Radiopharmaceutical Sciences (iSRS), **2022**, Nantes, France (24 h)
- European Molecular Imaging Meeting (EMIM), **2023**, Salzbourg, Autriche (18 h)
- REnccontres en Chimie Organique Biologique (RECOB), **2024**, Aussois, France, (24 h)
- NOMaten RADiopharmaceuticals, **2024**, Varsovie, Pologne (24 h)

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE 1

I. MEDECINE NUCLEAIRE ET IMAGERIE TEP	3
I.1. GENERALITES	3
I.2. PRINCIPE DE LA TEP	4
I.3. RADIOISOTOPES UTILISES EN TEP	5
I.4. PRODUCTION DES RADIOISOTOPES	8
I.5. RADIOMARQUAGE AU CARBONE-11	9
I.6. RADIOMARQUAGES AU FLUOR 18	15
II. LA NEUROINFLAMMATION	29
II.1. PHENOMENE BIOLOGIQUE	29
II.2. DIAGNOSTIC ET SUIVI DE LA MALADIE	30
III. PROJET DE THESE	48

DEVELOPPEMENT DE RADIOTRACEURS CIBLANT LES RECEPTEURS P2Y₁₂ 53

I. CONCEPTION D'UN NOUVEAU RADIOTRACEUR	55
II. SYNTHÈSE DES COMPOSÉS	56
II.1. SYNTHÈSE DU SYNTHON A	57
II.2. SYNTHÈSE DU SYNTHON B	60
II.3. COUPLAGE DES DEUX SYNTHONS	62
II.4. SYNTHÈSE DES RÉFÉRENCES FROIDES	66
III. ÉVALUATION <i>IN VITRO</i> DES COMPOSÉS	67
III.1. TESTS D'AFFINITÉ	67
III.2. MÉTABOLISME DES COMPOSÉS	72
IV. RADIOMARQUAGE DES COMPOSÉS	74
IV.1. PRÉPARATION DES PRÉCURSEURS DE MARQUAGE	75
IV.2. RADIOMARQUAGE AU CARBONE 11	76
IV.3. RADIOMARQUAGE AU FLUOR 18	80
V. ÉVALUATION DES COMPOSÉS RADIOMARQUÉS	83
V.1. MODÈLE ANIMAL	83
V.2. AUTORADIOGRAPHIES SUR COUPES DE CERVEAUX	84
V.3. IMAGERIE TEP	88

V.4. BIODISTRIBUTION DES TRACEURS	92
V.5. METABOLISME <i>IN VIVO</i> DU COMPOSE MARQUE AU FLUOR-18	95
VI. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	97

DEVELOPPEMENT DE RADIOTRACEURS CIBLANT L'ADENOSINE KINASE 101

I. CONCEPTION DE TRACEURS BASES SUR ABT-702	103
II. SYNTHÈSE DE RADIOLIGANDS ANALOGUES D'ABT-702	104
II.1. SYNTHÈSE D'ABT-702	104
II.2. PRÉPARATION DES RÉFÉRENCES FROIDES ET DES PRÉCURSEURS DE MARQUAGE	106
II.3. RADIOMARQUAGE DES COMPOSÉS	116
III. ÉVALUATIONS BIOLOGIQUES	125
III.1. DÉTERMINATION DE L'AFFINITÉ DES COMPOSÉS	125
III.2. IMAGERIE TEP	127
IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	128

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 131

PARTIE EXPERIMENTALE 137

I. ORGANIC SYNTHESIS	139
I.1. GENERAL PROCEDURES	139
I.2. EXPERIMENTAL PROCEDURES	140
II. RADIOCHEMISTRY	192
II.1. GENERAL INFORMATION	192
II.2. ANALYTICAL METHODS	192
II.3. CARBON-11 RADIOCHEMISTRY	193
II.4. FLUORINE-18 RADIOCHEMISTRY	197
III. BIOLOGICAL ASSAYS	202
III.1. P2Y ₁₂ LIGANDS	202
III.2. ABT-702 LIGANDS	207

BIBLIOGRAPHIE 209

Introduction générale

I. Médecine nucléaire et imagerie TEP

I.1. Généralités

La médecine nucléaire est une spécialité de la médecine utilisant les propriétés d'éléments radioactifs, nommés aussi radionucléides, pour des applications de diagnostic et thérapeutiques. Ces éléments radioactifs sont incorporés sur des molécules vectrices ciblant spécifiquement des cibles biologiques d'intérêt et les radiopharmaceutiques ou radiotraceurs ainsi préparés sont injectés dans le corps humain. Le radiopharmaceutique se distribue ensuite dans le corps pour aller se fixer de manière sélective à sa cible, qui est par exemple une protéine spécifique d'une maladie située sur un organe ou un tissu biologique. En fonction du radionucléide utilisé, l'objectif de l'application médicale diffère. Pour des fins de diagnostic/suivi d'une maladie (imagerie médicale), il est important que le rayonnement ionisant émis par le radionucléide ait un pouvoir de pénétration des tissus important. C'est le cas par exemple des rayonnements γ (gamma) issus du phénomène d'annihilation entre positons et électrons. Dans le cadre de la thérapie, seules les cellules ciblées (cellules malades) doivent être touchées, le rayonnement doit donc avoir un transfert linéique d'énergie (TLE) important, c'est-à-dire que la particule ionisante doit avoir une énergie de transfert élevée associée à une faible pénétration des tissus biologiques. C'est le cas des rayonnements α (alpha) et des rayonnements β^- (bêta).

En médecine nucléaire, deux grands types d'imageries sont employés :

- L'imagerie par tomographie par émission monophotonique (TEMP)
- L'imagerie par tomographie par émission de positons β^+ (TEP)

Ces deux techniques permettent de suivre *in vivo* le devenir du radiopharmaceutique injecté. Lors d'une scintigraphie par TEMP, ce sont les rayonnements γ émis qui sont détectés par la gamma caméra après injection d'un radiotraceur approprié. On peut citer comme exemple l'iode-123 utilisé pour l'imagerie de la thyroïde, ou le technicium-99m utilisé pour visualiser les os. L'imagerie TEP repose elle sur la détection indirecte d'un positon β^+ émis par le radiotraceur. Elle permet de fournir des informations qualitatives sur la cinétique de la biodistribution du composé ainsi que des informations quantitatives sur les processus métaboliques ou les biomarqueurs spécifiques visés. Cette technique sensible est souvent couplée avec d'autres techniques d'imagerie comme l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou la tomodensitométrie (TDM) afin d'avoir les données anatomiques correspondantes. Pour la suite de ce manuscrit, étant donné que mon travail de thèse s'est articulé autour de la TEP, je me suis focalisée sur cette technique que je vais décrire plus précisément dans la prochaine partie.

I.2. Principe de la TEP

L'imagerie TEP clinique, aussi appelé TEP-scanner ou TEP-scan, est un examen de médecine nucléaire. Il se déroule en plusieurs étapes selon le processus décrit dans la Figure 1. Dans un premier temps, le radiotracer est injecté au patient puis ce dernier est mis en attente le temps que le traceur se distribue dans le corps et s'accumule sur sa cible. Il est à noter que les doses traceuses injectées ainsi que le temps d'exposition relativement court du patient à la radioactivité n'induisent pas d'effets pharmacologiques et ne présentent donc pas de danger pour sa santé. Le patient est ensuite installé en salle d'examen et le TEP-scan est effectué. Les données de l'examen sont reconstituées par traitement informatique pour former des images 3D du corps du patient.

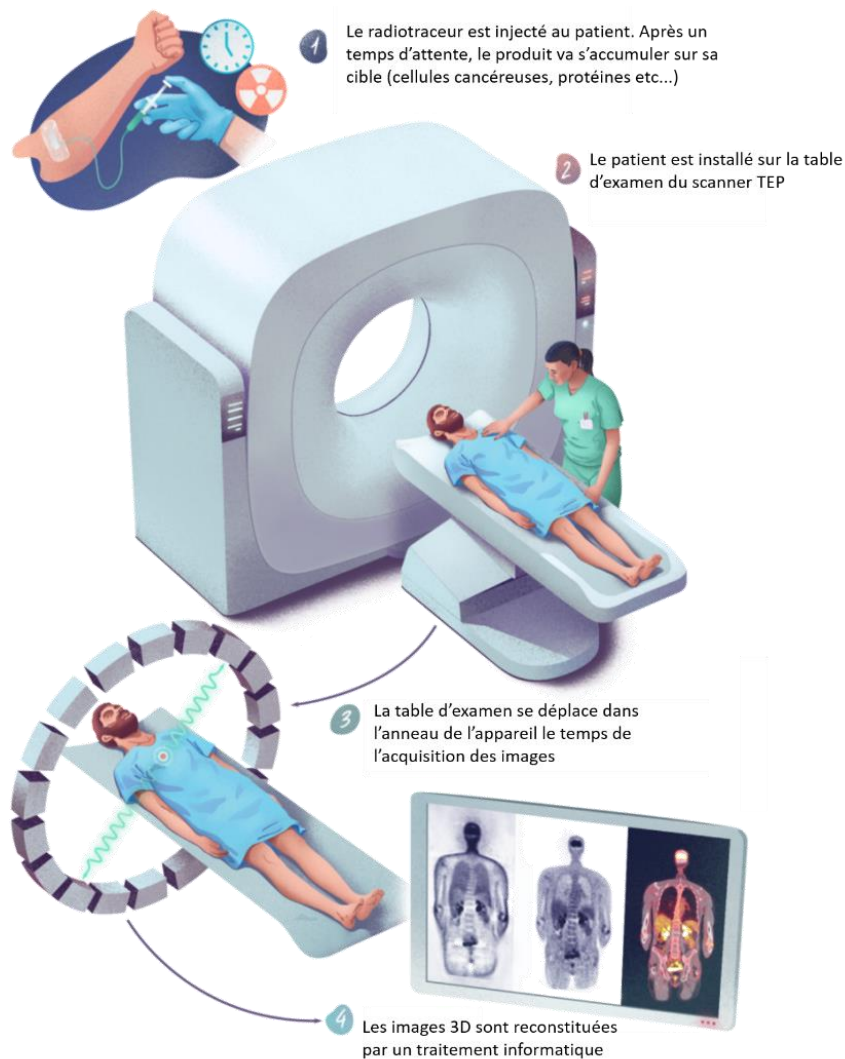


Figure 1. Réalisation d'un examen TEP clinique (illustration de Pierre Bourcier).¹

La reconstitution de ces images repose sur la détection indirecte d'un positon β^+ , une particule possédant la même masse et le même spin qu'un électron mais qui a une charge opposée.² Quand ce positon est émis par le radionucléide émetteur, il parcourt dans les tissus biologiques un chemin qui dépend de son énergie. Il rencontre alors un électron du milieu et cela produit une réaction d'annihilation qui génère deux photons γ d'énergie égale à 511 keV avec un angle d'incidence de 180° l'un de l'autre (Figure 2). Ce sont ces deux photons qui sont détectés simultanément par la couronne de détection de la caméra TEP. Suite à l'acquisition des données, un traitement informatique par des algorithmes de reconstruction permet la reconstruction des images tridimensionnelles.

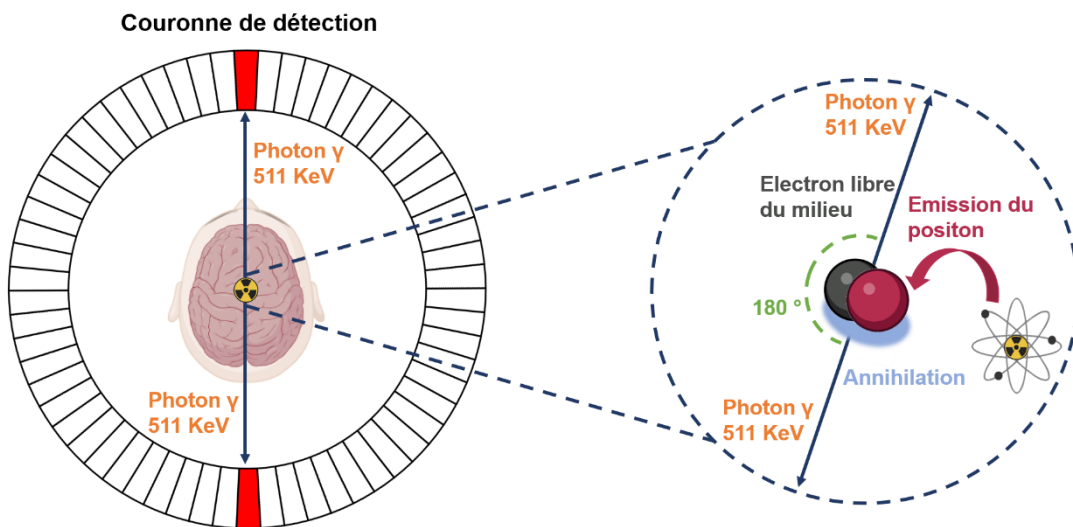


Figure 2. Principe de fonctionnement de l'imagerie TEP avec le phénomène d'annihilation.

I.3. Radioisotopes utilisés en TEP

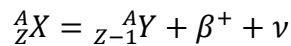
Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la TEP repose sur l'emploi de radioisotopes émetteurs de positons. Il en existe divers, chacun se caractérise selon différentes propriétés :

- **La période radioactive**, ou temps de demi-vie ($t_{1/2}$), qui définit l'intervalle de temps au bout duquel l'activité de l'isotope est divisée par deux. Cette valeur est calculée à partir de la constante de désintégration λ , une caractéristique propre à chaque radioisotope :

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

Ce temps de demi-vie peut varier de quelques secondes (oxygène-15 : 123 secondes) à plusieurs jours (zirconium-89 : 78,4 heures). Cette propriété est un critère déterminant pour le choix d'utilisation d'un radioisotope.

- **L'énergie maximale (E_{\max})** qui correspond à l'énergie maximale du positon émis pour se déplacer dans le milieu jusqu'au phénomène d'annihilation avec un électron. Cette énergie influence grandement la résolution spatiale de l'imagerie TEP.
- **Le libre parcours moyen** qui correspond à la distance moyenne parcourue par le positon avant la perte de son énergie cinétique et le phénomène d'annihilation. Cette distance moyenne est corrélée avec l'énergie maximale du positon et est un deuxième critère d'influence de la résolution spatiale de l'imagerie TEP.
- **Le mode de désintégration**, ou de décroissance, qui définit la transformation du radionucléide instable après l'émission de particules de son noyau. Pour les émetteurs de positons, la désintégration se fait par l'émission du positon (β^+) et d'un neutrino (ν) selon l'équation suivante :



Le noyau Y obtenu, dit noyau fils, est un noyau stable pour certains radionucléides tels que le carbone-11 qui se désintègre en bore-11 ou le gallium-68 qui se désintègre en zinc-68. Certains radioisotopes possèdent plusieurs modes de désintégration. Dans le cas de l'imagerie TEP, plus la proportion de désintégration en β^+ est importante comparée aux autres modes, meilleure est la qualité des images.

- **L'activité molaire (A_M) théorique**, qui correspond à la quantité de radioactivité par unité de quantité de matière (exprimée en moles) :

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

Où N_A représente la constante d'Avogadro.

L'activité molaire théorique maximale est atteinte lorsque le radioisotope est pur. Ceci n'est jamais le cas lors de la synthèse d'un radiotraceur à cause de la présence de l'isotope stable dans le milieu réactionnel (carbone-12 du dioxyde de carbone de l'air ou fluor-19 présent dans les réactifs chimiques utilisés ou dans les tuyaux Teflon de transfert du cyclotron vers l'automate par exemple).

Les radioisotopes les plus utilisés en imagerie TEP à ce jour sont le carbone-11 (^{11}C), le fluor-18 (^{18}F), le cuivre-64 (^{64}Cu), le gallium-68 (^{68}Ga) ainsi que le zirconium-89 (^{89}Zr). Leurs différentes propriétés physiques sont répertoriées dans le tableau suivant (Tableau 1).²

Tableau 1. Propriétés physiques des isotopes émetteurs de β^+ utilisés en imagerie TEP.

Isotope	Demi-vie	$E_{\max}\beta^+$ (keV)	Parcours moyen maximum dans l'eau (mm)	Mode de décroissance	A_M (GBq/ μ mol)	Chimie de marquage
^{11}C	20,4 min	960	4,1	β^+ (99,8%), CE	$3,41 \cdot 10^5$	Covalente
^{18}F	109,8 min	635	2,4	β^+ (96,9%), CE	$6,33 \cdot 10^4$	Covalente & Coordination
^{64}Cu	12,6 h	656	2,5	β^+ (17,5%), β^- , CE	$9,13 \cdot 10^3$	Coordination
^{68}Ga	67,8 min	1899	8,2	β^+ (88,0%), CE	$1,02 \cdot 10^5$	Coordination
^{89}Zr	78,4 h	902	3,8	β^+ (22,7%), CE, γ	$4,44 \cdot 10^5$	Coordination

*CE : capture électronique (pas de radiation émise)

Une autre caractéristique des radioisotopes est la méthode utilisée pour radiomarquer le composé cible. Il existe deux méthodes ; certains composés sont marqués de manière covalente, comme dans le cas du marquage au carbone-11, d'autres nécessitent l'utilisation d'un chélate qui est préalablement conjugué à la (bio)molécule d'intérêt, comme lors d'un marquage au cuivre-64 ou au zirconium-89. L'atome de fluor-18 peut-être introduit par ces deux méthodes en fonction de la structure du traceur souhaité. La méthode de marquage utilisée dépend donc de l'isotope ciblé et est déterminante pour le design des radiotraceurs et précurseurs de marquage correspondants.

I.3.1. Radioisotopes covalents

Les radioisotopes covalents sont liés de façon covalente sur la molécule d'intérêt. Les plus utilisés en imagerie TEP sont le carbone-11 et le fluor-18 qui ont respectivement une demi-vie de 20.4 minutes et de 109.8 minutes. Leur insertion se fait généralement à la dernière étape de synthèse afin de minimiser la perte d'activité liée à la décroissance radioactive de l'isotope et la perte de l'atome radioactif due à la formation potentielle de sous-produits lors d'étapes de synthèses réalisées après le marquage. Le radiomarquage au carbone-11 présente l'avantage de permettre un marquage isotopique de la plupart des molécules, c'est-à-dire le remplacement d'un atome de carbone-12 stable par un carbone-11. Le composé marqué ayant la même structure que le ligand d'origine, il n'y a donc pas de changement d'affinité *in vivo* du composé pour sa cible. Cependant, sa courte période radioactive limite son application à plusieurs

niveaux. Premièrement, il n'est pas adapté pour marquer des composés ayant un temps de biodistribution long, tels que certaines protéines ou les anticorps. En outre, il n'est pas possible d'envisager sa distribution à différents centres hospitaliers pour des examens d'imagerie, le radiotracteur doit être préparé dans l'hôpital où il sera injecté. Concernant le marquage au fluor-18, le principal avantage comparé au carbone-11 est sa demi-vie radioactive plus longue. Il est ainsi possible de produire des radiotraceurs marqués au fluor-18 dans un endroit et de les transporter ensuite dans d'autres centres, parfois situés à plusieurs centaines de kilomètres du centre de production. De plus, le fluor étant considéré comme un bio-isostère de l'atome d'hydrogène, son introduction sur des structures moléculaires de médicaments ou de biomolécules d'intérêt ne modifie, en théorie, pas ou très peu les interactions biologiques avec la cible.³

I.3.2. Radioisotopes coordinants

La deuxième catégorie de radioisotopes utilisés en TEP concerne principalement des isotopes métalliques (⁶⁴Cu, ⁶⁸Ga, ⁸⁹Zr). Ces radiométaux permettent le radiomarquage du composé d'intérêt par complexation avec un chélate adapté préalablement ancré sur le composé. Cependant, la fonctionnalisation de la biomolécule avec un chélate peut entraîner des modifications des propriétés pharmacologiques de la molécule. De plus, le choix du chélate doit être bien adapté au métal utilisé. En effet, il peut y avoir des possibilités de relargage du radiométal *in vivo* si la complexation n'est pas assez stable.⁴

Au cours de ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés uniquement à des marquages avec des isotopes covalents (carbone-11 et fluor-18). La suite de cette partie introductive sera donc focalisée sur ces deux radioisotopes.

I.4. Production des radioisotopes

Les radioisotopes utilisés pour l'imagerie TEP sont majoritairement produits artificiellement par des cyclotrons biomédicaux. Le cyclotron est un accélérateur électromagnétique de haute fréquence. L'action associée d'un champ magnétique et d'un champ électrique permet d'accélérer un faisceau de particules chargées (des hydrures ou des deutons) entre deux électrodes métalliques où règne un vide poussé (10^{-5} mbar). Les particules provenant d'une source d'hydrogène située au centre du cyclotron vont alors être accélérées avec une trajectoire en spirale du centre vers l'extérieur de l'aimant tout en accumulant de l'énergie (de quelques MeV jusqu'à plusieurs centaines de MeV). Une fois l'énergie acquise, le faisceau d'hydrures est transformé en protons par passage sur une feuille de carbone appelée stripper. Ce changement de signe des particules engendre leur changement de direction dans le champ magnétique et les dirige vers une cible composée d'éléments stables (solides, liquides ou gazeux), permettant ainsi la réaction nucléaire aboutissant au radio-isotope souhaité en fonction

du type de cible utilisé (Figure 3). C'est le cas de pratiquement tous les isotopes utilisés pour l'imagerie biomédicale à l'exception du gallium-68. Ce dernier est produit par un générateur $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, où le germanium-68 radioactif adsorbé sur une matrice se désintègre par capture électronique afin d'aboutir au gallium-68 qui est élué sélectivement. Il est à noter que le gallium-68 peut également être produit en cyclotron à partir de zinc-68.

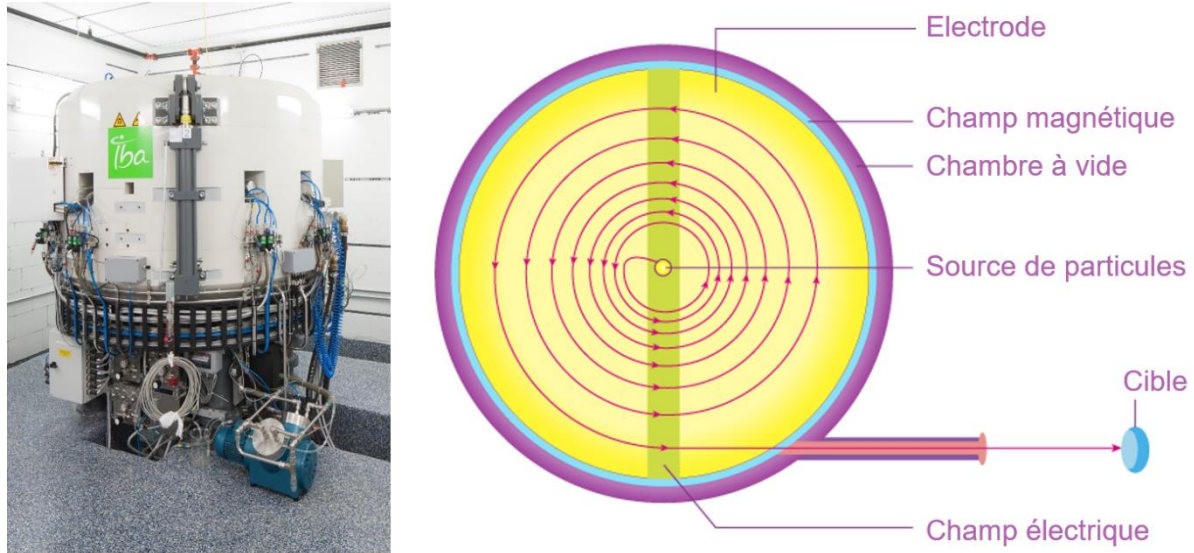


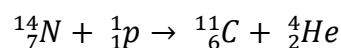
Figure 3. Principe de fonctionnement d'un cyclotron.

I.5. Radiomarquage au carbone-11

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, le carbone-11 est un radioisotope de choix : il présente une courte période radioactive (20.4 min), limitant ainsi les doses reçues par les patients, un mode de désintégration presque uniquement par émission de positons β^+ et l'énergie cinétique du positon émis lors de sa désintégration permet d'obtenir une bonne résolution spatiale. De plus le carbone est un élément central et abondant de tout composé pharmaceutique. Tous ces avantages font que le marquage au carbone-11, de manière isotopique ou non, est très utilisé pour le développement de nouveaux radiotraceurs.

I.5.1. Production du carbone 11

Le carbone-11 est produit à l'aide d'un cyclotron à partir de la réaction nucléaire suivante :



La cible, remplie d'azote-14 gazeux, est bombardée par des protons, ce qui va conduire à la formation de carbone-11. Ce carbone-11 est obtenu sous forme de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ si la cible contient un très faible pourcentage d'oxygène ou sous forme de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ si la cible contient de

l'hydrogène. Ces premiers composés formés avec du carbone-11 sont appelé **précurseurs primaires** (Schéma 1). Ces précurseurs primaires peuvent réagir à nouveau pour fournir une multitude de précurseurs dit secondaires qui seront utilisés pour marquer la molécule voulue.⁵ Les principaux sont le **monoxyde de carbone**, l'**iodure de méthyle**, le **triflate de méthyle** ou le **cyanure d'hydrogène** (Schéma 1). Ces précurseurs secondaires seront ensuite engagés dans différentes réactions avec les conditions réactionnelles appropriées pour radiomarquer les précurseurs de marquage.

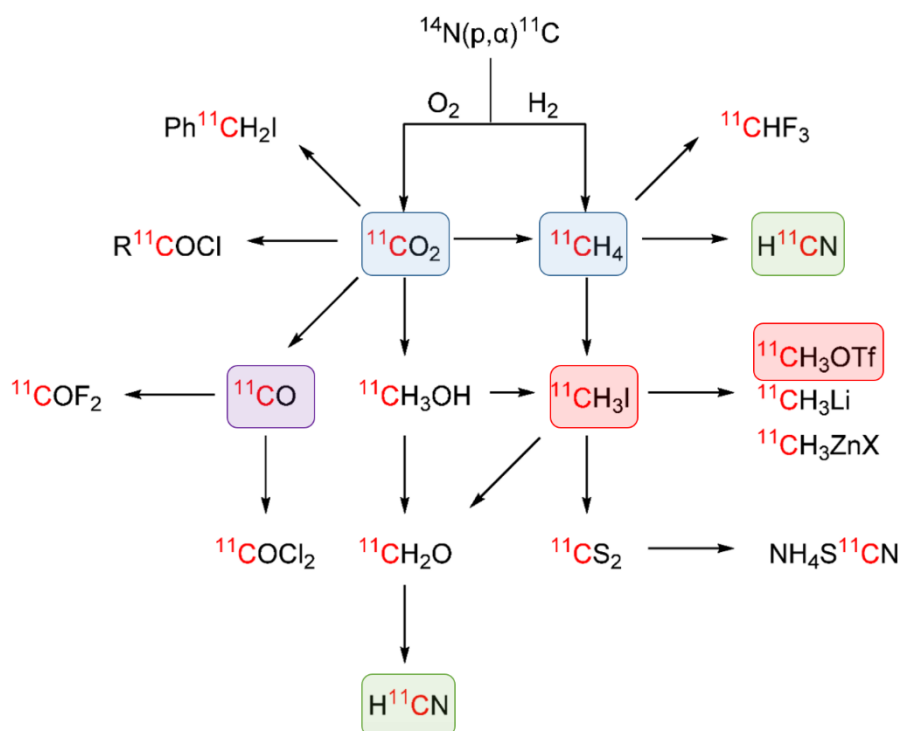


Schéma 1. Production des précurseurs primaires (en bleu) et secondaires pour le radiomarquage au carbone-11.⁵

I.5.2. Marquage par radiométhylation

La méthylation est la réaction la plus communément utilisée pour marquer des composés au carbone-11. Deux agents méthylants sont employés, l'iodure de [^{11}C]méthyle et le triflate de [^{11}C]méthyle. Le triflate de [^{11}C]méthyle est plus réactif que l'iodure de [^{11}C]méthyle, il est en effet moins volatile et plus soluble dans les solvants de réaction.⁶ L'iodure de [^{11}C]méthyle, suffisamment réactif pour la plupart des réactions de méthylation, est également très utilisé.

Il existe deux méthodes de préparation des réactifs de méthylation ; une dite liquide et une autre dite gazeuse (Schéma 2). La méthode historique est la méthode liquide développée par Langström et Lundqvist en 1976.⁷ Le [^{11}C]CO₂ issu du cyclotron est réduit en [^{11}C]CH₃OH par réaction avec l'aluminohydru de lithium (LiAlH₄) en solution dans le tétrahydrofurane (THF) puis la réaction du [^{11}C]CH₃OH avec l'acide iodhydrique conduit au [^{11}C]CH₃I. Pour la

méthode gazeuse, développée à la fin des années 1990, le $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ est d'abord réduit en $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ par l'action de H_2 en présence de nickel puis $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ est formé par réaction du $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ avec le diiode à très haute température.^{8,9} Il est ensuite possible d'obtenir $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$, précurseur secondaire de méthylation, à partir de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ par réaction avec du triflate d'argent.^{10,11}

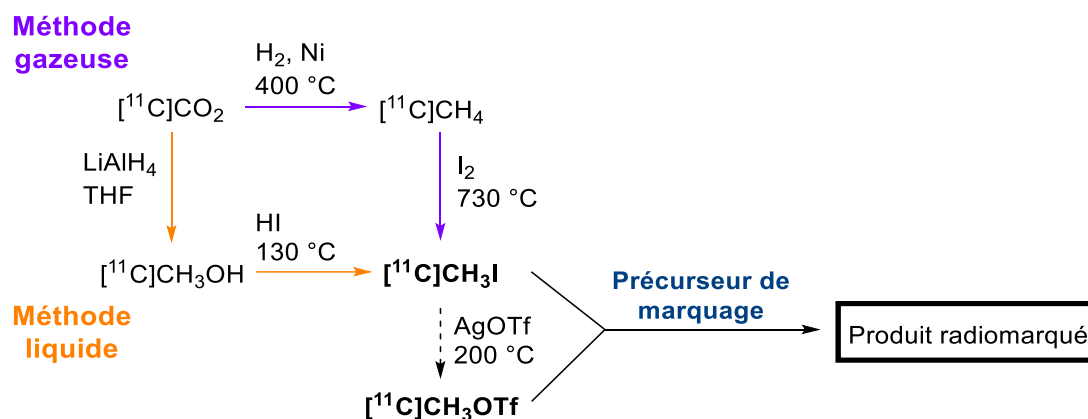
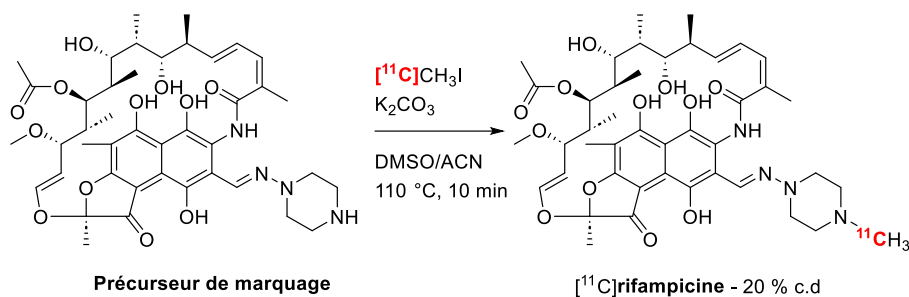


Schéma 2. Préparation des précurseurs secondaires $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ et $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ par les méthodes liquide et gazeuse.

Une fois le précurseur secondaire obtenu, il est mis en réaction avec le précurseur de marquage selon des conditions réactionnelles choisies. Ces deux agents méthylyants sont principalement utilisés pour préparer des composés *N*-, *O*-, et *S*- $[^{11}\text{C}]$ méthylés, mais ils peuvent également être utilisés pour introduire des groupements $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3$ au niveau de noyaux aromatiques.¹²

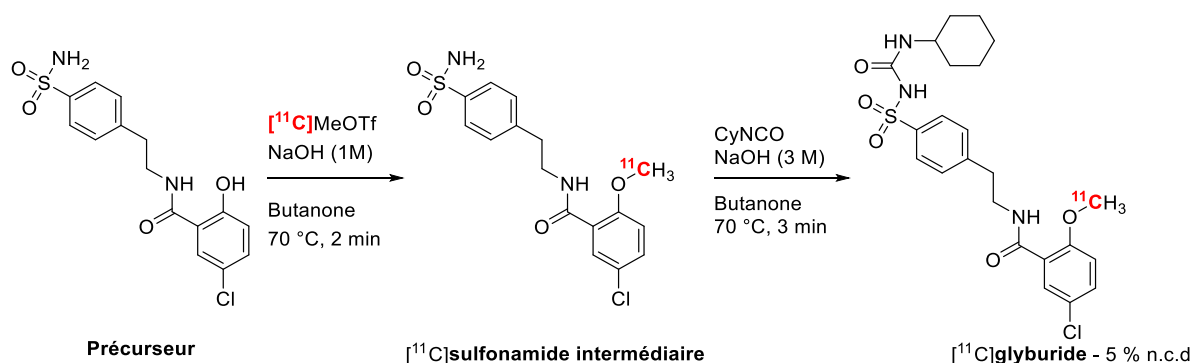
Exemple de *N*-méthylyation

La rifampicine est un antibiotique utilisé dans le traitement de la tuberculose, dont le mode d'action est d'inhiber la transcription des ARN messagers en se liant à l'ARN polymérase bactérienne.¹³ Le même composé marqué au carbone-11 est utilisé pour comprendre la biodistribution du médicament afin d'adapter le traitement (dose-dépendant) des patients.¹⁴ Son radiomarquage isotopique sur la position de la méthyle pipérazine a été effectué par l'iodure de $[^{11}\text{C}]$ méthyle en présence de carbonate de potassium dans un mélange DMSO/ACN (Schéma 3).¹⁵

Schéma 3. Préparation de la [¹¹C]rifampicine par N-méthylation.

Exemple de O-méthylation

Le glyburide, aussi appelé glibenclamide, est un médicament antidiabétique utilisé pour le traitement du diabète de type 2.¹⁶ Il a aussi été mis en évidence qu'il est substrat de différents transporteurs jouant un rôle soit dans la distribution, soit dans l'élimination de médicaments. Il est aussi transporté par les transports d'efflux ABC (ATP-binding cassette) tels que des protéines créant de la multi-résistance aux médicaments (MRP1, MRP2 ou MRP3) ou une protéine impliquée dans des mécanismes de chimiorésistance dans certains cancers du sein (BCRP).^{17,18} Ici encore, le radiomarquage isotopique de ce composé permet d'améliorer la compréhension du rôle des transporteurs lors d'un traitement. La radiosynthèse du [¹¹C]glyburide se fait en deux étapes. La première étape consiste en une O-méthylation sur la fonction hydroxyle du précurseur par le [¹¹C]CH₃OTf en présence de NaOH dans la butanone à 70 °C pendant 2 minutes. Ensuite le composé radiomarqué est mis en réaction avec un excès d'isocyanate de cyclohexyle et d'hydroxyde de sodium pour former un lien sulfonamide urée et obtenir le [¹¹C]glyburide marqué (Schéma 4).¹⁹

Schéma 4. Préparation en deux étapes du [¹¹C]glyburide.

Exemple de S-méthylation

L'exemple le plus connu de S-méthylation est la synthèse du radiotracteur [¹¹C]méthionine. Cet acide aminé marqué est utilisé pour l'imagerie de tumeurs cérébrales. La biosynthèse des protéines étant accélérée lors de la prolifération cellulaire des tumeurs, cela nécessite un apport

complémentaire de méthionine (composante des protéines), qui sera incorporée dans les protéines nouvellement formées.²⁰ Pour cette radiosynthèse, le précurseur de marquage, la L-homocystéine thiolactone, a été mise en réaction avec le $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ en présence de NaOH dans l'éthanol à 85 °C pendant 5 minutes pour former la $[^{11}\text{C}]$ méthionine (Schéma 5).^{6,7}

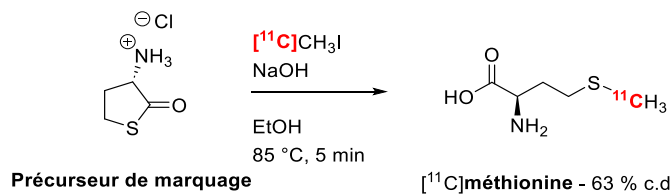


Schéma 5. Préparation de la $[^{11}\text{C}]$ méthionine

Exemple de méthylation de noyaux aromatiques

Le radiotracer $[^{11}\text{C}]\text{UCB-J}$ a été développé pour cibler la glycoprotéine 2A de la vésicule synaptique (SV2A), une protéine transmembranaire que l'on retrouve dans les vésicules synaptiques dans le cerveau.²¹ Cette cible cellulaire a été étudiée pour le développement de médicaments anti-épileptiques et est maintenant étudiée dans le cadre de maladies neurodégénératives.²² Son précurseur de marquage est un dérivé trifluoroborate qui réagit avec le $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ par couplage de Suzuki en présence de palladium pour conduire au traceur $[^{11}\text{C}]\text{UCB-J}$ (Schéma 6).

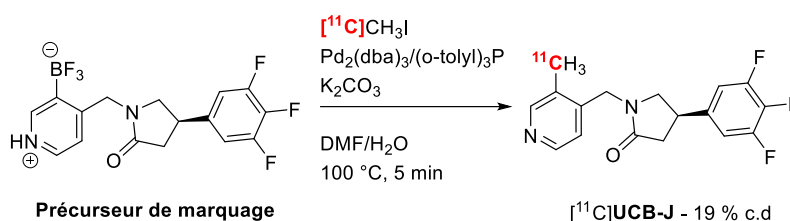


Schéma 6. Préparation du traceur $[^{11}\text{C}]\text{UCB-J}$

I.5.3. Réaction de carboxylation

L'utilisation du dioxyde de $[^{11}\text{C}]$ carbone est particulièrement intéressante puisque c'est un précurseur primaire directement produit par le cyclotron. Cependant, du fait de sa très grande stabilité, son utilisation implique l'emploi d'une base organique forte. Une première approche basée sur l'utilisation des réactifs de Grignard pour générer des acides carboxyliques radiomarqués a été mise au point.²³ Les réactifs de Grignard étant instables à l'air, leur utilisation dans un automate relève du challenge car il est difficile de rester sous atmosphère inerte. De ce fait, une deuxième méthode, dite de fixation, a été développée. L'idée, basée sur la recapture du CO_2 dans l'air, est d'utiliser des agents de fixation, qui sont des bases fortes (BEMP ou DBU), pour piéger le $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ à température ambiante et à faible pression.^{24,25} C'est

avec cette méthode que le radiotracteur [^{11}C]PF-04457845 a été obtenu (Schéma 7).²⁶ Ce traceur est un inhibiteur irréversible de la fatty acid amide hydrolase (FAAH), une enzyme intervenant dans les hydrolyses des acides gras.²⁶ Pour cette radiosynthèse, la base (BEMP) est d'abord mise en réaction avec le [^{11}C]CO₂ pour le rendre plus réactif, puis la 3-aminopyridazine est ajoutée afin d'obtenir l'acide carbamique intermédiaire. Cet acide intermédiaire réagit ensuite avec l'oxychlorure de phosphore (POCl₃), ce qui engendre sa déshydratation et la formation d'un dérivé isocyanate. Cet isocyanate réagit enfin avec un deuxième nucléophile (ici une pipéridine) afin d'obtenir le radiotracteur attendu.

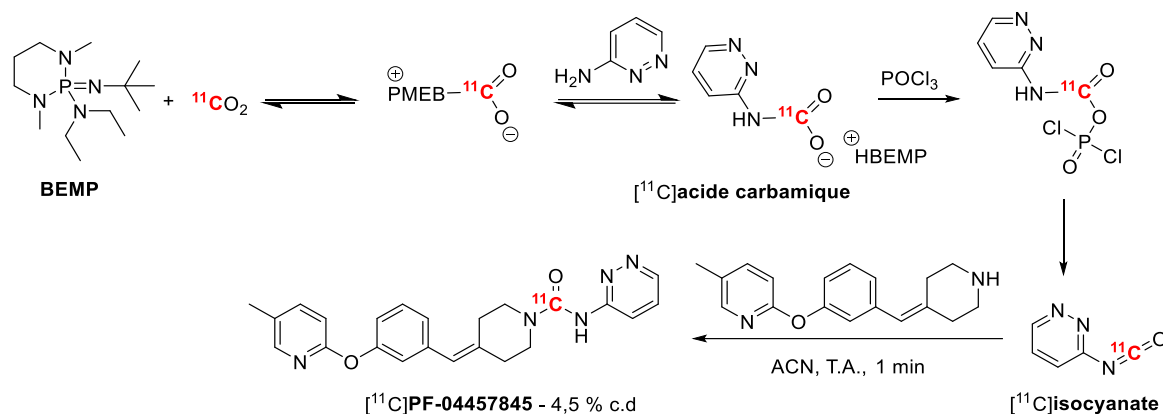
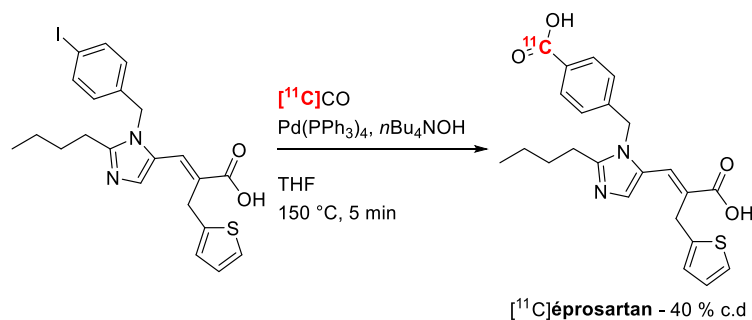


Schéma 7. Fixation du [^{11}C]CO₂ pour la préparation du traceur [^{11}C]PF-04457845.

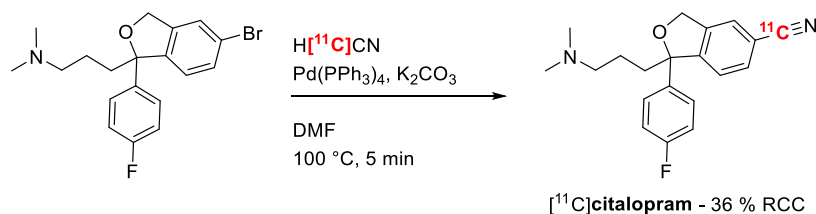
I.5.4. Réaction de carbonylation

Une autre manière de marquer au carbone-11 passe par l'utilisation de l'intermédiaire [^{11}C]CO. Cela permet de marquer différentes fonctions comme des cétones, des amides, des acides carboxyliques ou encore des esters. Le [^{11}C]CO est préparé à partir de la réduction du [^{11}C]CO₂ issu du cyclotron par passage au travers d'un tube de quartz contenant du zinc ou du molybdène à haute température. Ces radiomarquages sont souvent catalysés à l'aide d'un métal comme le palladium. On peut citer comme exemple la radiosynthèse du [^{11}C]éprosartan, un antihypertenseur. Le précurseur de marquage est un iodure d'aryle qui est chauffé à 150°C en présence de [^{11}C]CO, de Pd(PPh₃)₄ et de *n*Bu₄NOH, conduisant au composé souhaité en une étape une fois le [^{11}C]CO préparé (Schéma 8).²⁷

Schéma 8. Formation du [¹¹C]éprosartan.

I.5.5. Réaction de cyanation

La fonction cyano est souvent présente dans la structure des pharmacophores. De ce fait, des stratégies de marquage au carbone-11 par cyanation ont été mises en place. Le H[¹¹C]CN est un précurseur de marquage secondaire obtenu à partir [¹¹C]CH₄ par réaction avec de l'ammoniac sur un catalyseur au platine chauffé à 900 °C, lui-même obtenu par hydrogénation catalysé au nickel à partir du [¹¹C]CO₂ issu du cyclotron. L'utilisation du H[¹¹C]CN permet de réaliser des substitutions par réactions pallado-catalysées. Par exemple, le [¹¹C]citalopram, un inhibiteur de la recapture de la sérotonine dans le traitement de la dépression, a été obtenu par réaction de cyanation pallado-catalysée à partir du dérivé bromé correspondant par le groupe de Hooker (Schéma 9).²⁸ Ce même groupe a également démontré qu'il était possible de réaliser le radiomarquage à température ambiante en utilisant des ligands de type bi-aryle phosphine.

Schéma 9. Préparation du [¹¹C]citalopram

I.6. Radiomarquages au fluor 18

Le fluor-18 possède également des propriétés nucléaires particulièrement intéressantes. Sa demi-vie de 109.8 minutes, plus longue que celle du carbone-11, permet des réactions de marquage plus longues ou des stratégies multi-étapes plus élaborées. De plus, la biodistribution des molécules radiofluorées peut être étudiée sur un temps plus long. Son mode de désintégration ne produit quasiment que des positons (97 %). Il y a par ailleurs des possibilités de réaliser des marquages isotopiques car environ 20 % des composés à visée thérapeutique possèdent un atome de fluor. De plus, l'atome de fluor, qui a un rayon atomique assez petit, peut être considéré comme un bioisostère de l'atome d'hydrogène et le remplacement d'un

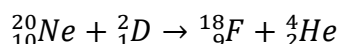
hydrogène par un fluor n'affecte pas de manière significative les propriétés biologiques d'un composé.²⁹ Tous ces avantages ont favorisé le développement de différentes réactions de radiomarquage pour l'incorporation du fluor-18. L'introduction sur la molécule d'intérêt est généralement réalisée dans les dernières étapes de synthèse, comme dans le cas du carbone-11.

I.6.1. Production du fluor 18

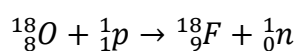
Le fluor-18 peut être produit sous deux formes à partir du cyclotron : sous forme moléculaire [¹⁸F]F₂ ou sous forme d'ions fluorures [¹⁸F]F⁻.

[¹⁸F]F₂ moléculaire

Le [¹⁸F]F₂ gazeux est obtenu par le cyclotron par deux réactions nucléaires possibles. La première méthode consiste à bombarder une cible de néon gazeux avec des deutons selon l'équation nucléaire suivante :



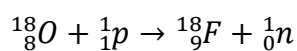
La deuxième méthode repose sur le bombardement d'une cible de dioxygène gazeux enrichie en oxygène-18 avec des protons selon l'équation suivante :



Dans les deux cas, le [¹⁸F]F₂ nouvellement formé est adsorbé sur la cible, ce qui rend son extraction difficile. La solution à ce problème est l'ajout d'une faible quantité de F₂ gazeux non radioactif pour entraîner les molécules de [¹⁸F]F₂, on parle dans ce cas d'une production avec entraîneur (carrier added). Cet ajout de F₂ non radioactif engendre une dilution isotopique qui se manifeste par une faible activité spécifique (100 à 600 MBq/μmol).³⁰

Ions fluorures [¹⁸F]F⁻

Les ions fluorures [¹⁸F]F⁻ sont formés par bombardement de protons sur une cible d'eau enrichie en oxygène-18 H₂[¹⁸O]O, selon l'équation :



Cette méthode permet d'accéder à de grandes quantités d'ions fluorures [¹⁸F]F⁻ en solution aqueuse avec des activités molaires élevées (de l'ordre de 100 GBq/μmol).³⁰

I.6.2. Réactions de fluoration électrophile

Historiquement, les premiers radiotraceurs marqués au fluor-18 ont été obtenus par radiofluoration électrophile par le [¹⁸F]F₂ moléculaire. Ce précurseur de marquage permet de

réaliser des réactions d'addition ou de substitution électrophile sur des composés riches en électrons comme des composés aromatiques ou des alcènes. C'est par cette méthode que la première radiosynthèse du [^{18}F]Fluoro-2-déoxy-D-glucose ([^{18}F]FDG) a été réalisée en 1978 (Schéma 10).³¹ Le [^{18}F]FDG est un analogue du glucose et rentre en compétition avec celui-ci lors de sa métabolisation par les cellules consommatrices d'énergie (cellules neuronales, cancéreuses...). C'est à ce jour le radiotracer le plus utilisé en imagerie TEP.³²

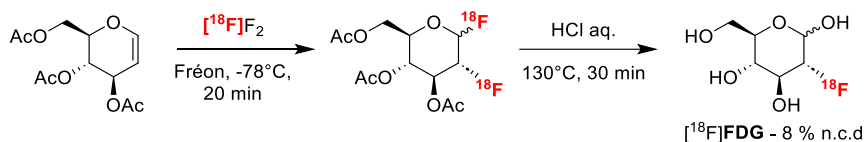


Schéma 10. Synthèse historique du [^{18}F]FDG par fluoration électrophile.

Cependant la radiofluoration électrophile présente des inconvénients, notamment liés à l'ajout de fluor-19 lors de la production du [^{18}F]F₂ qui engendre une faible activité molaire. D'autre part, malgré sa haute réactivité, l'inconvénient majeur de l'utilisation du [^{18}F]F₂ est son manque de régiosélectivité qui peut conduire à des difficultés lors des purifications dues à la formation de sous-produits.³³ Un deuxième inconvénient est le caractère oxydant du [^{18}F]F₂, ce qui peut être problématique lors d'un radiomarquage de peptide par exemple. L'oxydation de certains acides aminés, comme au niveau de l'atome de soufre de la méthionine, a parfois été constatée.³⁴ C'est pour ces raisons que des précurseurs de marquage secondaires ont été développés, comme [^{18}F]XeF₂, [^{18}F]AcOF, les sels de [^{18}F]fluoropyridinium, ou encore le [^{18}F]Selectfluor. Un exemple de traceur préparé par l'emploi de l'un de ces précurseurs secondaires est la 6-[^{18}F]fluoro-L-DOPA, un dérivé fluoré du précurseur de la formation du neurotransmetteur dopamine. Ce traceur est très utilisé pour l'imagerie des maladies neurodégénératives, notamment pour le suivi de la progression de la maladie de Parkinson.³⁵ Il a été radiomarké par fluoration électrophile avec le [^{18}F]Selectfluor par les groupes de Solin et de Gouverneur (Schéma 11).^{36,37}

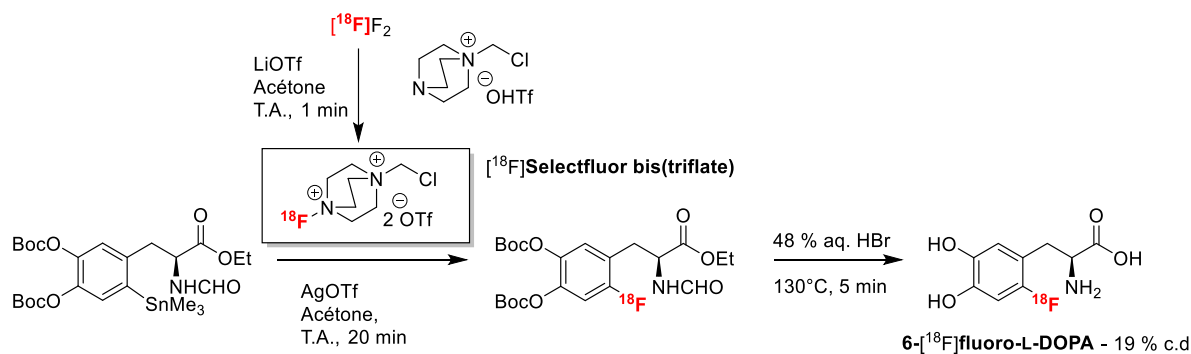


Schéma 11. Radiosynthèse de la 6-[^{18}F]fluoro-L-DOPA via l'utilisation du [^{18}F]Selectfluor bis(triflate).

I.6.3. Réactions de fluoration nucléophile

Au vu des inconvénients de la fluoration électrophile énumérés dans le paragraphe précédent, la fluoration nucléophile est à ce jour la méthode de marquage au fluor-18 la plus utilisée. L'ion fluorure est un nucléophile qui peut être utilisé dans des réactions de substitution nucléophile sur des composés aliphatiques ou aromatiques. Cependant, lors de la formation de ces ions fluorures, ces derniers sont solvatés par l'eau enrichie à partir de laquelle ils sont produits dans le cyclotron, ce qui diminue fortement leur nucléophilie. Il est donc généralement nécessaire de sécher ces ions avant toute réaction de marquage (Schéma 12). Pour se faire, la technique la plus courante est l'utilisation d'une cartouche remplie de résine échangeuse d'anions de type QMA (Quaternary Methyl Ammonium) qui est sous forme d'ions chlorures Cl^- ou hydrogénocarbonates HCO_3^- . La solution aqueuse d'ions fluorures qui vient du cyclotron est passée sur cette cartouche. Les ions fluorures sont piégés sur la résine et l'eau enrichie en oxygène-18 n'est pas retenue et passe au travers. Ensuite une solution organique ou organo-aqueuse contenant un sel (par exemple K_2CO_3 ou TfOK) permet l'échange des ions ^{18}F fluorures fixés sur la résine et leur élution par simple passage sur la cartouche. Généralement, cette solution d'élution contient également un cryptant, le kryptofix 222 (K_{222}) ou le 18-crown-6, qui aide à solubiliser les ions $^{18}\text{F}\text{F}^-$ par chélation du contre-ion utilisé pour l'échange sur la cartouche. Enfin, une étape de séchage azéotropique permet d'obtenir les ions $^{18}\text{F}\text{F}^-$ sous forme de sel ($\text{K}^{18}\text{F}\text{F}$, $\text{Et}_4\text{N}^{18}\text{F}\text{F}\dots$) ou de complexe ($\text{K}^{18}\text{F}\text{F}-\text{K}_{222}$) anhydre, prêt à être utilisé pour des radiofluorations.³⁸

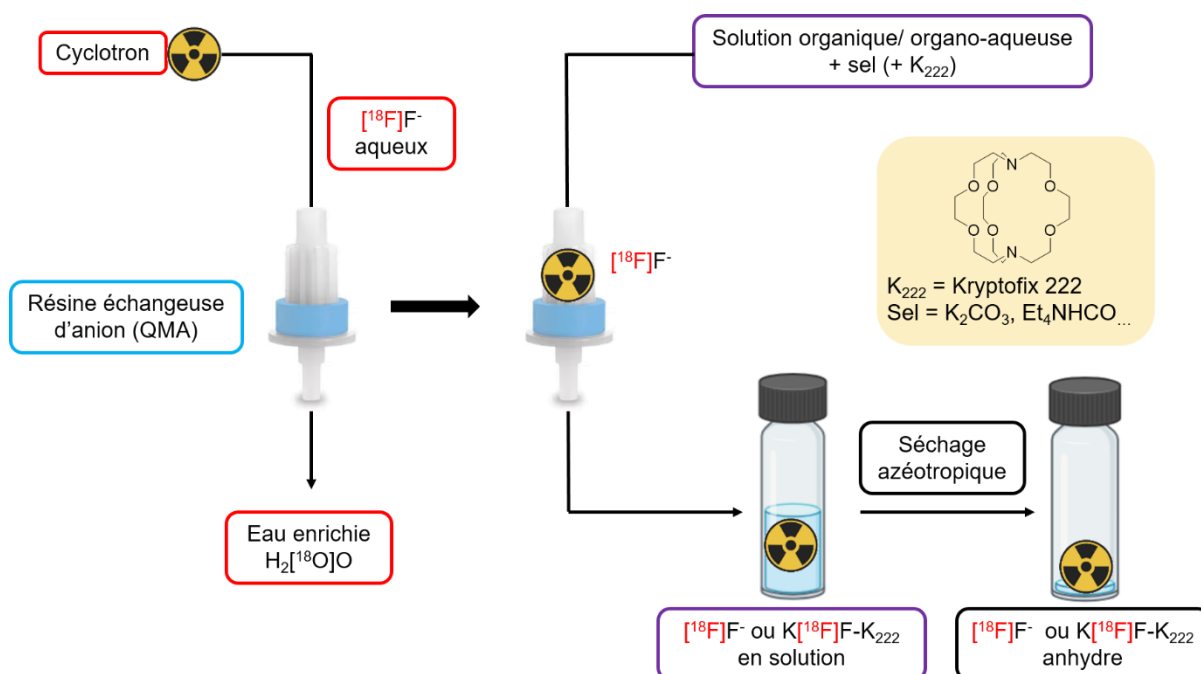


Schéma 12. Obtention des ions ^{18}F fluorures anhydres.

I.6.3.a. Substitutions nucléophiles aliphatiques

Les substitutions nucléophiles aliphatiques suivent généralement un mécanisme de type 2 (S_N2).³⁹ Le nucléofuge peut être un halogène ou un ester sulfonique (mésylate, triflate, tosylate). En général, cette méthode de marquage conduit aux composés voulus avec de bons rendements en une étape. Par exemple, le [^{18}F]DPA-714, dont la radiosynthèse a été développée au laboratoire, est marqué au niveau de la chaîne de l'éther aromatique par réaction du précurseur tosylé avec le complexe $K[^{18}F]F-K_{222}$ à 160 °C dans le DMSO (Schéma 13).^{40,41} Ce radiotracer, ciblant la protéine translocatrice TSPO, est très utilisé dans l'imagerie de la neuroinflammation dans le cadre de la maladie d'Alzheimer ou de l'épilepsie par exemple.^{42,43}

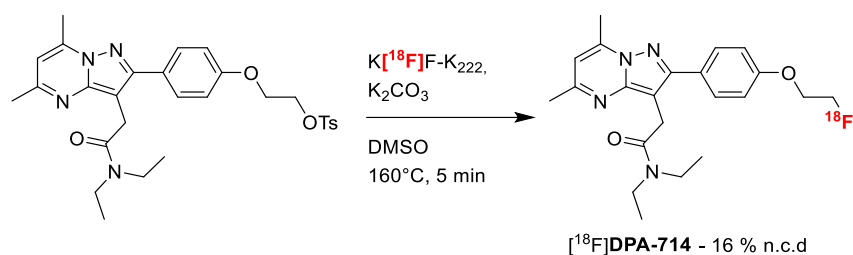


Schéma 13. Préparation du [^{18}F]DPA-714.

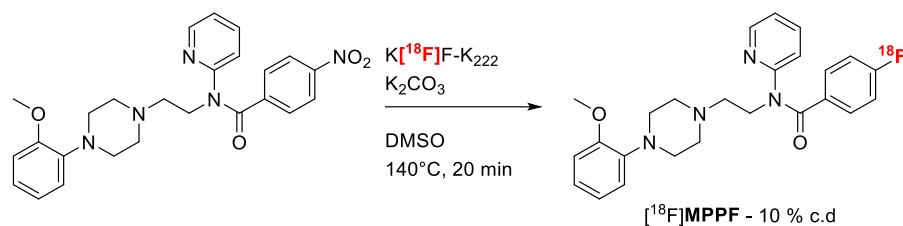
I.6.3.b. Substitutions nucléophiles aromatiques

Il est aussi possible de réaliser des substitutions nucléophiles aromatiques (S_NAr) avec le complexe $K[^{18}F]F-K_{222}$ sur des composés aromatiques appauvris en électrons par la présence de groupements électroattracteurs de type nitro, cyano, carbonyle ou carboxyle. Si ces groupements électroattracteurs se trouvent en *ortho* ou en *para* du groupement partant, l'effet mésomère est d'autant plus fort et la réaction favorisée. Par exemple, pour la radiosynthèse du composé [^{18}F]MPPF, un antagoniste des récepteurs de sérotonine de type 1A développé par le groupe de Kung,⁴⁴ le précurseur nitro est radiofluoré par S_NAr avec le complexe $K[^{18}F]F-K_{222}$ à 140 °C dans le DMSO (Schéma 14).^{45,46}

Il est également possible de réaliser des réactions de substitutions nucléophiles aromatiques sur des composés hétéroaromatiques. Par exemple, dans le cas de la pyridine, les positions 2 et 4 sont favorisées pour les S_NAr car l'intermédiaire de Meisenheimer est stabilisé par les effets inductif et mésomère de l'atome d'azote.⁴⁷ La présence d'un groupement électroattracteur n'est donc pas indispensable, contrairement aux composés aromatiques de type phényle. Le traceur norchloro[^{18}F]fluoroépibatidine a ainsi été développé par le groupe de Horti et Dannals (Schéma 14).⁴⁸ Ce composé est un dérivé de l'épibatidine, molécule naturelle présente sur la peau de grenouille venimeuse endémique de l'Equateur et du Pérou, et cible les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine pour l'imagerie de maladies neurodégénératives.⁴⁹ Ce marquage

se fait en deux étapes en commençant par la radiofluoration du précurseur nitro par le complexe $K[^{18}F]F-K_{222}$ à 150 °C dans le DMSO suivie d'une étape de déprotection de l'amine secondaire.

Noyau aromatique



Noyau hétéroaromatique

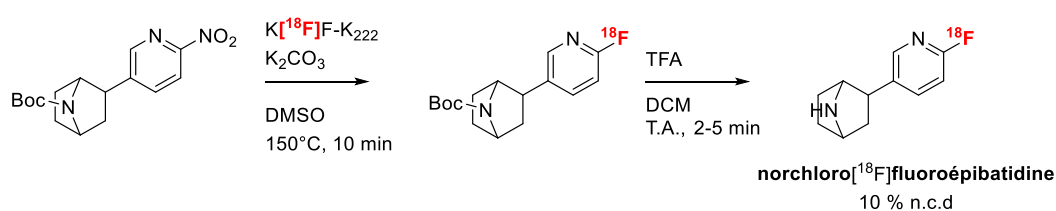


Schéma 14. Préparation des radiotraceurs $[^{18}F]MPPF$ et norchloro $[^{18}F]$ fluoroépipatidine.

Cependant, les conditions réactionnelles utilisées dans le cas de ces substitutions nucléophiles sont dures (températures de marquage élevées, pH modifié par l'utilisation de bases fortes). Ceci peut poser un problème de stabilité de certains précurseurs. De plus, ces marquages par substitution nucléophile aromatique ne concernent que des noyaux appauvris en électrons. Plus récemment, de nouvelles stratégies d'introduction du fluor-18 permettant le marquage de noyaux plus riches en électrons ont été rapportées. De nouveaux précurseurs de type phénols activés, sels d'iodonium, ylures d'iode, organoboranes ou trialkyle étain ont été mis au point dans ce sens.

I.6.3.c. Déoxyfluoration de dérivés phénoliques

En 2016, le groupe de Ritter a introduit une nouvelle méthode de radiomarquage par substitution nucléophile aromatique concertée de phénols.⁵⁰ Cette méthode ne nécessite pas de métaux et peut s'appliquer à des composés pauvres en électrons. Dans un premier temps, le phénol a été activé sous forme de sel d'uronium en présence d'un dérivé de chlorure d'imidazolium (Schéma 15). Puis cet intermédiaire est mis en réaction avec les ions $[^{18}F]$ fluorures dans un solvant favorisant la métathèse anionique.

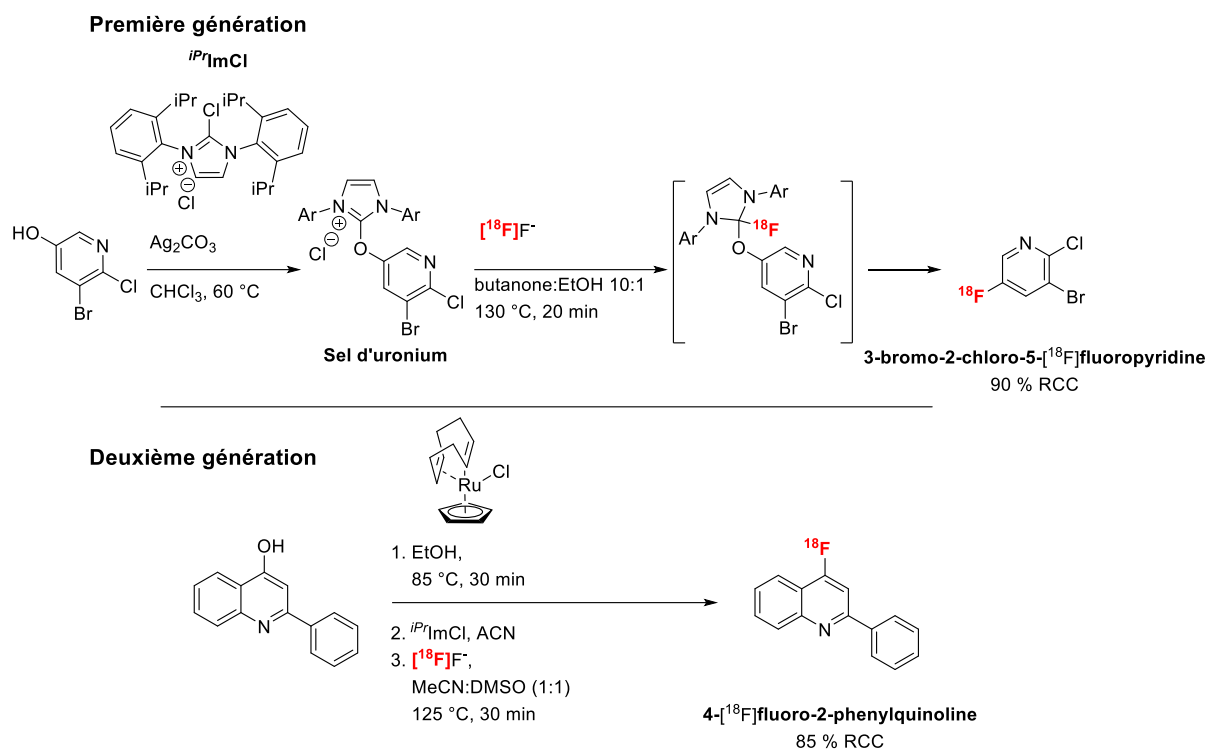


Schéma 15. Radiofluoruration de dérivés phénoliques par la méthode de Ritter.

Cette méthode a été appliquée à des noyaux aromatiques riches en électrons mais les rendements obtenus ont été très faibles. Pour pallier à ce problème, le même groupe a développé un complexe de ruthénium utilisable pour la réaction de déoxyfluoruration.⁵¹ Dans un premier temps, le complexe [CpRu(cod)Cl] est chauffé avec le phénol pendant 30 minutes puis les ions [¹⁸F]fluorures ainsi que le dérivé de chlorure d'imidazolium sont ajoutés (Schéma 15). De très bonnes conversions ont été obtenues par cette méthode, mais elle est difficilement applicable car la synthèse du complexe [CpRu(cod)Cl] nécessite des conditions strictes comme l'utilisation d'une boîte à gant et la manipulation sous atmosphère inerte.

I.6.3.d. Réaction avec des sels d'iodonium

Les sels d'iodonium sont des composés stables à l'air possédant un iode hypervalent substitué par deux noyaux aromatiques. Ce groupement est très labile et peut servir de groupe partant pour des réactions de radiofluoruration avec des noyaux pauvres ou riches en électrons. Lors de la radiofluoruration, le sel d'iodonium présente une géométrie de type bipyramidale trigonale. L'ion fluorure s'échange avec le contre ion du sel d'iodonium et s'insère en position axiale de la bipyramide trigonale. Ensuite, la substitution de l'ion fluorure se fait sur le carbone de l'aryle et est concertée avec l'élimination de l'iodure aryle correspondant.⁵² Le contre ion utilisé lors de la synthèse du sel d'iodonium a une influence sur la réactivité de l'ion fluorure. C'est le contre ion triflate qui présente les meilleures qualités car il est peu nucléophile et soluble dans les solvants organiques.⁵²⁻⁵⁴ On peut citer comme exemple le radiomarquage du

[¹⁸F]flumazenil, un traceur utilisé pour l'imagerie des récepteurs aux benzodiazépines.⁵⁵ Lorsque le [¹⁸F]flumazenil a été marqué par substitution nucléophile aromatique à partir d'un précurseur nitro dans des conditions classiques, il a été obtenu avec un rendement corrigé de la décroissance de 26 % (Schéma 16).⁵⁶ En partant du précurseur iodonium, le rendement de marquage a été plus important (67 % corrigé de la décroissance) et l'activité molaire était également meilleure.⁵⁷ D'autre part, la réaction de marquage a lieu pendant 5 minutes au lieu des 30 minutes nécessaires pour la S_NAr classique.

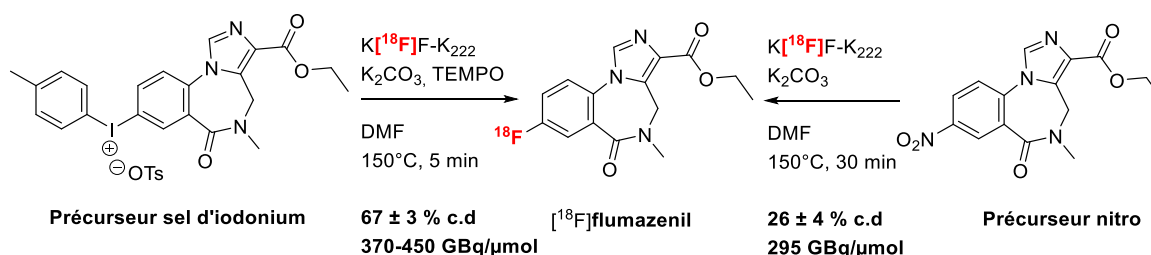


Schéma 16. Radiosynthèses du [¹⁸F]flumazenil par substitution du groupement nitro et par substitution de l'iode hypervalent.

I.6.3.e. Réactions avec des ylures d'iode

Une autre classe de réactifs basés sur l'iode hypervalent a été développée : les ylures d'iode. Comme les sels d'iodoniums, les ylures d'iode aromatiques réagissent avec l'ion fluorure pour former la molécule radiofluorée correspondante. Ces ylures sont préparés à partir de composés dicarbonylés en conditions basiques. Deux formes d'ylures ont été rapportées dans le cadre du marquage au fluor-18, les dérivés d'acide de Meldrum et des dérivés spirocycliques, qui sont tous deux des composés stables. Ces ylures sont utilisés pour la radiofluoration de cycles aromatiques riches ou pauvres en électrons.⁵⁸⁻⁶⁰ Par exemple, le [¹⁸F]FPPMP, un radioligand des transporteurs à la sérotonine et à la norépinephrine, a été obtenu à partir d'un précurseur de marquage de type ylure d'iode porté sur un noyau riche en électrons (Schéma 17).⁵⁸ Pour la radiosynthèse du [¹⁸F]FPEB, un radiotraceur ciblant les récepteurs métabotropiques du glutamate, un précurseur de marquage similaire a été utilisé, porté sur un noyau aromatique appauvri en électrons dans ce cas.⁶¹

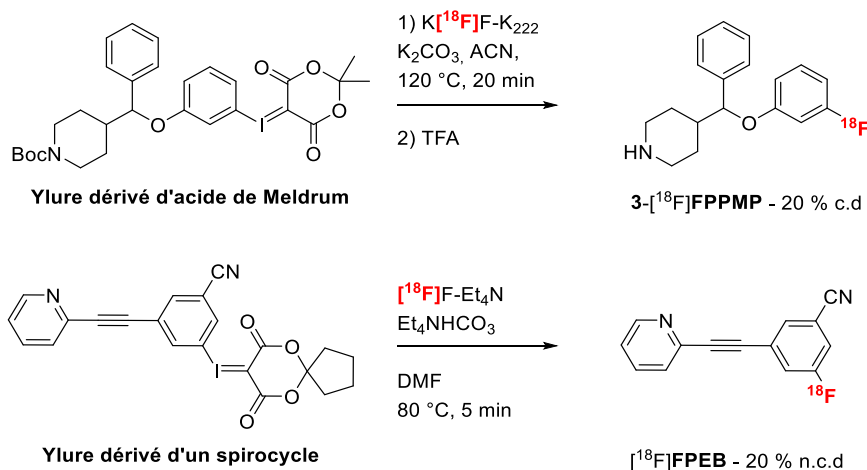


Schéma 17. Préparation des radiotraceurs $[^{18}\text{F}]\text{FPPMP}$ et $[^{18}\text{F}]\text{FPEB}$.

I.6.3.f. Réactions catalysées au cuivre

Le groupe de Gouverneur a mis en place une nouvelle stratégie de marquage de composés aromatiques par catalyse au cuivre à partir de précurseurs dérivés d'acides ou d'esters boroniques en utilisant un couplage de type Chan-Lam.⁶² A ce jour, le mécanisme réactionnel n'est pas encore complètement élucidé mais des hypothèses ont été émises par les groupes de Gouverneur et Sanford (Schéma 18, exemple avec le complexe $\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{Py})_4$).⁶³ La première étape consisterait à un échange de ligands entre l'ion fluorure et le groupement triflate (A). Le complexe $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-}^{18}\text{F}$ alors formé interviendrait ensuite dans une étape de transmétallation (B) avec le précurseur borylé conduisant à un intermédiaire $\text{Ar-Cu}^{\text{II}}\text{-}^{18}\text{F}$. Le complexe obtenu subirait une étape d'oxydation du cuivre (II) en cuivre (III) (C). Les auteurs émettent l'hypothèse d'une oxydation par le dioxygène présent dans l'air. Le complexe de cuivre (III) subirait ensuite une réaction d'élimination réductrice libérant l'aromatique fluoré ainsi que du triflate de cuivre (I) (D). Enfin, le cuivre pourrait subir une étape de réoxydation en cuivre (II) permettant la fermeture du cycle catalytique (E). Pour ce type de couplage, il est important de protéger les amines du composé à radiomarquer car celles-ci peuvent rentrer en compétition lors de l'échange de ligand.^{63,64}

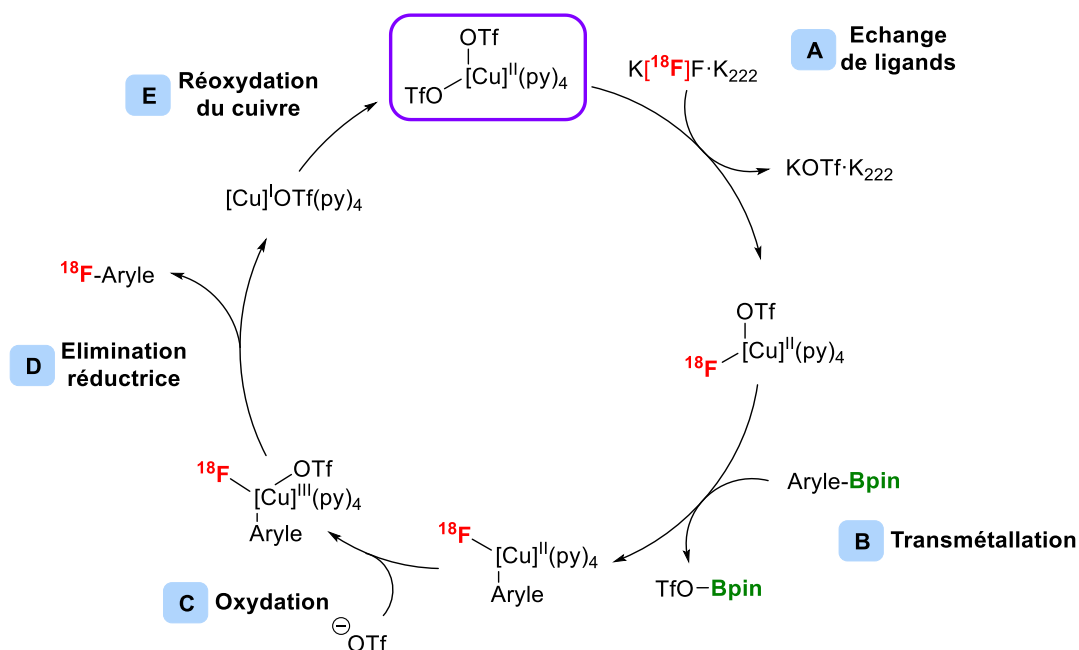
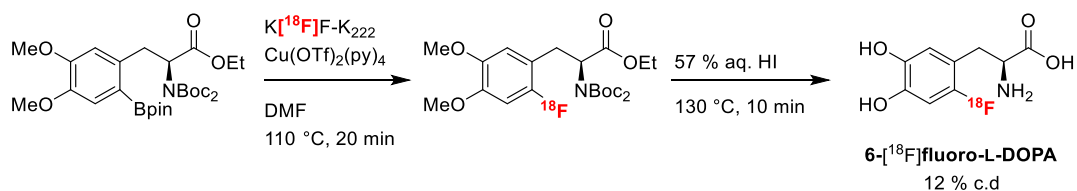
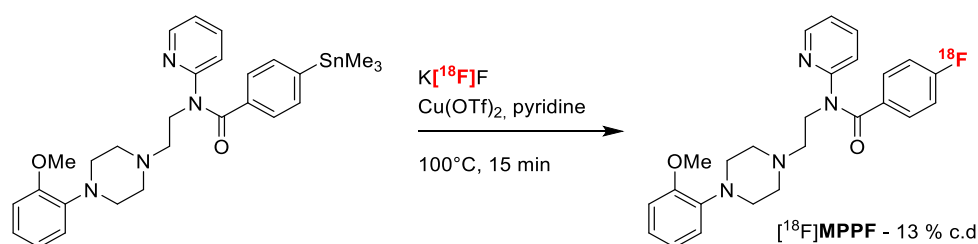


Schéma 18. Mécanisme proposé du couplage de Chan-Lam.

Plusieurs traceurs ont pu être synthétisés par cette méthode de marquage. Le traceur 6- $[\text{}^{18}\text{F}]\text{fluoro-L-DOPA}$, précédemment obtenu par fluoration électrophile,³⁶ a aussi été marqué par radiofluoration catalysée au cuivre avec le complexe $\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{Py})_4$ (Schéma 19).⁶³

Schéma 19. Radiosynthèse de la $[\text{}^{18}\text{F}]\text{FDOPA}$.

De la même façon, des dérivés de trialkylétain peuvent être employés dans des réactions de radiofluoration type couplage de Chan-Lam catalysées au cuivre. On peut citer comme exemple le radiomarquage du $[\text{}^{18}\text{F}]\text{MPPF}$, un antagoniste des récepteurs de la sérotonine (Schéma 20).⁶⁵

Schéma 20. Préparation du composé $[\text{}^{18}\text{F}]\text{MPPF}$ à partir d'un précurseur triméthylétain.

En comparaison avec la méthode de marquage par substitution nucléophile aromatique (Partie I.6.3.b, Schéma 14), cette méthode conduit à un rendement radiochimique similaire (13 % par catalyse au cuivre et 10 % par substitution nucléophile aromatique) mais un temps de réaction plus court qui permet un gain de 30 minutes, ce qui n'est pas négligeable au vu de la demi-vie du fluor-18.

I.6.3.g. Radiofluoration par formation de liaison silicium-fluor-18

Bien qu'efficaces pour des petites molécules organiques, les conditions décrites dans les paragraphes précédents ne permettent généralement pas un marquage direct de biomolécules sensibles. En effet, les hautes températures de marquage, les conditions basiques utilisées ainsi que les solvants organiques peuvent grandement affecter la stabilité des biomolécules. La stratégie généralement employée pour marquer ces composés est une stratégie multi-étapes aussi appelée « prosthétique ». Elle consiste à radiomarquer une petite molécule organique qui sera ensuite couplée à la biomolécule par acylation des amines de certains acides aminés ou selon des réactions de chimie « click » par exemple. Cependant, de nouvelles stratégies de marquage dites directes, c'est-à-dire en une seule étape, ont vu le jour pour permettre le marquage de biomolécules en conditions plus douces.

L'une de ces stratégies est basée sur la formation d'une liaison silicium-fluor. Cette liaison a une énergie plus importante que la liaison C-F, cependant elle est très sensible à l'hydrolyse en milieux aqueux au vu de sa forte polarisation. L'hydrolyse de cette liaison Si-F *in vivo* contribue au relargage d'ions fluorures dans le corps et à l'accumulation dans les os, ce qui engendre une diminution de la qualité du signal TEP. Il a été démontré que cette hydrolyse est ralentie par l'encombrement de l'atome de silicium.⁶⁶ Des motifs appelés SiFA (Silicon Fluoride Acceptor) ont ainsi été développés pour le radiomarquage par échange isotopique entre un atome de fluor-19 et un atome de fluor-18. Le SiTATE est un dérivé d'octréotide, un octapeptide utilisé comme médicament qui imite la somatostatine. Il a été marqué par cette méthode à température ambiante (Schéma 21). La stabilité du traceur dans le sérum humain a été validée et sa biodistribution a démontré une accumulation dans les tumeurs.⁶⁷

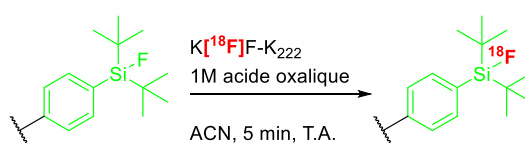
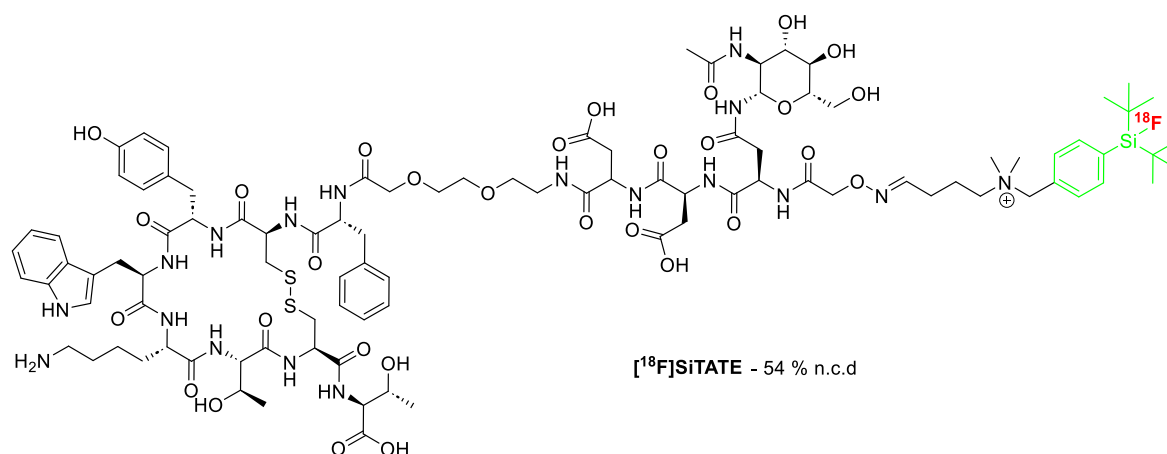
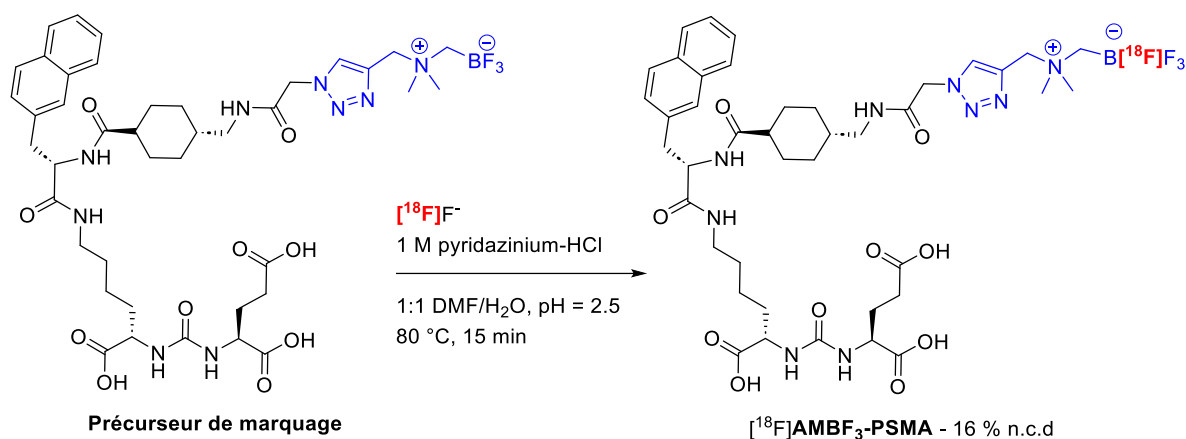


Schéma 21. Structure du traceur $[^{18}\text{F}]\text{SiTATE}$ et réaction de marquage du motif SiFA.

I.6.3.h. Radiomarquage par formation de liaison bore-fluor-18

Tout comme le marquage par formation d'une liaison silicium-fluor, les dérivés organoborés sont également utilisés pour le marquage par échange isotopique de biomolécules en conditions douces. L'atome de bore est un très bon acide de Lewis car il est capable de recevoir un doublet d'électrons au niveau de sa lacune électronique. Le groupe de Perrin a publié en 2005 le premier marquage d'une biomolécule à partir d'un précurseur de type ester boronique.⁶⁸ Cependant, ce radiomarquage présente quelques inconvénients puisque l'ajout de fluor-19 est nécessaire pour favoriser la radiofluoruration et que la liaison bore-fluor est sujette à l'hydrolyse en milieu aqueux.^{69,70} Pour contourner ces problèmes, le groupe de Perrin a mis au point des groupements prosthétiques zwitterioniques de type alkylammoniométhyltrifluoroborate (AMBF_3).⁷¹ Dans ce cas, le marquage a lieu par échange isotopique $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ dont l'ajout d'une source de fluor-19 dans le milieu réactionnel n'est pas nécessaire. De plus, la présence du motif ammonium augmente la stabilité *in vivo* de la liaison bore-fluor.

Par exemple, un radiotracer ligand du PSMA (Prostate-Specific Membrane Antigen), un antigène surexprimé au niveau de la prostate lors de cancers prostatiques, a été radiomarké par cette stratégie.⁷² Le précurseur est un dérivé du PSMA-617 couplé par chimie click à un motif AMBF_3 . Le radiotracer a été obtenu par échange isotopique $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ dans un mélange $\text{DMF}/\text{H}_2\text{O}$ à 80 °C pendant 15 min (Schéma 22).



*Schéma 22. Exemple de traceur ciblant la PSMA marqué par échange isotopique $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$.*⁷²

I.6.4. Radiomarquage par complexation avec l'aluminium-fluor-18

Jusqu'à présent les méthodes de marquages au fluor-18 présentées concernaient la liaison covalente de l'atome de fluor-18 au composé d'intérêt. Une nouvelle méthode de marquage basée sur la chimie de complexation a émergé ces dernières années.⁷³ Les avantages de la complexation sont nombreux : temps de synthèse plus courts, conditions de réaction plus douces et purifications sur cartouches plus simples. Selon la théorie HSAB (Hard and Soft Acids and Bases) de Pearson, l'ion fluorure est une base de Lewis forte et a donc tendance à réagir plus vite avec un acide de Lewis fort, comme le cation Al^{3+} .^{74,75} Le premier essai de marquage par complexation d' $\{\text{Al}[^{18}\text{F}]\text{F}\}^{2+}$ a été rapporté en 2009 par McBride.⁷⁶ Cependant, le chélate utilisé, l'acide diéthylène triamine penta acétique (DTPA), ne s'est pas montré adapté pour la complexation d' $\{\text{Al}[^{18}\text{F}]\text{F}\}^{2+}$. Les chélates cycliques NOTA et NODA, ainsi que leurs dérivés, se sont montrés les plus aptes à complexer $\{\text{Al}[^{18}\text{F}]\text{F}\}^{2+}$ (Figure 4).^{73,77} Plus récemment, le (\pm)-H₃RESCA, un chélate non-cyclique permettant la complexation stable avec $\{\text{Al}[^{18}\text{F}]\text{F}\}^{2+}$ à basse température, a été rapporté.⁷⁸

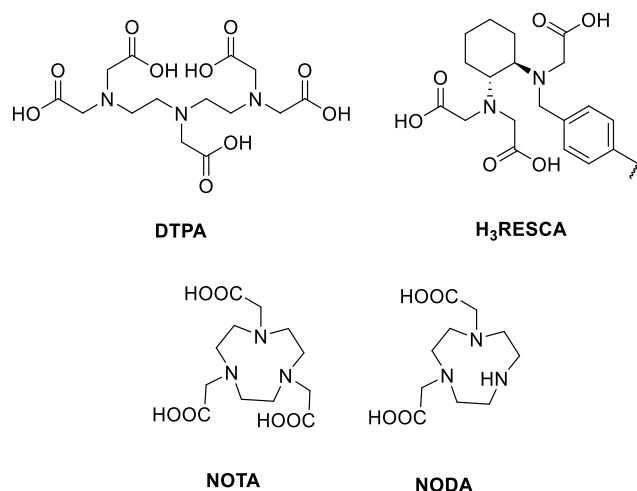


Figure 4. Structure des chélates DTPA, NOTA, NODA et H₃RESCA.

La complexation avec $\{Al[^{18}F]F\}^{2+}$ a par exemple été utilisée pour radiomarquer l'octréotide, une molécule peptidique ciblant les récepteurs à la somatostatine (Schéma 23).^{79,80} Le chélate, un NOTA dans ce cas, a été préalablement introduit sur l'octréotide par formation d'une fonction amide en position *N*-terminale, suivi du marquage qui a lieu en conditions organo-aqueuses à 100°C.

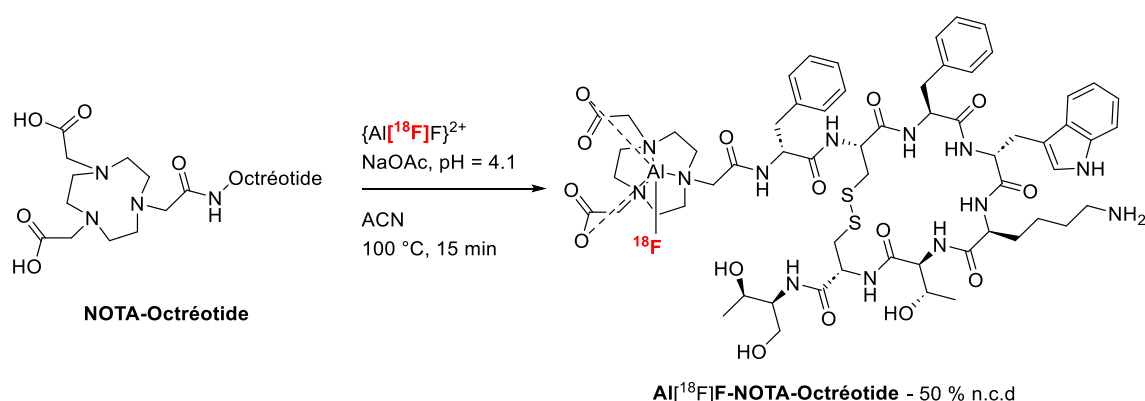


Schéma 23. Radiomarquage du traceur Al¹⁸F-NOTA-octréotide par complexation.

A l'heure actuelle, le radiomarquage avec $\{Al[^{18}F]F\}^{2+}$ est peu automatisé car les rendements obtenus sont plus faibles par rapport à une radiosynthèse manuelle. De ce fait, la transposition vers la clinique est ralentie car les doses demandées exposerait grandement les manipulateurs aux risques d'irradiations.

II. La neuroinflammation

Les maladies neurodégénératives (MND) sont des maladies chroniques progressives touchant le système nerveux central (SNC) et touchant plus d'un million de personnes en France.⁸¹ Ces maladies sont de plus en plus fréquentes avec l'âge et les symptômes invalidants associés impactent la qualité de vie des patients. Parmi ces maladies, on retrouve notamment la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou encore la sclérose en plaques. A l'heure actuelle, avec la hausse de la longévité de la population et le manque de traitements curatifs, ces maladies sont un problème de santé publique majeur. Pour pallier au manque de traitements, il est essentiel de comprendre ces maladies et les mécanismes biologiques associés afin de pouvoir effectuer un diagnostic précoce pour permettre une meilleure prise en charge. De plus, une meilleure compréhension des phénomènes biologiques conduisant à ces maladies pourrait permettre le développement de traitements pour les soigner.

II.1. Phénomène biologique

Le système nerveux central a longtemps été considéré comme protégé de tout type d'inflammation grâce à la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cependant, au cours de ses dernières années, la découverte d'un phénomène biologique commun aux maladies neurodégénératives a remis en question ce dogme.^{82,83} Ce phénomène, appelé neuroinflammation (NI), correspond à une réponse complexe induite suite à une réaction inflammatoire du système nerveux central. Elle est générée par les cellules gliales et engendre une cascade de réactions multiples. La neuroinflammation provoque ainsi un dérèglement des défenses cérébrales.⁸⁴

Dans un premier temps, la neuroinflammation est un mécanisme d'immunité cérébrale, elle est donc neuroprotectrice (Figure 5). Des protéines de signalisation détectent un changement anormal au sein du compartiment cérébral et activent les cellules immunitaires du SNC comme les **microglies**. Ces protéines de signalisation appartiennent à la famille des cytokines et il en existe plusieurs sous-groupes, ce sont par exemple les interleukines 4 et 10 (IL-4 et IL-10) qui interviennent dans l'activation des cellules immunitaires. Via l'action de médiateurs neuronaux, les microglies activent à leur tour les **astrocytes**. Ces deux types de cellules vont sécréter à leur tour de nouvelles cytokines et notamment les interleukines 4 et 10 qui ont des propriétés anti-inflammatoires. Cependant, dans les maladies neurodégénératives, la neuroinflammation devient chronique et engendre une suractivation du système immunitaire du SNC. De ce fait, les **microglies** et les **astrocytes** sont toujours activés et sécrètent alors de nouvelles cytokines aux propriétés pro-inflammatoires comme par exemple l'interleukine 1 β (IL-1 β) et le facteur de nécrose tumorale (TNF).⁸⁵

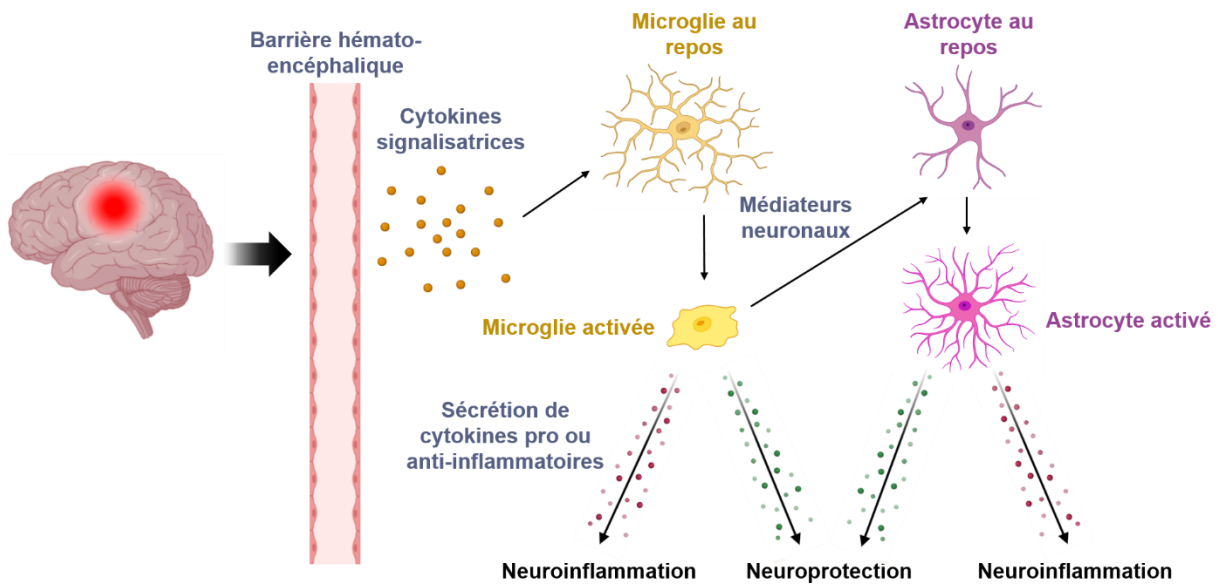


Figure 5. Mécanisme des réactions immunitaires suite à une inflammation cérébrale.

Les microglies sont les principales cellules immunitaires du cerveau et sont essentiellement responsables de l'homéostasie et de la protection des neurones face à des agressions extérieures. Lors de leur activation, elles changent de morphologie : au repos, la microglie a un phénotype de type ramifié puis, à l'état activé, la microglie perd ses ramifications et devient une forme amiboïde.⁸⁶ De leur côté, les astrocytes ont un rôle d'apport de métabolites aux neurones, d'aide à la formation de synapses et du maintien de leur plasticité, de maintien de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et aussi de détection de signaux de dangers.⁸⁷ Les astrocytes subissent également un changement de phénotype lors de leur activation, ils deviennent hypertrophiques, c'est-à-dire que leur volume augmente, et ils se multiplient.^{86,87} Lorsque l'inflammation est prolongée ou chronique, elle engendre la suractivation de la microglie et des astrocytes. Cette suractivation est neurotoxique et contribue à la dégénérescence neuronale associée aux maladies neurodégénératives.

Cette dualité du rôle des cellules immunitaires rend difficile la compréhension de la neuroinflammation. Comprendre ces phénomènes complexes liés à la neuroinflammation et l'état d'activation des cellules microgliales et astrocytaires est donc nécessaire pour décrypter le mécanisme de la neuroinflammation.

II.2. Diagnostic et suivi de la maladie

Pour visualiser et diagnostiquer la neuroinflammation, différentes techniques d'imagerie moléculaire sont utilisées : l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la tomographie par émission de positons (TEP), la tomographie par émission monophotonique (TEMP) et les méthodes d'imagerie optique. Ces techniques permettent de visualiser, de manière non

invasive, différents biomarqueurs cellulaires de la NI avec des sondes spécifiques.⁸⁸ L'utilisation de l'imagerie TEP pour des applications en neurologie est largement répandue et nécessite par conséquent le développement de traceurs adaptés. En effet, le design d'un radiotracer visant des cibles dans le cerveau doit répondre à certains critères répertoriés par Pike en 2009.⁸⁹ Le radiotracer doit posséder une **haute affinité** (de l'ordre du nM) et une haute **sélectivité** pour sa cible, présenter une **pharmacocinétique d'accumulation suffisante** pour observer un signal et une **pharmacocinétique d'élimination** du traceur en fonction du radioisotope utilisé, être radiomarquable au carbone-11 ou au fluor-18 avec une **activité spécifique élevée** et ne **pas présenter de toxicité** à faibles doses. Il faut ajouter à cette liste trois autres critères importants : le radiotracer doit posséder une bonne capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique, ne pas être substrat de transporteurs d'efflux qui empêcheraient l'accumulation du traceur et présenter une faible métabolisation. Concernant ce dernier point, il est important que la formation de radiométabolites n'ayant pas d'affinité pour la cible soit la plus faible possible. En 2020, Jain *et al.* ont décrit une liste de biomarqueurs d'intérêt pour le diagnostic de la NI par imagerie TEP (Figure 6).⁹⁰

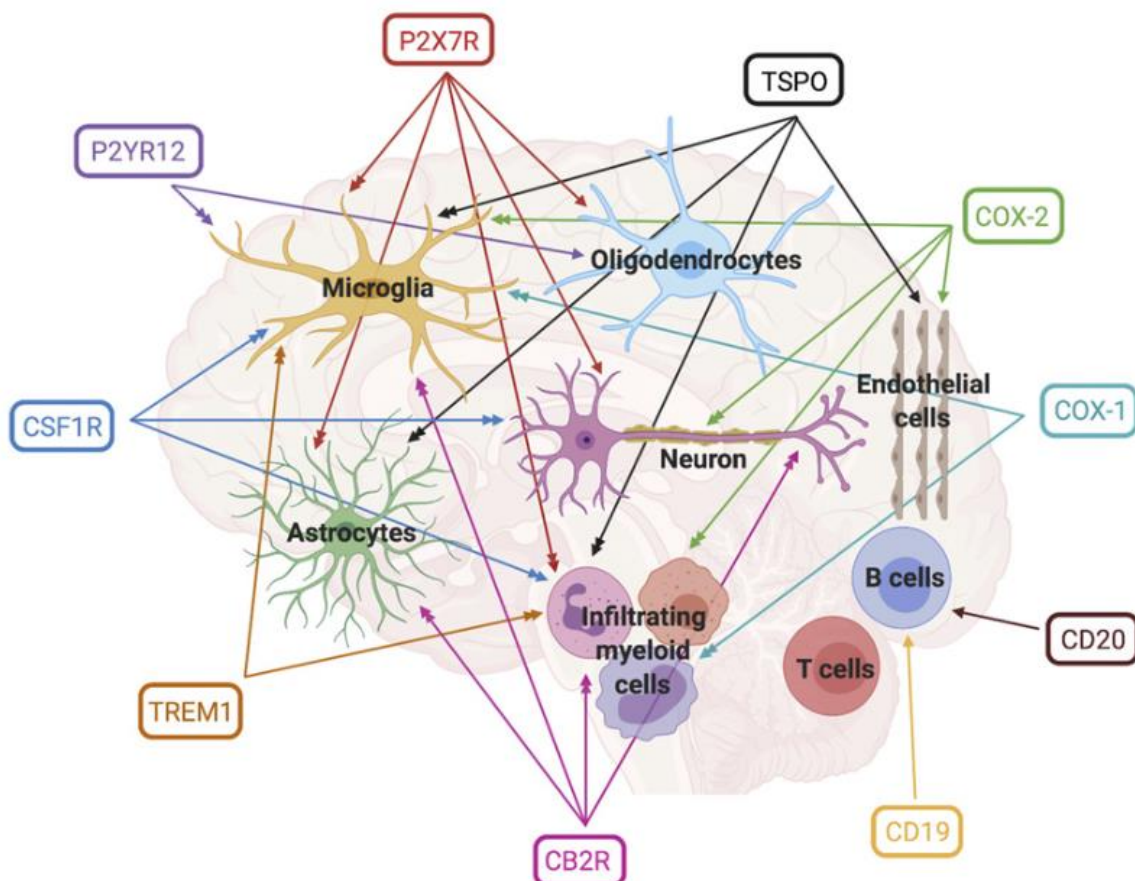


Figure 6. Biomarqueurs d'intérêt pour la neuroinflammation et cibles correspondantes.⁹⁰

Certains de ces biomarqueurs sont exprimés par plusieurs types de cellules tandis que d'autres sont plus spécifiques. Les parties suivantes vont présenter de manière synthétique les principaux radiotraceurs associés aux biomarqueurs présents sur les deux cibles principales du système nerveux central : les microglies et les astrocytes.

II.2.1. Cibles exprimées par les microglies

La suractivation de la microglie lors de la neuroinflammation s'accompagne de l'action/suractivation de certaines protéines et récepteurs, qui sont donc des bons biomarqueurs de la neuroinflammation.

Protéine translocatrice TSPO

L'activation de la microglie lors de la neuroinflammation s'accompagne notamment de l'activation de la protéine translocatrice à 18 kDa (TSPO), anciennement appelée récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR) (Figure 7). Cette protéine est localisée dans la membrane mitochondriale externe des cellules gliales.⁹¹



Figure 7. Structure cristalline de la protéine TSPO avec son ligand PK11195.⁹¹

La TSPO a différents rôles mais le plus connu est celui du transport du cholestérol, du cytosol vers la membrane interne de la mitochondrie. A l'état sain, la concentration en TSPO est faible dans le système nerveux central. Quand la microglie est suractivée par la neuroinflammation, l'expression de la TSPO augmente de manière considérable,⁹¹ c'est pourquoi la TSPO est devenue une cible de choix pour le développement de nouveaux radiotraceurs. Le premier traceur historique ciblant la TSPO est un traceur marqué au carbone-11, le [¹¹C]PK11195 (Figure 8). Il appartient à la famille des isoquinoléines carboxamides et est marqué au niveau de l'amide méthylé. Radiomarqué dès 1984 par Camsonne *et al.*,⁹² ce traceur a été longuement

étudié mais a cependant démontré des limites non négligeables, notamment une fixation non spécifique sur les protéines plasmatiques conduisant à une faible sensibilité et donc à des images de mauvaise résolution.⁹³

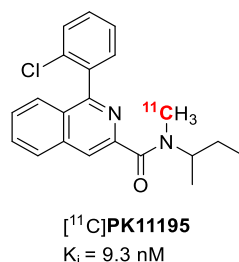


Figure 8. Structure du traceur [¹¹C]PK11195.⁹⁴

Une deuxième génération de ligands ciblant la TSPO a ensuite émergé. Une étude de criblage menée par des équipes en Italie en 2001 a conduit à une nouvelle classe de composés, des molécules appartenant à la famille des pyrazolo[1,2-*a*]pyrimidines.⁹⁵ Le [¹¹C]DPA-713 et le [¹⁸F]DPA-714, marqués respectivement au carbone-11 et au fluor-18 (Figure 9), font partie de cette famille.^{40,41,96} Ces traceurs présentent des caractéristiques *in vivo* intéressantes comme une bonne accumulation cérébrale et une meilleure affinité pour la TSPO que le traceur [¹¹C]PK11195.⁹⁰ Les deux traceurs [¹¹C]DPA-713 et [¹⁸F]DPA-714 ont été injectés à un modèle animal présentant de la neuroinflammation dans un seul hémisphère du cerveau (côté ipsilatéral). Le [¹⁸F]DPA-714 a montré une accumulation cérébrale plus importante (0.01 %ID/mL) que son analogue marqué au carbone-11 (0.006 %ID/mL) ainsi qu'une meilleure accumulation du côté ipsilatéral par rapport au côté contralatéral (hémisphère contrôle qui ne présente pas de neuroinflammation) et donc une meilleure biodistribution cérébrale. Cela conduit à un contraste *in vivo* plus important dans le cas du [¹⁸F]DPA-714, comparé au [¹¹C]DPA-713.⁹⁷ Un autre avantage du [¹⁸F]DPA-714 est la demi-vie plus longue du fluor-18 comparée à celle du carbone-11. Toutes ces considérations ont conduit à privilégier le [¹⁸F]DPA-714 comme radiotracer de la TSPO.

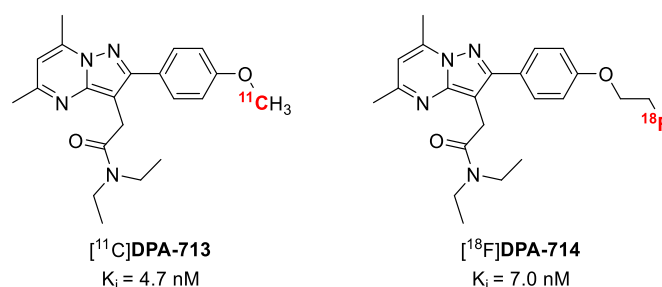


Figure 9. Structures des traceurs de 2^{ème} génération issus de la famille des pyrazolo[1,2-*a*]pyrimidines.

Cependant, il y a d'autres inconvénients liés à la cible TSPO. En effet, l'expression de la TSPO n'est pas spécifique à un type cellulaire. On la retrouve ainsi exprimée au sein des microglies, des cellules endothéliales ou encore des astrocytes. De plus, le gène de la TSPO présente un polymorphisme qui entraîne une différence d'affinité pour un même traceur chez différents patients.⁹⁰ Avant de pratiquer l'examen d'imagerie, il est donc nécessaire de réaliser un examen génétique pour déterminer la nature de la mutation du gène de la TSPO chez le patient. En fonction de cette mutation, les patients ont été classifiés en trois catégories et cette classification est nécessaire pour l'interprétation des images TEP obtenues.

Pour surmonter ce problème de polymorphisme du gène de la TSPO, une nouvelle génération de traceurs a été développée. L'un de ces traceurs, le [¹¹C]ER176 (Figure 10),⁹⁸ est un analogue du composé PK11195 possédant un noyau quinazoline. L'évaluation biologique *in vitro* a démontré que ce radioligand présentait des constantes d'inhibitions similaires pour les patients exprimant la TSPO avec une forte ou une faible affinité (K_i moyen de 1.3 nM). Tout comme les traceurs DPA, le traceur [¹¹C]ER176 ne permet pas de distinguer le polymorphisme du gène de la TSPO. Les images TEP de ce composé ont montré une plus faible accumulation du traceur dans le cerveau chez la population exprimant la TSPO à faible intensité ($SUV_{max} = 2,0$). Cependant, le traceur [¹¹C]ER176 permet tout de même d'obtenir des images avec un contraste acceptable chez cette population à faible expression.^{90,99}

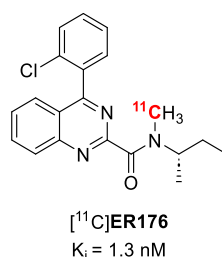


Figure 10. Structure du traceur [¹¹C]ER176.

Malgré le développement de cette troisième génération de radiotraceurs, il existe toujours des inconvénients dus à son expression non spécifique à la microglie, puisque la TSPO est aussi retrouvée au niveau des cellules endothéliales ou des astrocytes. De plus, le besoin d'un radiotracer spécifique au phénotype pro-inflammatoire requiert de trouver une cible plus spécifique de la microglie. Des efforts de développement de nouveaux radiotraceurs pour de nouvelles cibles ont donc été entrepris.¹⁰⁰

Récepteurs purinergiques P2X₇R

Les récepteurs P2X₇ appartiennent à la famille des récepteurs purinergiques P2X qui sont des canaux ioniques membranaires ATP-dépendants. Ces récepteurs sont activés par liaison avec l'ATP extracellulaire et permettent l'influx de cations vers l'intérieur de la cellule et l'efflux

des cations potassium ainsi que l'entrée et la sortie de petites molécules.¹⁰¹ Ces récepteurs sont exprimés principalement par les cellules immunitaires du SNC (microglie, macrophage)¹⁰² et on les retrouve plus faiblement exprimés au niveau des cellules gliales comme les astrocytes et les oligodendrocytes. Il est aussi à noter que ces récepteurs sont exprimés par des cellules tumorales.⁹⁰ Les récepteurs ont un rôle dans l'activation des cellules immunitaires par le biais de la communication, la prolifération ainsi que l'apoptose des cellules.¹⁰³ Lors d'une inflammation, ces récepteurs sont activés et leur expression est augmentée. Cette surexpression déclenche un signal d'action des cellules immunitaires.^{102,104} Plusieurs radioligands marqués au carbone-11 ou au fluor-18 ont été développés et testés pour cette cible. Par exemple, les composés [¹¹C]GSK1482160 et [¹⁸F]GSK1482160 (Figure 11) se sont révélés intéressants lors des études précliniques mais n'ont pas encore été testés en clinique à ce jour.^{105,106}

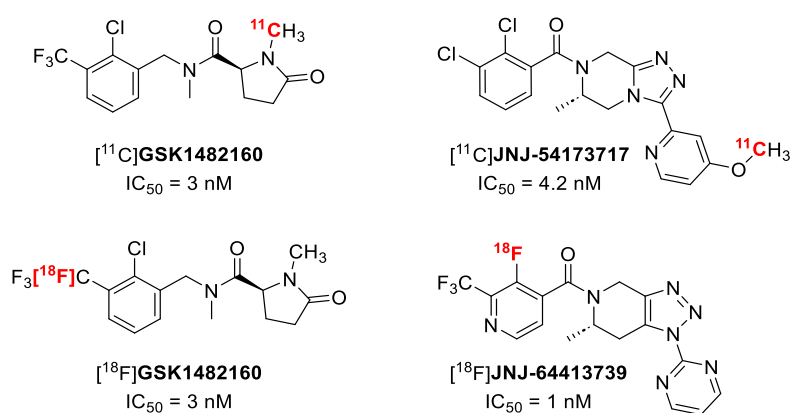


Figure 11. Structures des radiotraceurs ciblant les récepteurs P2X₇.

Le traceur [¹¹C]JNJ-54173717 a été évalué au stade clinique et a été testé chez des patients atteints de la maladie de Parkinson.¹⁰⁷ La biodistribution du traceur a montré une accumulation cérébrale modérée et une clairance hépato-biliaire classique. Cependant les résultats d'imagerie n'ont pas démontré de différences entre les patients atteints de la maladie d'Alzheimer et les volontaires sains. Son analogue fluoré [¹⁸F]JNJ-64413739 a également été testé chez des patients sains chez lesquels une faible expression des récepteurs P2X₇ est attendue. Ce radiotraceur a également présenté une accumulation cérébrale modérée et une clairance par voie hépato-biliaire. Des études de déplacement avec le composé JNJ-54173717 non-radioactif ont été effectuées et ont démontré une bonne affinité du traceur fluoré pour sa cible.¹⁰⁸ Cependant, comme dans le cas de la TSPO, le gène des récepteurs P2X₇ présente un polymorphisme qui affecte l'affinité de ces différents traceurs pour leur cible. De plus, son expression par différentes cellules neuronales entraîne une faible spécificité des traceurs, ce qui n'est pas idéal. Le rôle des récepteurs P2X₇ dans l'inflammation reste à établir et est toujours étudié.⁹⁰

Cyclooxygénase

Les cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) sont des enzymes qui permettent la transformation de l'acide arachidonique en dérivés de prostanoides, les prostaglandines, qui ont un rôle de médiateurs de l'inflammation. Ces cibles ont été largement étudiées pour la synthèse de médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) comme l'aspirine. Pendant des années, on a pensé que seule l'enzyme COX-2 jouait un rôle dans l'inflammation. Cependant une étude récente a mis en évidence que l'enzyme COX-1 est surexprimée chez l'animal présentant une neuroinflammation.¹⁰⁹

Une première série de radiotraceurs présentant une analogie structurale avec les médicaments anti-inflammatoires a été développée. Par exemple, le [¹¹C]ketoprofen-méthyl ester, ou [¹¹C]KTP-Me (Figure 12), est un dérivé du kétoprofène radiomarké au carbone-11.¹¹⁰ Spécifique de la COX-1, il a été testé chez l'homme et présente de bons résultats au niveau de l'accumulation cérébrale et de sa biodistribution. Cependant, il n'a pas été observé de différences entre les patients sains et ceux présentant une neuroinflammation.¹¹¹ Son analogue fluoré [¹⁸F]FKTP-Me n'en est encore qu'au stade de développement préclinique mais présente une bonne affinité pour la COX-1 et une bonne accumulation cérébrale ($SUV_{max} = 3,5$). La distribution du traceur après injection chez un modèle animal de neuroinflammation a démontré que celui-ci s'accumulait bien au niveau du côté ipsilatéral (côté présentant une surexpression de COX-1 induite par injection de lipopolysaccharide (LPS)). Cependant, ce traceur est rapidement métabolisé en l'acide carboxylique correspondant, [¹⁸F]FKTP, qui reste une forme active du traceur.¹¹²

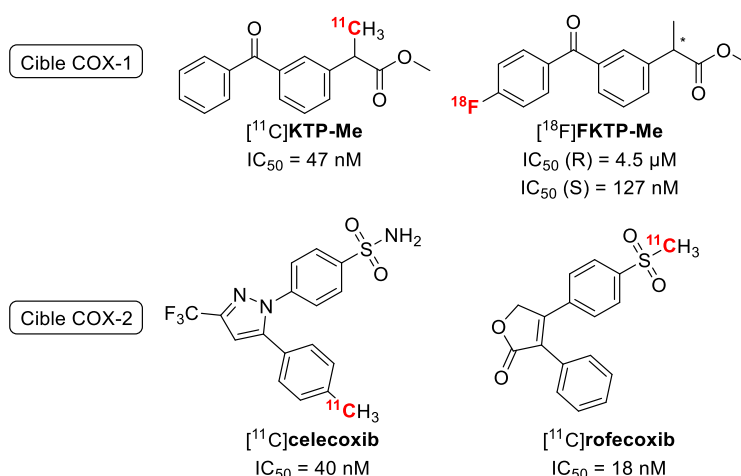


Figure 12. Structures de radiotraceurs ciblant les enzymes cyclooxygénases.

Des traceurs ciblant la COX-2 ont aussi été étudiés (Figure 12). Un inhibiteur de la COX-2, le celecoxib a été radiomarké au carbone-11 sur la fonction méthyle du cycle aromatique. Les études précliniques chez le singe ont révélé une bonne pénétration dans le cerveau et une bonne

biodistribution du traceur. Un autre exemple d'inhibiteur de la COX-2 radiomarqué lui aussi au carbone-11 est le [^{11}C]rofecoxib. Cependant, en plus de présenter une accumulation cérébrale modérée, les images obtenues après injection à un modèle animal inflammatoire et à l'animal sain n'ont pas démontré de différences significatives.^{113,114}

Les récepteurs cannabinoïdes de type 2

Les récepteurs cannabinoïdes de type 2 (CB2R) sont retrouvés sur les cellules immunitaires du système nerveux périphérique (CNP) et, à des niveaux d'expression plus faibles, sur les cellules immunitaires du CNS. Lors de l'inflammation, leur expression dans le CNS est intensifiée au niveau des microglies, des astrocytes et des neurones.⁹⁰ Ces récepteurs ont longtemps été étudiés et plusieurs traceurs ont été développés. Parmi les plus récents, le traceur [^{11}C]NE-40 (Figure 13) a présenté des résultats encourageants pour la détection de la neuroinflammation lors de l'évaluation préclinique.^{115,116} Cependant lors de l'évaluation clinique avec des volontaires sains ou atteints de la maladie d'Alzheimer, les images obtenues n'ont pas démontré de différence d'augmentation de l'expression des CB2R chez les patients malades. Un autre traceur, le [^{11}C]A-836339, présentant une meilleure affinité que le composé [^{11}C]NE-40, a été développé. Il a été radiomarqué au niveau du méthyle de la fonction éther d'une structure thiazoylidène. Cependant, les évaluations précliniques sur des animaux présentant de la neuroinflammation ont montré une faible accumulation dans le cerveau et les images TEP n'ont pas permis de mettre en évidence cette neuroinflammation.¹¹⁷

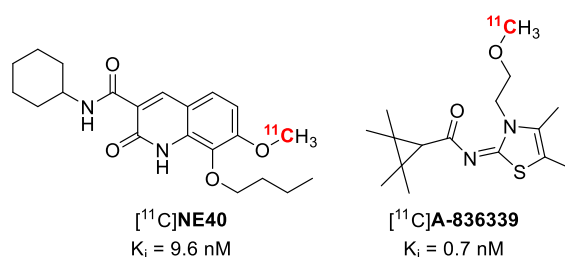


Figure 13. Structures des radioligands ciblant les CB2R.

Récepteurs purinergiques P2Y₁₂R

Les récepteurs qui m'ont particulièrement intéressée pendant ma thèse sont les récepteurs P2Y₁₂, des récepteurs purinergiques appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Figure 14-A).¹¹⁸ Les récepteurs P2Y₁₂ sont retrouvés à la surface des cellules microgliales. L'expression de ces récepteurs est dépendante de l'état d'activation de la microglie et donc de sa morphologie. A l'état de repos, la microglie possède un phénotype ramifié et les récepteurs P2Y₁₂ sont exprimés sur ses ramifications. L'activation de la microglie dans un processus pro-inflammatoire comme la neuroinflammation entraîne un changement de morphologie, les cellules microgliales prennent une forme amiboïde, c'est-à-dire sans

ramifications. (Figure 14-B). Lors du phénomène de neuroinflammation, l'expression de ces récepteurs est donc diminuée. La modulation de l'expression des récepteurs P2Y₁₂ selon l'état d'activation de la microglie est donc un indicateur de choix pour l'étude de la microglie dans le cadre de la neuroinflammation.¹¹⁹

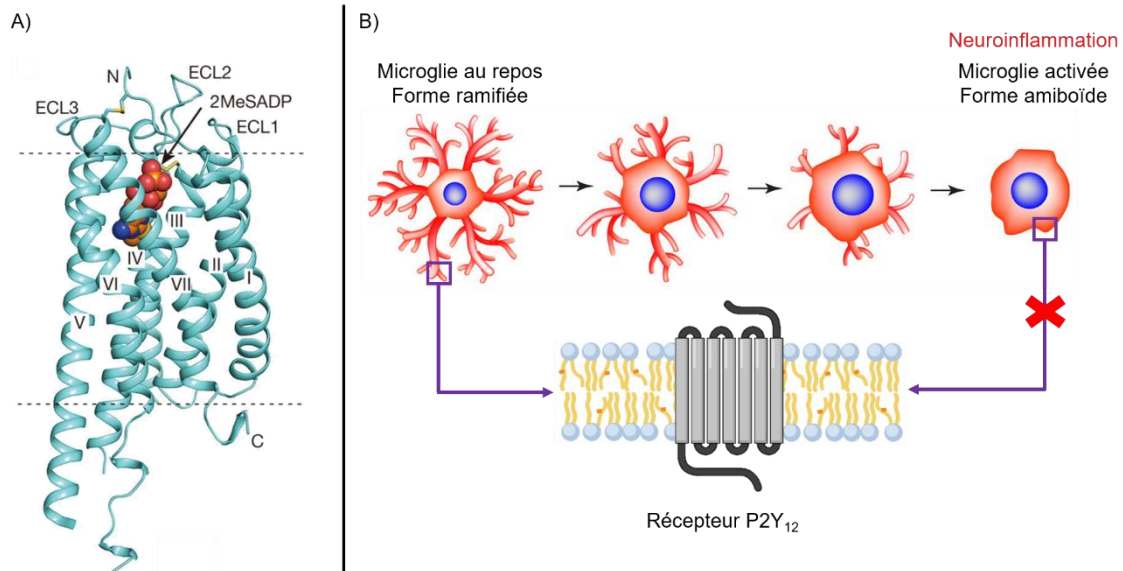


Figure 14. (A) Structure du récepteur P2Y₁₂ humain avec son ligand 2-méthyl-thio-ADP (2-Me-S-ADP)¹¹⁸ (B) Modulation de la morphologie de la microglie suite à son activation et de l'expression des récepteurs P2Y₁₂.

Ces récepteurs P2Y₁₂ ont été considérablement étudiés du fait de leur expression sur les plaquettes sanguines.^{120,121} En effet, l'une des conséquences de l'activation de ces récepteurs est l'agrégation plaquettaire (Figure 15). L'adénosine diphosphate (ADP) présente dans les cellules se fixe sur le récepteur P2Y₁₂, ce qui entraîne une cascade de réactions : la protéine G_{oi} est activée et empêche la transformation de l'adénosine triphosphate (ATP) cellulaire en adénosine monophosphate cyclique (cAMP) en inhibant l'adénylyl cyclase (AC). La diminution du niveau intracellulaire de la cAMP entraîne ensuite l'activation de l'agrégation plaquettaire. En même temps, les protéines G_β et G_γ engendrent l'activation des phosphoinositides 3-kinase (PI3K) puis l'augmentation de la concentration en protéine kinase B (Akt) qui entraîne aussi l'agrégation plaquettaire.

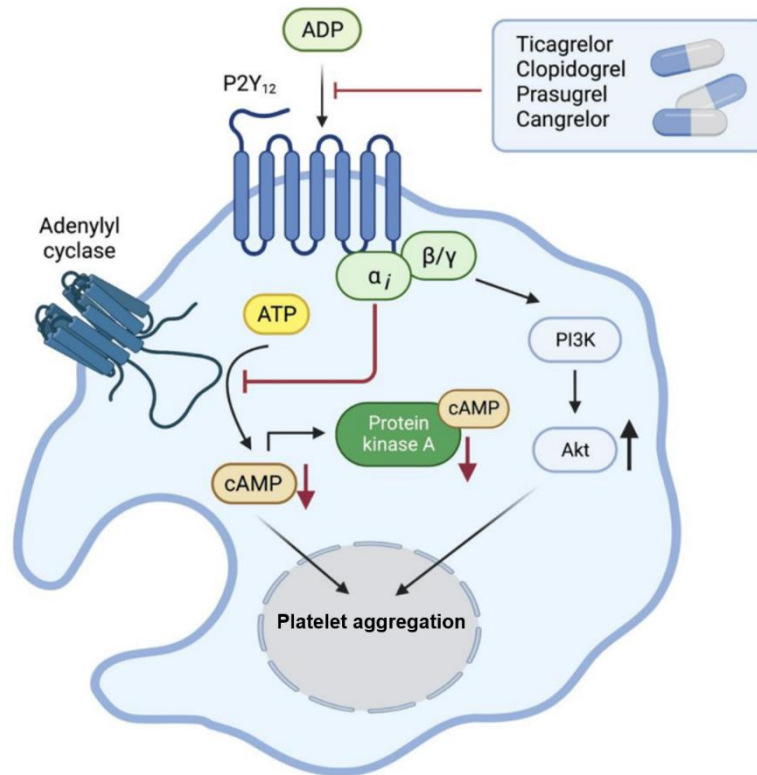


Figure 15. Cascade signalétique résultant de l'activation des récepteurs P2Y₁₂ par l'ADP.¹²¹

Pour lutter contre ce phénomène, des études ont été menées pour développer des médicaments antagonistes à ces récepteurs. Deux classes d'antagonistes des récepteurs P2Y₁₂ ont été approuvés par la Food and Drug Administration (FDA)¹²² : des dérivés thiénoxyridines, qui sont des antagonistes irréversibles, et des analogues de l'ATP, qui sont réversibles. Par exemple, le clopidogrel et le prasugrel sont des prodrogues dérivées de thiénoxyridines (Figure 16), ce sont les métabolites de ces composés qui se lient aux récepteurs P2Y₁₂.¹²³ Dans la série des composés analogues de l'ATP, on peut par exemple citer le ticagrelor. Ce médicament antiplaquettaire est commercialisé depuis 2012 et présente des propriétés pharmacologiques similaires au clopidogrel et au prasugrel, il se lie de manière réversible aux récepteurs P2Y₁₂.^{124,125}

En 2013, le laboratoire AstraZeneca a développé une série de composés dérivés de nicotinate d'éthyle. Ces composés ont été évalués *in vitro* et *in vivo* et les données pharmacocinétiques obtenues ont conduit à la sélection du composé AZD1283 pour des essais cliniques.¹²⁶ Les tests *in vitro* ont démontré que ce composé présentait une concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) de 11 nM et une dose efficace médiane (ED₅₀) de 3 µg/(kg x min).

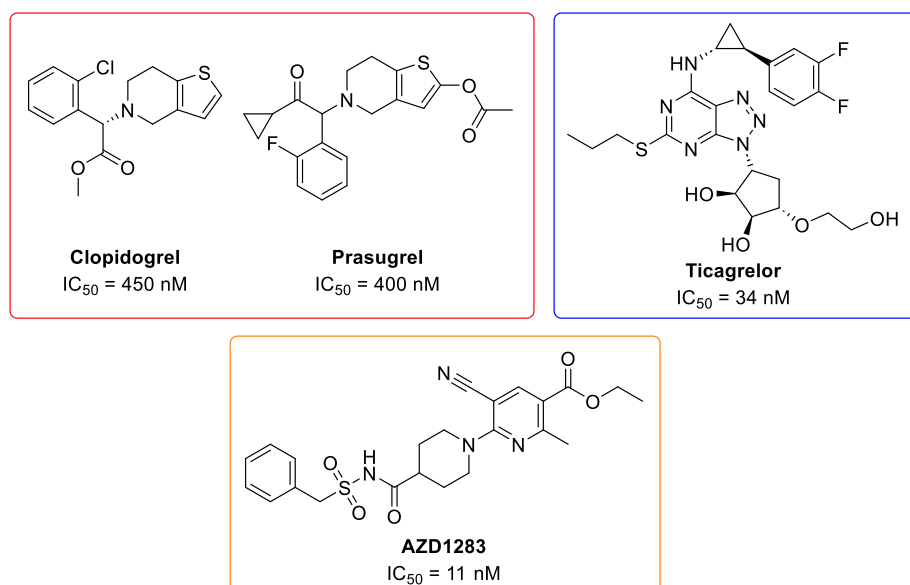


Figure 16. Structures chimiques de composés ciblant P2Y₁₂R.^{125–127}

Le développement et l'étude de radiotraceurs originaux visant cette cible ont été rapportés ces dernières années. Villa *et al.* sont les premiers à avoir publié un radiotraceur ciblant les récepteurs P2Y₁₂ en 2018.¹²⁸ A partir d'une étude menée par Bach *et al.*¹²⁹ sur le design de nouveaux composés pour le traitement de l'agrégation plaquettaire, Villa *et al.* ont choisi le composé **1** (Figure 17) ayant une IC_{50} de 6 nM. Cette molécule est un analogue d'AZD1283 basée sur une structure de type ester éthylique d'acide 6-aminonicotinique comportant une fonction sulfonyle urée. Le radiotraceur correspondant a été préparé par une réaction de carbonylation au [¹¹C]CO catalysée au rhodium entre un précurseur aminé et un précurseur sulfonyle azoture, conduisant au composé [¹¹C]**1** radiomarqué au niveau de l'urée. Cependant, la biodistribution de ce composé a finalement montré une faible perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui est probablement liée à la forte métabolisation de l'ester méthylique du noyau pyridine de [¹¹C]**1** en acide carboxylique.

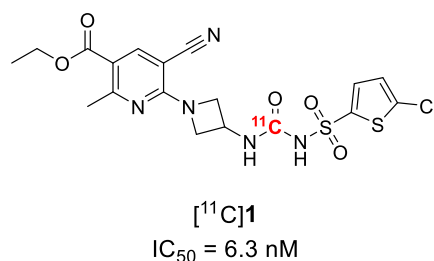


Figure 17. Structure du traceur [¹¹C]**1** développé par Villa *et al.*

Depuis, le groupe de Windhorst a développé deux autres traceurs (Figure 18).¹³⁰ Ils ont sélectionné des inhibiteurs issus de brevets pour le développement de nouveaux médicaments antiplaquettaires. Ces composés sont basés sur une plate-forme thiénopyrimidine et possèdent

une haute affinité avec les récepteurs P2Y₁₂. Le composé [¹¹C]**2** a été radiomarqué au carbone-11 via une réaction d' amino-carbonylation avec [¹¹C]CO catalysée au palladium. Le radioligand [¹⁸F]**3** a été marqué au fluor 18 par réaction d'éthérisation avec le [¹⁸F]fluoroéthanol de la chloropyrimidine correspondante. L'évaluation *in vivo* de ces radiotraceurs a démontré que leur concentration dans le cerveau était trop faible pour une utilisation dans le cadre de l'étude de la neuroinflammation. Pour augmenter leur concentration dans le cerveau, des études ont été effectuées avec un inhibiteur de transporteurs transmembranaires, ces derniers étant des protéines qui ont pour rôle de transporter des composés à travers les parois cellulaires.¹³¹ Ces protéines, comme par exemple la glycoprotéine-P (P-gp), sont retrouvées au niveau des cellules de l'intestin et des reins mais aussi au niveau de l'endothélium de la BHE et permettent de réguler la présence de médicaments, de métabolites et de composés endogènes au niveau du cerveau. Dans les études menées avec l'inhibiteur (tariquidar),¹³² les rats ont été prétraités avec ce dernier avant l'injection des radiotraceurs. Pour le composé [¹¹C]**2**, la pénétration cérébrale est restée trop faible (SUV_{max} = 0,25), par contre elle s'est montrée plus importante et plus significative dans le cas du composé [¹⁸F]**3** (5 minutes après injection, SUV_{max} = 0,02 contre SUV_{max} = 1,0 en présence de tariquidar). Ces expériences ont établi que ces deux radiotraceurs étaient substrats de la P-gp, ce qui limite donc leur utilisation en imagerie.

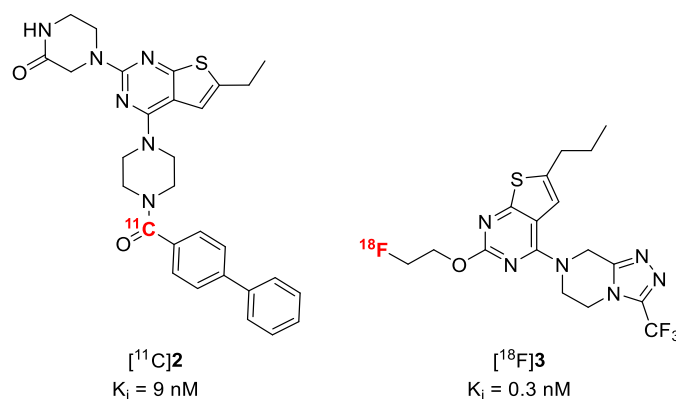


Figure 18. Structures des radiotraceurs développés par le groupe de Windhorst.¹³⁰

En 2021 et 2022, deux études ont rapporté le marquage et l'évaluation du composé [¹¹C]AZD1283, marqué de manière isotopique sur la fonction cyano du noyau pyridine (Figure 19).^{133,134} Le radiomarquage a été effectué *via* cyanation, soit catalysée au cuivre, soit pallado-catalysée, d'un précurseur bromé avec H[¹¹C]CN. Des autoradiographies de coupes de cerveaux de rats sains ont démontré l'affinité du traceur pour les récepteurs P2Y₁₂. Le métabolisme a aussi été évalué et a montré que le traceur était très peu métabolisé. Cependant, l'étude *in vivo* chez le macaque sain a démontré une faible pénétration cérébrale du composé (SUV_{max} = 0,37). A défaut de pouvoir être utilisé comme traceur, le composé AZD1283 froid peut être utilisé comme inhibiteur de référence pour l'étude de nouveaux radiotraceurs ciblant les récepteurs P2Y₁₂.

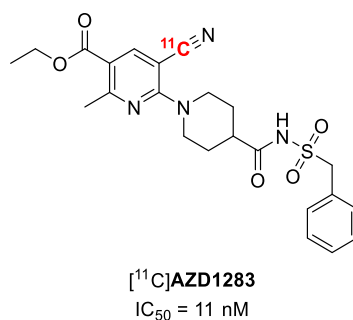


Figure 19. Structure de [¹¹C]AZD1283.

II.2.2. Cibles astrocytaires

De la même façon que les microglies, les astrocytes sont suractivés lors de la neuroinflammation et subissent un changement de morphologie. Ses changements provoquent la surexpression de plusieurs protéines. Ces protéines sont donc des cibles potentielles pour l'étude des fonctions des astrocytes lors de la NI et des radiotraceurs les ciblant ont donc été développés.

Monoamine oxydase-B

La monoamine oxydase-B (MAO-B) est une enzyme appartenant à la famille des monoamines oxydases et qui catalyse la déamination de composés aminés endogènes ou de xénobiotiques, notamment la dopamine. Ces enzymes sont retrouvées au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. Lors de la neuroinflammation, les MAO-B sont surexprimées au sein des astrocytes,¹³⁵ ce qui en fait une cible intéressante pour le développement de nouveaux radiotraceurs.

Le L-deprenyl est un médicament prescrit pour le traitement de la maladie de Parkinson et qui agit comme inhibiteur de la MAO-B. Il est dit inhibiteur suicide car il se lie de manière irréversible à l'enzyme. Ce composé a été radiomarqué au carbone-11 sur le méthyle de l'amine (Figure 20). L'évaluation biologique de ce traceur a démontré que celui-ci se liait à sa cible de manière spécifique. Cependant sa liaison irréversible entraîne des complications de quantification de ces enzymes.¹³⁶ L'échange de deux atomes d'hydrogène par deux atomes de deutérium pour conduire au traceur L-[¹¹C]deprenyl-D₂ a permis de ralentir la cinétique de liaison du traceur à la MAO-B.^{137,138} Cependant, ce traceur est métabolisé en deux radiométabolites, le [¹¹C]CO₂ et la [¹¹C]méthamphétamine-D₂, qui sont retrouvés dans le cerveau, ce qui engendre également des difficultés dans la quantification. Son dérivé fluoré [¹⁸F]fluorodeprenyl-D₂ n'est pas encore étudié en clinique mais des études préliminaires chez le singe ont démontré que le traceur est capable de cibler les MAO-B.¹³⁹ La présence de radiométabolites n'a pas été problématique dans ce cas. Plus récemment, le [¹¹C]SL251188, un radioligand présentant à la fois une bonne sélectivité pour la cible et une liaison réversible avec

celle-ci, a été développé. Il a démontré une bonne pénétration cérébrale ainsi qu'un métabolisme lent et est actuellement en phase clinique.¹⁴⁰ En parallèle, son analogue fluoré, le [¹⁸F]FSL251188, a été développé et testé *in vivo*. Cependant, son accumulation modérée dans le cerveau et l'importante défluoration du composé observée *in vivo* n'en font pas un bon candidat.¹⁴¹

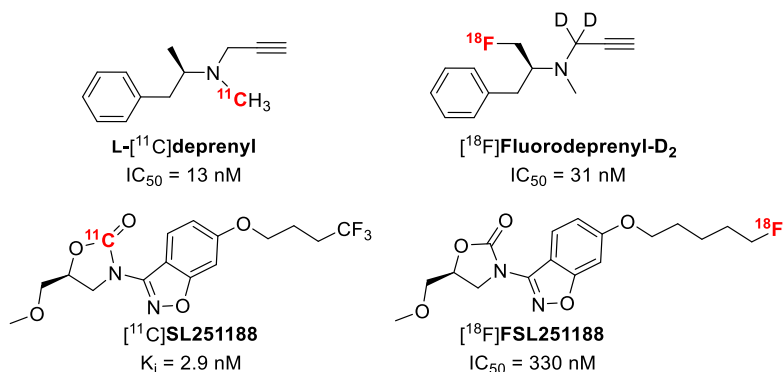


Figure 20. Structures des radioligands ciblant les MAO-B.

Site de liaison des imidazolines de type 2 (I2BS)

Des sites de liaisons à l'imidazoline non adrénergique ont été découverts sur les astrocytes et il a été montré que le nombre de ces sites est augmenté lors de la neuroinflammation.¹⁰⁰ Ces sites de liaison sont retrouvés au niveau de la membrane externe de la mitochondrie et sont co-exprimés avec les MAO-B. Il existe deux types de sites de liaison (type 1 et 2) dont les fonctions ne sont pas encore connues à ce jour. Un premier radiotracer a été développé pour tenter de comprendre le fonctionnement de ces sites de liaisons, le [¹¹C]BU99008 (Figure 21). Il présente une affinité *in vitro* de l'ordre du nanomolaire et est sélectif pour les I2BS. Des études chez le cochon et chez le singe ont démontré une pénétration cérébrale correcte ainsi qu'un déplacement de la radioactivité lors de l'injection d'un inhibiteur des MAO-B. Il est à ce jour le seul traceur validé pour l'imagerie des I2BS chez l'homme.^{142,143} Un autre traceur prometteur est le [¹¹C]FTIMD. Son évaluation préclinique a démontré qu'il possédait une bonne affinité pour les I2BS et une biodistribution cohérente avec les zones riches en I2BS dans le cerveau ($SUV_{\max} = 4,5$).¹⁴⁴

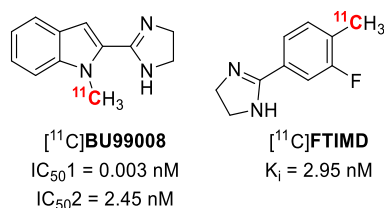


Figure 21. Radioligands ciblant les I2BS.

Cependant, l'utilisation du [¹¹C]BU99008 est restreinte à cause de la demi-vie du carbone-11. Le développement de nouveaux radioligands pour l'imagerie des astrocytes est donc nécessaire afin d'améliorer la compréhension du phénomène de neuroinflammation.

Adénosine kinase

L'adénosine (ADO) est un ribonucléoside composé d'une base purine, l'adénine et d'un sucre, le ribose, qui sont liés via une liaison β-N₉-osidique (Figure 22). Cette petite molécule est retrouvée de manière endogène et ubiquitaire dans le corps et participe aux différentes fonctions physiologiques telles que l'activité neuronale, l'activité vasculaire ou encore la régulation du flux sanguin dans le corps. L'adénosine et ses récepteurs sont par exemple retrouvés au niveau des plaquettes. Lorsque ces récepteurs sont activés, cela entraîne la vasodilatation des vaisseaux sanguins et donc un accroissement du flux sanguin.¹⁴⁵

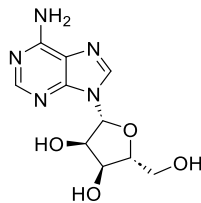


Figure 22. Structure de l'adénosine.

Sa concentration cellulaire est étroitement régulée par différentes voies de signalisations (Figure 23).^{146,147} La production d'adénosine est due à deux réactions biologiques différentes. Une première voie de production de l'adénosine, intra- et extracellulaire, provient de la déphosphorylation successive de l'ATP par la nucléotidase CD39 puis par la ecto et endonucléotidase-5' (CD73). Une deuxième voie de production de l'adénosine, intracellulaire, passe par l'hydrolyse de la S-adénosylhomocystéine (SAH) par l'enzyme adénosylhomocystéinase. D'autre part, l'hydrolyse de l'adénosine monophosphate (AMP) est la voie majoritaire de la production de l'adénosine intracellulaire. La concentration intracellulaire en adénosine est supérieure à la concentration extracellulaire. Dans le milieu extracellulaire, l'adénosine a une concentration de l'ordre de 20 à 300 nM, cependant elle peut augmenter jusqu'à quelques micromolaires suite à un stress ou un traumatisme.¹⁴⁷ Cette augmentation d'adénosine extracellulaire a un effet protecteur, notamment dans le cadre d'une hypoxie ou d'une ischémie.¹⁴⁸ En effet, la forte concentration extracellulaire en adénosine permet l'activation de ses différents récepteurs et le déclenchement des réponses immunitaires, et notamment l'activation du récepteur A_{2A} qui régule l'accumulation de cytokines pro-inflammatoires.¹⁴⁹ De ce fait, la concentration en adénosine est hautement régulée. A l'état physiologique, l'adénosine extracellulaire nouvellement formée peut être transformée en inosine par le biais de l'adénosine déaminase (ADA). Elle peut également être capturée par des transporteurs nucléosidiques

(ENT) pour être amenée à l'intérieur de la cellule. Cette adénosine est ensuite métabolisée soit en AMP par l'adénosine kinase (ADK), soit en inosine par l'action de l'ADA.

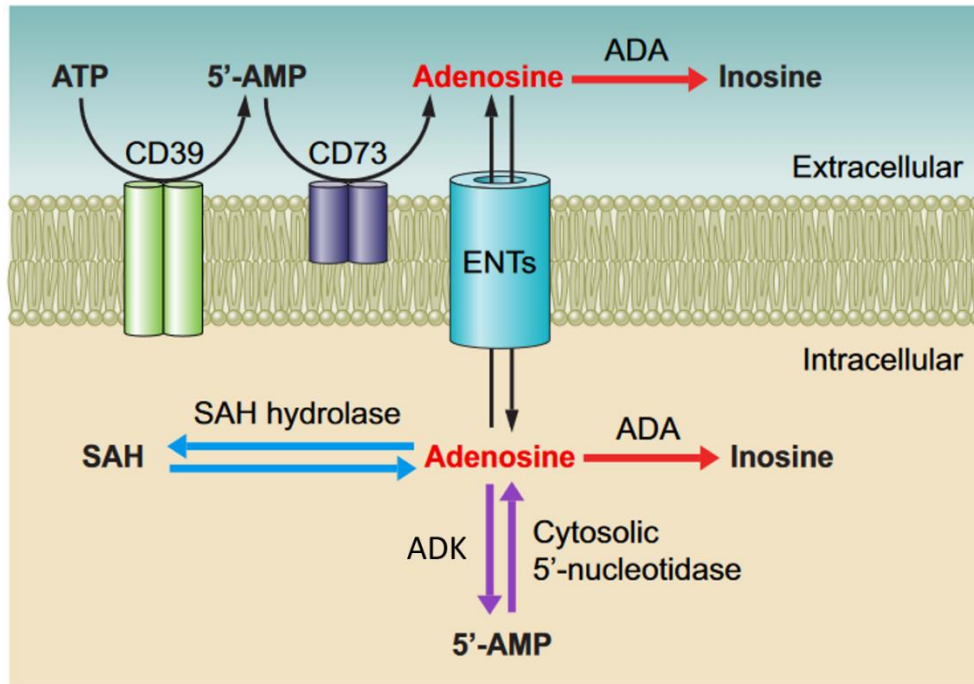


Figure 23. Production et métabolisme de l'adénosine intra- et extracellulaire (issu de Borea et al).¹⁴⁷

En milieu cellulaire, la concentration de l'adénosine est principalement régulée par l'adénosine kinase qui permet l'insertion d'un groupement triphosphate sur l'adénosine pour la transformer en AMP.¹⁵⁰ L'inhibition de l'ADK engendre l'augmentation d'adénosine intracellulaire et permet donc un effet protecteur face au stimulus reçu.¹⁵¹ C'est une enzyme indispensable pour la modulation de la concentration de l'adénosine en cas de stress ou d'inflammation, ce qui en fait donc une cible de choix pour le développement de nouveaux outils de diagnostic et de médicaments.¹⁵² A l'âge adulte, cette enzyme est principalement exprimée dans le cerveau.¹⁵³ De ce fait, des études sur cette enzyme et la modulation de son inhibition amènent à se demander si celle-ci peut jouer un rôle dans la neuroinflammation. En effet, des études ont démontré que l'activation de l'ADK était corrélée à l'activation des astrocytes lors d'un phénomène inflammatoire.^{154,155} Lors de la neuroinflammation, cette enzyme est suractivée et ne permet plus d'avoir une concentration cellulaire en adénosine suffisante pour obtenir un effet cytoprotecteur, ce qui peut conduire à l'apoptose de l'astrocyte. Par conséquent, l'adénosine kinase est une cible de choix pour la compréhension de la neuroinflammation. A ce jour, il n'y a que très peu d'études publiées sur le développement de radiotraceurs ciblant ADK. L'idée est donc de développer un radiotraceur en se basant sur les composés de la littérature présentant une bonne affinité pour ADK. Deux classes de ligands ciblant l'ADK ont été décrites dans la littérature : des ligands nucléosidiques et non nucléosidiques.

a) Ligands nucléosidiques

Durant les années 1990 et 2000 il y a eu un essor d'études sur le développement d'agents thérapeutiques pouvant inhiber cette enzyme.¹⁵⁶ Une première classe d'inhibiteurs a été développée en se basant sur un motif ribonucléosidique (Figure 24). Dans la littérature, le composé 5-iodotubercidine a servi de modèle pour le développement de plusieurs analogues avec des modifications au niveau du motif ribose sur sa position 5 ou sur le motif purine.^{157,158} Certaines modifications, comme le remplacement d'un hydroxyle par une amine sur le motif ribose, ont permis d'obtenir une meilleure IC₅₀. Cependant, la faible solubilité de ces analogues, leur faible capacité à traverser la BHE ainsi que leur toxicité observée lors des différentes évaluations biologiques ont forcé l'arrêt des recherches portant sur ces nouveaux inhibiteurs nucléosidiques.^{159,160}

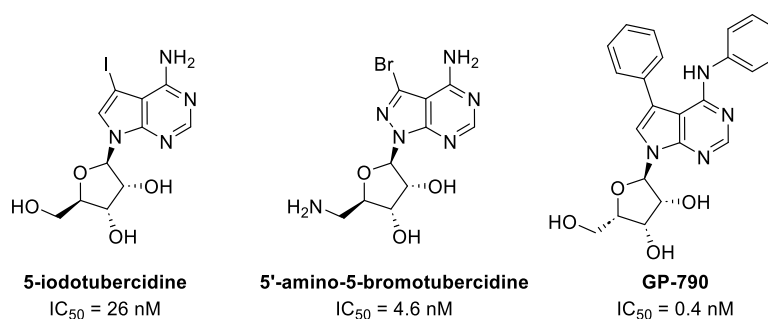


Figure 24. Structures des ligands nucléosidiques de l'ADK.

b) Ligands non nucléosidiques

Une nouvelle classe d'inhibiteurs de l'ADK a été découverte par criblage virtuel. Ces molécules, non nucléosidiques, possèdent un noyau pyrido-pyrimidine ou alkynylpyrimidine (Figure 25)^{161,162} et de meilleures constantes d'inhibition, de l'ordre du nanomolaire. Développée dans les années 2000, la molécule ABT-702, issue d'une série de composés basés sur un noyau pyrido-pyrimidine, a été largement étudiée. Les données précliniques ont démontré une toxicité, notamment l'apparition de lésions vasculaires à haute concentration.¹⁶³ Le manque d'outils de prédiction et de données cliniques a eu un rôle dans l'arrêt du développement de ces composés pour leur utilisation comme médicament. Dans le cadre du développement d'un radiotracteur, la concentration du composé injecté marqué étant très faible, les risques de toxicité le sont aussi.

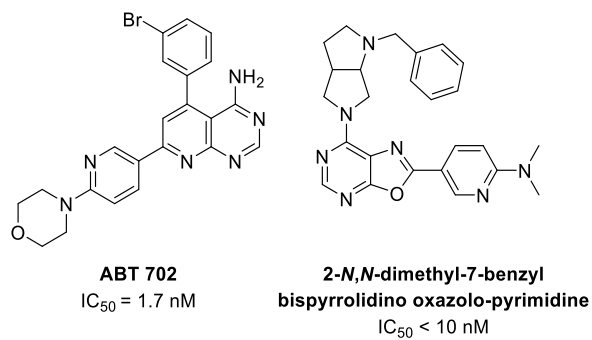


Figure 25. Structures de ligands non nucléosidiques de l'ADK.

III. Projet de thèse

La neuroinflammation est un phénomène complexe et jouant un rôle important dans les maladies dégénératives. A ce jour, le [¹⁸F]DPA-714 ciblant la TSPO est le traceur de référence de la neuroinflammation mais présente des limites liées à sa cible. Plusieurs études ont permis le développement de nouveaux radioligands visant d'autres cibles mais leur évaluation biologique n'a pas rempli tous les critères permettant d'en faire les nouveaux radiotraceurs de référence. De ce fait, il est nécessaire de développer de nouveaux radiopharmaceutiques ciblant des biomarqueurs d'intérêt en NI. De par leur activation lors de la neuroinflammation, les microglies et les astrocytes sont des cellules neuronales particulièrement intéressantes pour étudier ce phénomène. Cette activation se traduit dans les deux cas par un changement de morphologie engendrant une cascade signalétique et un changement d'expression de récepteurs ou de protéines spécifiques. C'est notamment le cas des récepteurs P2Y₁₂ que l'on retrouve sur les microglies et de l'enzyme adénosine kinase présente dans les astrocytes. Ces deux cibles sont spécifiques de leur biomarqueur dans le CNS et le développement de radiotraceurs spécifiques permettrait donc d'obtenir des clés pour comprendre le phénomène de neuroinflammation. Les travaux de cette thèse ont pour but de développer des sondes moléculaires utilisables en imagerie TEP ciblant spécifiquement les récepteurs P2Y₁₂ et l'adénosine kinase.

Ce projet de thèse est divisé en 4 parties :

Dans un premier temps, ce travail de thèse a consisté à réaliser la synthèse de références méthylées et fluorées basées sur des motifs moléculaires issus de la littérature et présentant une bonne affinité pour les cibles sélectionnées (Figure 26). Pour cibler les récepteurs P2Y₁₂, une pharmacomodulation d'un ligand issu d'un criblage d'une banque de molécules a été examinée et une série de composés analogues a été préparée. Pour cibler l'adénosine kinase, différentes positions de radiomarquage ont été étudiées à partir de la molécule ABT-702, sachant qu'un marquage isotopique n'est pas réalisable sur cette molécule.

Dans un deuxième temps, les nouveaux ligands ont été évalués *in vitro* pour déterminer leur affinité et leur métabolisme. J'ai réalisé des tests d'affinité en collaboration avec des chercheurs de la faculté de pharmacie de l'université de Bonn en Allemagne lors d'un séjour scientifique dans le laboratoire du Pr Christa Müller. Les molécules ciblant les récepteurs P2Y₁₂ ont été évaluées selon deux méthodes, directe et indirecte. La méthode directe met en compétition le composé à tester avec un ligand tritié dont l'affinité est connue tandis que la méthode indirecte mesure la luminescence produite par l'activation d'une protéine par le composé à tester. Pour déterminer l'affinité des ligands ciblant ADK, c'est la capacité de cette enzyme à synthétiser l'adénosine en présence des composés nouvellement développés qui a été évaluée. Le

métabolisme *in vitro* a été également étudié avec des microsomes murins et humains. L'ensemble de ces résultats a ensuite permis de sélectionner les ligands les plus intéressants.

Dans un troisième temps, les précurseurs de radiomarquage des ligands les plus prometteurs ont été préparés pour être radiomarqués au carbone-11 ou au fluor-18. En effet, lors du développement d'un radiotracer, il est nécessaire de synthétiser deux composés. Le premier est la référence dite froide, qui est un composé avec la même structure chimique que le radiotracer mais présentant l'atome stable à la place de l'isotope radioactif. Il permet les études d'affinité et de métabolisme, la mise au point des conditions de purification sur automate ainsi que le développement des conditions d'HPLC analytique qui permettent de s'assurer de l'identité du radiotracer lors du contrôle qualité. Le deuxième composé est le précurseur de marquage qui est un composé possédant une structure chimique similaire au radiotracer mais présentant une fonction chimique réactive qui permet le radiomarquage à un endroit précis. Les procédés de radiomarquage des différents radiotraceurs ont également été optimisés et automatisés.

Enfin, les radioligands obtenus ont été évalués *in vitro* par autoradiographie sur des coupes de cerveaux issus de modèles animaux. Ils ont également été évalués *in vivo* afin d'analyser leur biodistribution dans les organes ainsi que leur capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique. Enfin, ils ont été étudiés par imagerie TEP après injection à des animaux sains ou à des modèles animaux de neuroinflammation. Pour les ligands ciblant P2Y₁₂, les études *in vitro* ou *in vivo* ont été menées sur des modèles animaux présentant une surexpression des récepteurs d'intérêt (collaboration avec les Dr Van Camp & Dr Bemelmans, MIRCEN) ou présentant une pathologie neurologique comme par exemple la sclérose en plaques (collaboration avec le Dr. Chauveau, CERMEP). Pour les ligands ciblant ADK, des études *in vivo* ont aussi été menées sur un modèle animal inflammatoire.

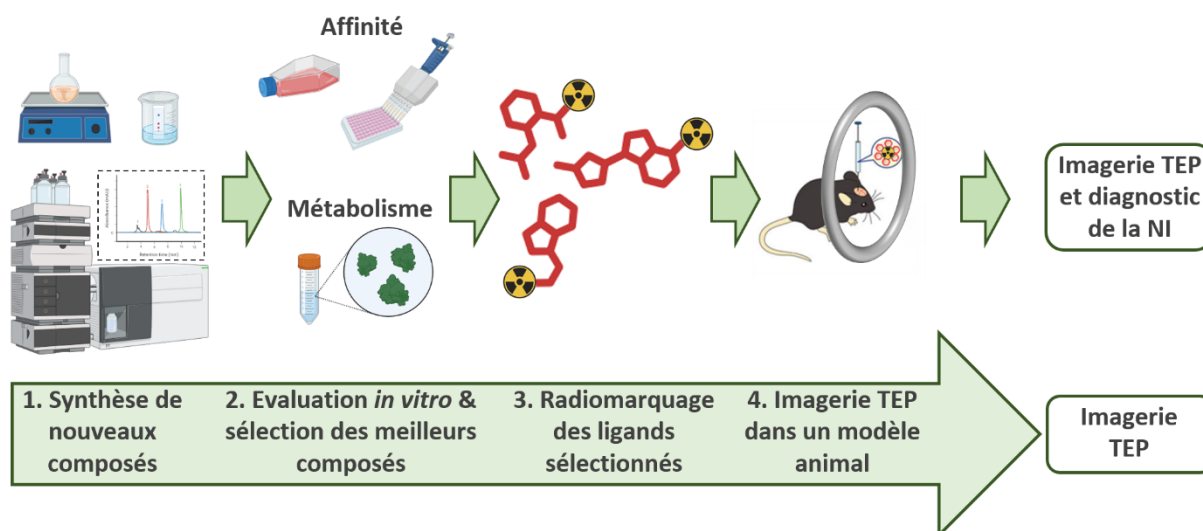


Figure 26. Déroulement général du projet de thèse.

Développement de radiotraceurs ciblant les récepteurs P2Y₁₂

I. Conception d'un nouveau radiotraceur

En 2014, des travaux de chimie médicinale réalisés par Boldron *et al.* ont permis le développement de ligands originaux visant les récepteurs P2Y₁₂.¹⁶⁴ Cette étude a été menée pour découvrir de nouveaux composés aux propriétés anticoagulantes et pouvant être une alternative au Clopidogrel, un médicament utilisé en cas d'attaque cardiovasculaire mais qui présente des risques d'hémorragies. Le criblage informatique d'un catalogue de composés a permis de mettre à jour un pharmacophore intéressant à partir duquel plusieurs ligands ont été synthétisés et optimisés. L'un de ces ligands (molécule lead, Figure 27) présenterait des caractéristiques physico-chimiques adaptées pour passer la BHE et a montré une forte affinité pour les récepteurs P2Y₁₂ (IC₅₀ = 17 nM). De plus, un marquage isotopique au carbone-11 est possible sur cette structure qui présente une amine méthylée. Ce marquage isotopique n'engendre pas de modifications structurales de la molécule et donc pas de changement d'affinité du composé radiomarqué. D'autre part, d'autres molécules basées sur ce pharmacophore peuvent également être envisagées, notamment pour le développement d'un radioligand marqué au fluor-18.

La première partie de mon travail de thèse a consisté à préparer de nouveaux ligands en introduisant des modifications structurales au niveau du **noyau pyridazine**, au niveau du **substituant de l'indole** ou au niveau du **linker** entre la pipéridine et de l'atome radioactif (Figure 27). Deux séries de composés méthylés ou fluorés ont ainsi été préparées. Dans un deuxième temps, des tests *in vitro* (affinité, métabolisme) ont permis de déterminer quels composés étaient les plus intéressants pour une utilisation *in vivo*. Enfin, les précurseurs de marquage des composés sélectionnés ont été préparés afin de mettre au point le radiomarquage des ligands et d'étudier les nouveaux radiotraceurs. Des expériences *in vitro* d'autoradiographie et des expériences *in vivo* de biodistribution et d'imagerie TEP ont été réalisées. Ces radiotraceurs ont été évalués sur des animaux sains ainsi que sur deux modèles animaux, le premier présentant une surexpression des récepteurs P2Y₁₂ dans un hémisphère du cerveau et le deuxième présentant une pathologie neurologique (sclérose en plaques).

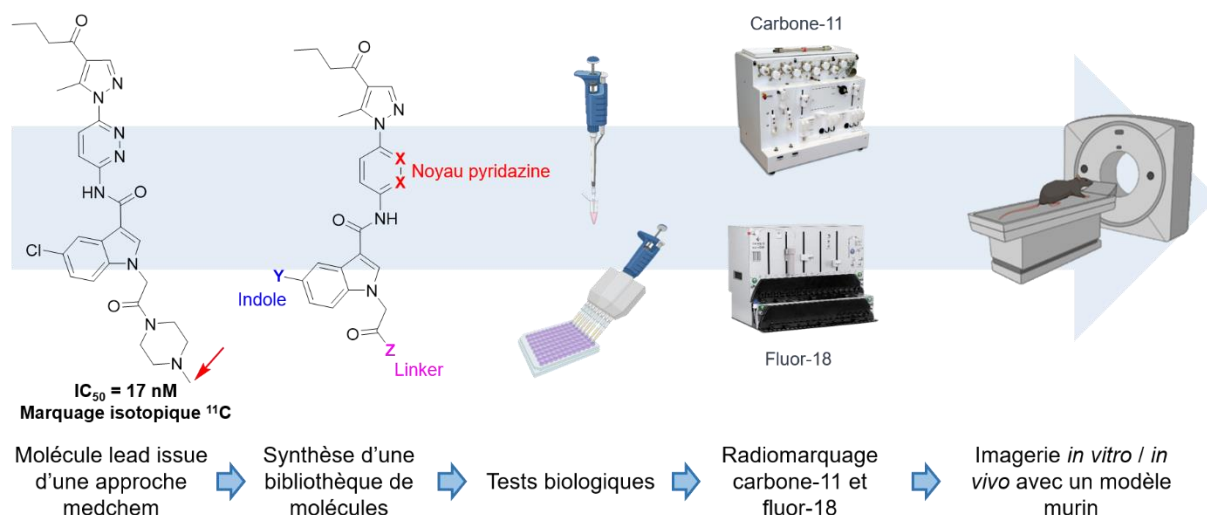


Figure 27. Stratégie de développement de nouveaux radioligands de P2Y₁₂.

II. Synthèse des composés

Les voies de synthèse suivies pour préparer les différents composés s'inspirent directement de celles décrites par Boldron *et al* (Schéma 24).¹⁶⁴ De manière générale, les références froides et les précurseurs de marquage ont été obtenus à partir d'un couplage peptidique entre les synthons A et B préparés en parallèle. Le composé A est formé à partir d'une hydrazine aromatique ou hétéroaromatique et le composé B est obtenu par fonctionnalisation d'un indole commercial chloré ou méthylé. Des variations au niveau du substituant de l'indole (méthyle ou chlore), du noyau aromatique central (phényle ou pyridazine) et du linker de la pipérazine ont été introduites afin d'étudier leur influence sur l'affinité des ligands pour P2Y₁₂.

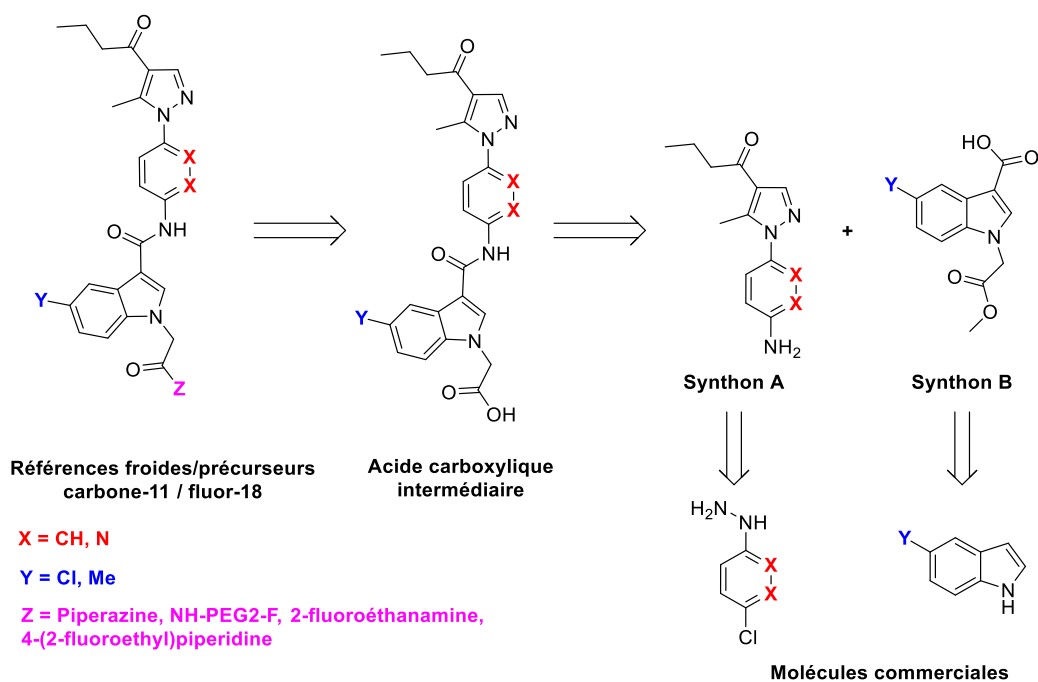


Schéma 24. Rétrosynthèse de la formation des références froides et précurseurs de marquage.

II.1. Synthèse du synthon A

Deux synthons A ont été préparés avec deux noyaux aromatiques différents : un noyau pyridazine et un noyau phényle. Les étapes de synthèse nécessaires à la préparation de ces deux noyaux sont légèrement différentes.

Dans un premier temps, une réaction de condensation de Knoevenagel a été réalisée entre le 3-oxobutanoate d'éthyle **4** et la 1,1-diméthoxy-*N,N*-diméthylméthanamine pour former l'énamine **5** avec un rendement quantitatif (Schéma 25). Cette énamine a ensuite été mise en réaction avec une hydrazine hétéroaromatique **6** ou aromatique **7** pour donner respectivement les noyaux pyrazoles **8** et **9** avec des rendements respectifs de 44% et 74%. Le rendement moyen observé dans le cas du composé **8** est dû à la formation du sous-produit **10**, obtenu par substitution avec la diméthylamine éliminée lors de la réaction entre l'hydrazine **6** et l'énamine **5**. D'après le suivi LC-MS de cette réaction, on a observé un ratio 60/40 entre le produit souhaité **8** et le sous-produit **10**.

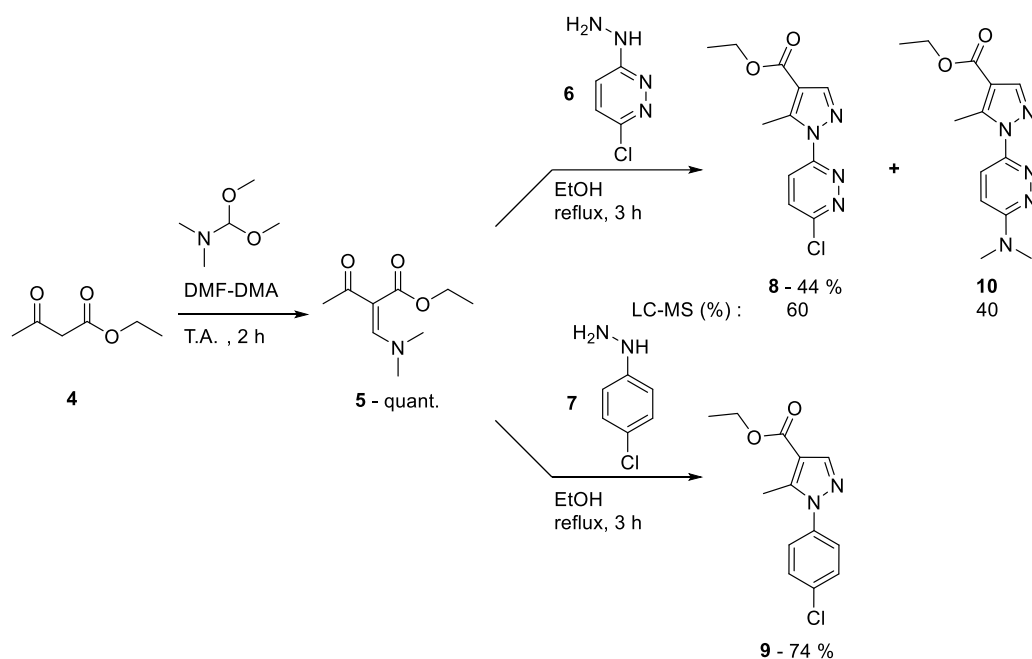


Schéma 25. Synthèse des pyrazoles 8 et 9.

Afin d'obtenir la fonction amine du cycle aromatique qui sera ensuite utilisée pour le couplage entre les synthons A et B, la *para*-méthoxybenzylamine (PMB) a été utilisée pour substituer l'atome de chlore des composés 8 et 9. L'insertion du groupe PMB varie en fonction du noyau aromatique considéré (Schéma 26). Dans le cas du noyau pyridazine 8, l'amine a été introduite par réaction de substitution nucléophile aromatique pour former le composé 11 avec un rendement de 91%. Pour le noyau phényle 9, la substitution nucléophile aromatique n'a pas été possible à cause de l'enrichissement en électrons du cycle aromatique. La molécule souhaitée 12 a été obtenue par un couplage de type Buchwald-Hartwig catalysé au palladium avec un rendement de 92%.¹⁶⁵

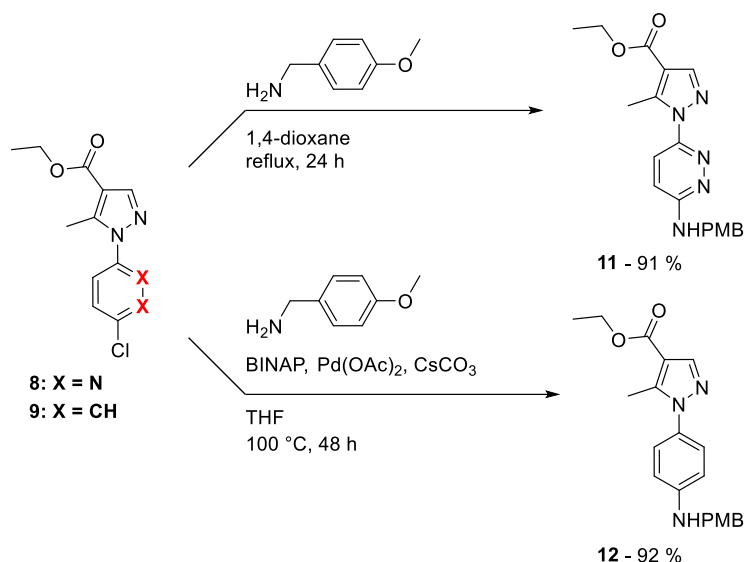


Schéma 26. Formation de **11** et **12**.

Pour la suite de la synthèse, les esters des molécules **11** et **12** ont été saponifiés en présence d'hydroxyde de potassium, permettant d'obtenir les molécules **13** et **14** avec des rendements presque quantitatifs. Ces composés ont été engagés dans une réaction de formation d'un β -cétoester en présence de malonate d'éthyle de potassium, de chlorure de magnésium et avec une activation préalable de l'acide par le carbonyldiimidazole (CDI). Les molécules **15** et **16** ont ainsi été synthétisées avec des rendements respectifs de 64 % et 85 %. Ensuite, l'alkylation par l'iodure d'éthyle en présence de carbonate de césium a permis de former les produits **17** et **18** avec de bons rendements. Pour finir, l'utilisation d'acide chlorhydrique concentré à reflux a permis la déprotection du groupement PMB ainsi que l'hydrolyse de l'ester méthylique et la décarboxylation du β -cétoacide formé. Les deux synthons **19** et **20** ont été obtenus en 7 étapes avec un rendement global de 17 % pour le noyau pyridazine et de 51 % pour le noyau phényle (Schéma 27).

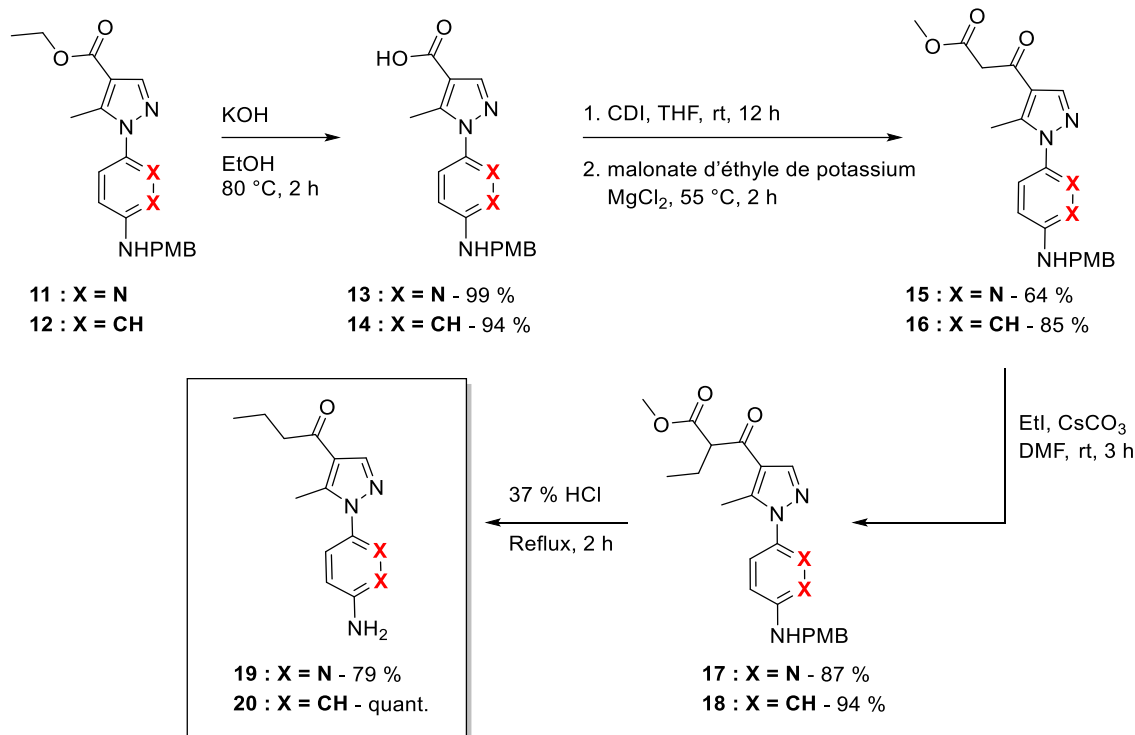


Schéma 27. Obtention des synthons 19 et 20.

II.2. Synthèse du synthon B

La synthèse multi-étapes du synthon B a été réalisée en parallèle. Ici aussi, deux types de synthons commerciaux ont été utilisés : le 5-chloroindole **21** et le 5-méthylindole **22**. Les composés **21** et **22** ont d'abord été modifiés par acylation avec une fonction trifluorométhyle cétone en position 3 *via* l'action de l'anhydride trifluoracétique pour former les composés **23** et **24** avec des rendements de l'ordre de 80 %. Ces composés ont par la suite été hydrolysés en milieu basique, conduisant aux acides carboxyliques **25** et **26** (Schéma 28).

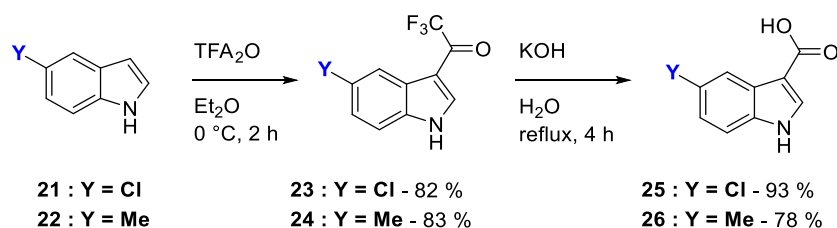


Schéma 28. Synthèse des composés 25 et 26 à partir des indoles commerciaux.

Pour la suite de la synthèse, plusieurs stratégies d'alkylation de l'amine ont été étudiées. La première stratégie consiste à déprotoner l'amine puis à l'alkyler par action du bromoacétate de méthyle (Schéma 29) selon la méthode décrite dans la publication de *Boldron et al.*¹⁶⁴ Cependant, quand ces conditions ont été employées pour alkyler le composé **25**, le produit

souhaité a été obtenu en faibles quantités dans un mélange inséparable de sous-produits d'alkylation de l'acide et de double alkylation à la fois sur l'amine et sur l'acide. Différentes conditions réactionnelles ont été testées (variation de base et de température) mais elles n'ont pas permis d'obtenir uniquement l'amine alkylée souhaitée.

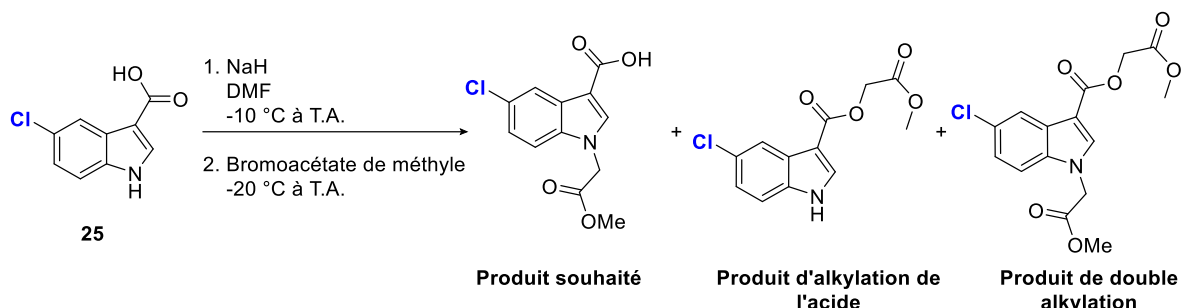


Schéma 29. Alkylation du produit 25 selon la méthode décrite par Boldron et al.

De ce fait, une protection intermédiaire de l'acide carboxylique a donc été nécessaire. Pour cela, l'acide **25** a d'abord été protégé sous la forme d'un ester de di-*tert*-butyle par traitement avec le DMF di-*tert*-butyl acétal dans le toluène à reflux. Le brut réactionnel a ensuite été directement engagé dans une réaction d'alkylation par le bromoacétate de méthyle en présence de carbonate de césium (Schéma 30). Le rendement de cette double étape de formation de la molécule **27** a été de seulement 30 % à cause de la formation du sous-produit de décarboxylation **28**. Cette décarboxylation a été observée dès la première étape et l'amine de l'indole décarboxylé a également été alkylée lors de la deuxième étape. Cette décarboxylation d'indole à haute température est un phénomène qui a déjà été rapporté.¹⁶⁶

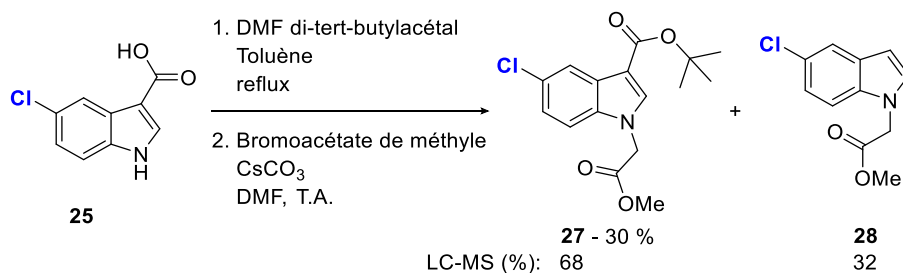


Schéma 30. Protection de l'acide 25 sous forme d'ester de *tert*-butyle et alkylation.

Un autre groupement protecteur a donc été envisagé (Schéma 31). Les acides **25** et **26** ont d'abord été protégés sous forme d'ester benzylique par réaction avec l'anhydride trifluoroacétique et l'alcool benzylique. Le milieu réactionnel a ensuite été concentré puis le brut réactionnel a été mis en réaction avec le bromoacétate de méthyle en présence de carbonate de potassium. Les composés **29** et **30** ont ainsi été obtenus avec de bons rendements en 2 étapes.¹⁶⁷ Pour finir, les composés ont été déprotégés par hydrogénolyse catalysée au palladium

sur charbon dans le THF. La déprotection de la molécule **29** a nécessité un suivi rigoureux par LC-MS car l'action du palladium sur charbon peut engendrer la formation d'un sous-produit de déhalogénéation de l'indole. Les deux synthons indoles fonctionnalisés **31** et **32** ont été obtenus en 5 étapes avec des rendements respectifs de 41 % et 45 %.

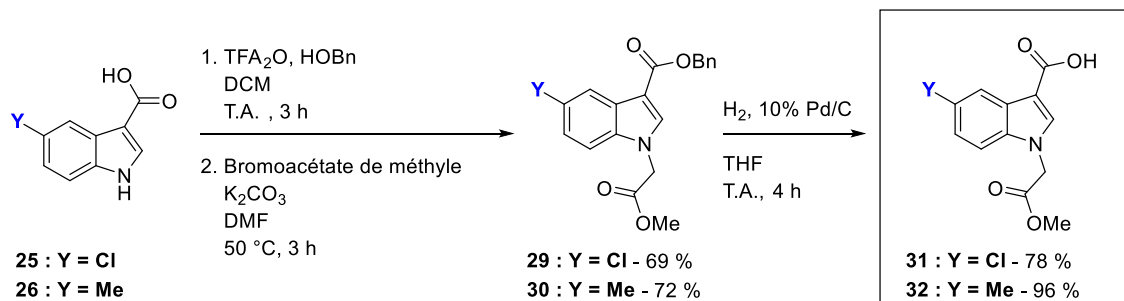


Schéma 31. Obtention des synthons 31 et 32.

II.3. Couplage des deux synthons

Cette étape de couplage entre les synthons A et B a été mise au point sur des molécules modèles dont la structure est plus simple que celle des synthons A et B. Etant donné que la réactivité de l'amine aromatique diffère entre les deux noyaux, l'amine aromatique de la pyridazine étant moins réactive que l'amine aromatique du noyau phényle, deux amines modèles **33** et **34** ont été préparées (Schéma 32). Pour cela, les fonctions amines des molécules **11** et **12** ont été déprotégées par action d'acide trifluoroacétique (TFA). Dans le cas de l'amine aromatique du noyau phényle **12**, l'action du TFA dans le dichlorométhane à température ambiante a été suffisante pour la déprotection. Cependant, pour l'amine aromatique du noyau pyridazine **11**, il a été nécessaire d'utiliser le TFA pur et de chauffer pendant plusieurs heures. Les composés souhaités **33** et **34** ont été obtenus avec des rendements quantitatifs.

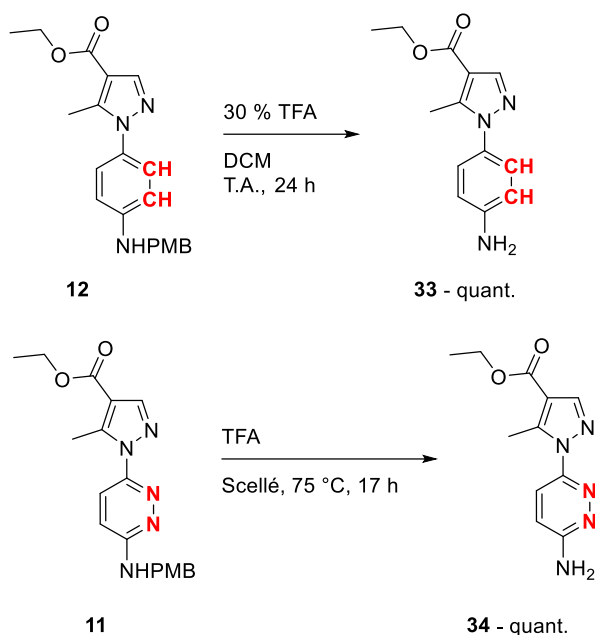


Schéma 32. Formation des amines modèles 33 et 34.

Différentes conditions de couplage entre les amines 33 ou 34 et un indole commercial *N*-alkylé 35 portant un acide carboxylique en position 3 ont ensuite été examinées (Schéma 33, Tableau 2)

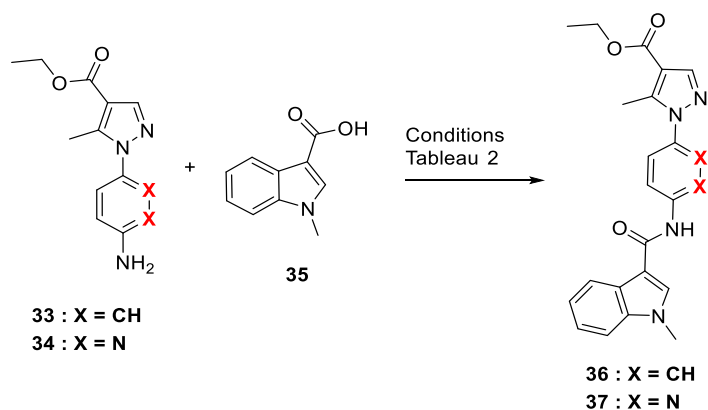


Schéma 33. Couplage des molécules modèles.

En ce qui concerne le noyau phényle 33, l'activation de l'acide commercial par le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) a été testée en présence de différentes bases (Tableau 2, entrées 1-3). Dans un premier temps, l'acide a été activé par l'EDC en présence de 4-diméthylaminopyridine (DMAP), d'hydroxybenzotriazole (HOBT) et de *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) dans l'acétonitrile, et une conversion de 39 % a été observée (entrée 1). Cette conversion a été améliorée à hauteur de 65 % en utilisant seulement la DMAP avec l'EDC dans le dichlorométhane à 50 °C (entrée 3). Cependant l'utilisation de la base DIPEA au lieu de la DMAP dans les mêmes conditions n'a permis d'obtenir le composé 36 qu'avec une conversion de 2 % seulement (entrée 2). Le passage par un chlorure d'acide, selon les conditions réactionnelles décrites dans *Boldron et al.*¹⁶⁴ a également été tenté mais n'a pas

permis d'observer le composé souhaité (entrée 4). L'utilisation d'EDC en présence de DMAP dans le dichlorométhane à 50 °C a conduit à la meilleure conversion et a donc été privilégiée.

Tableau 2. Mise au point du couplage des composés modèles.

Entrée	X	Conditions	Temps	Conversion ^a
1	CH	EDC, DMAP, HOBt, DIPEA, MeCN, 75 °C	27 h	39 %
2	CH	EDC, DIPEA, DCM, 50 °C	70 h	2 %
3	CH	EDC, DMAP, DCM, 50 °C	18 h	65 %
4	CH	1. SOCl ₂ , DMF, reflux 2. DMAP, DCM, 50 °C	70 h	n.d. ^b
5	N	EDC, DMAP, DCM, 50 °C	28 h	2 %
6	N	HATU, DIPEA, DMF, 50 °C	20 h	n.d. ^b
7	N	1. MsCl, NMI, DCM, 0 °C, 5 min 2. 34 , 50 °C	90 h	n.c. ^c
8	N	1. MsCl, NMI, DCM, 0 °C, 90 min 2. 34 , 50 °C	73 h	n.c. ^c

(a) Détermination de la conversion par analyse LC-MS. (b) Le produit n'est pas détecté par analyse LC-MS. (c) Le produit a été détecté mais la conversion n'a pas pu être calculée à cause d'une contamination avec un sous-produit qui a le même temps de rétention.

Concernant le noyau pyridazine **34**, les conditions optimisées pour la molécule **33** n'ont pas permis la formation du produit **37** avec une conversion acceptable, puisqu'une conversion de seulement 2 % a été observée par LC-MS (entrée 5). Ceci s'explique par la faible réactivité de l'amine hétéroaromatique. Un autre agent de couplage, l'hexafluorophosphate d'azabenzotriazole tétraméthyl uronium (HATU), a été testé avec la DIPEA pour activer l'acide carboxylique. Le suivi LC-MS de cette réaction n'a pas permis de détecter le composé **37** (entrée 6). L'activation préalable de l'acide carboxylique par un groupement mésylate en présence de *N*-méthyle imidazole avant ajout de l'amine au milieu réactionnel a conduit aux meilleurs résultats (entrées 7 et 8).¹⁶⁸ La durée de l'étape d'activation de l'acide carboxylique a un impact sur la conversion, les meilleurs résultats ayant été obtenus avec une activation plus longue (entrée 8). En effet, le suivi LC-MS a permis de déterminer les proportions d'acide de départ **35** et d'acide activé intermédiaire (Figure 28). La proportion d'acide activé (tr = 3.33 min) est passée de 31 % après 5 minutes d'activation à 61 % après 90 minutes tandis que la proportion en acide de départ **35** (tr = 3.77 min) a diminué. Après addition de **34**, la formation du composé **37** souhaité a été observée en LC-MS, mais la purification de cette molécule modèle n'a pas été possible du fait de la formation d'un sous-produit de réaction, l'anhydride **38** (tr = 4.64 min). Ce composé, obtenu par condensation de l'acide carboxylique **35** sur lui-même n'a pas pu être séparé de **37** par chromatographie sur silice. Les conditions de l'entrée 8

sont malgré tout celles qui ont permis d'observer la formation du produit attendu et qui ont donc été retenues pour la suite du travail de synthèse.

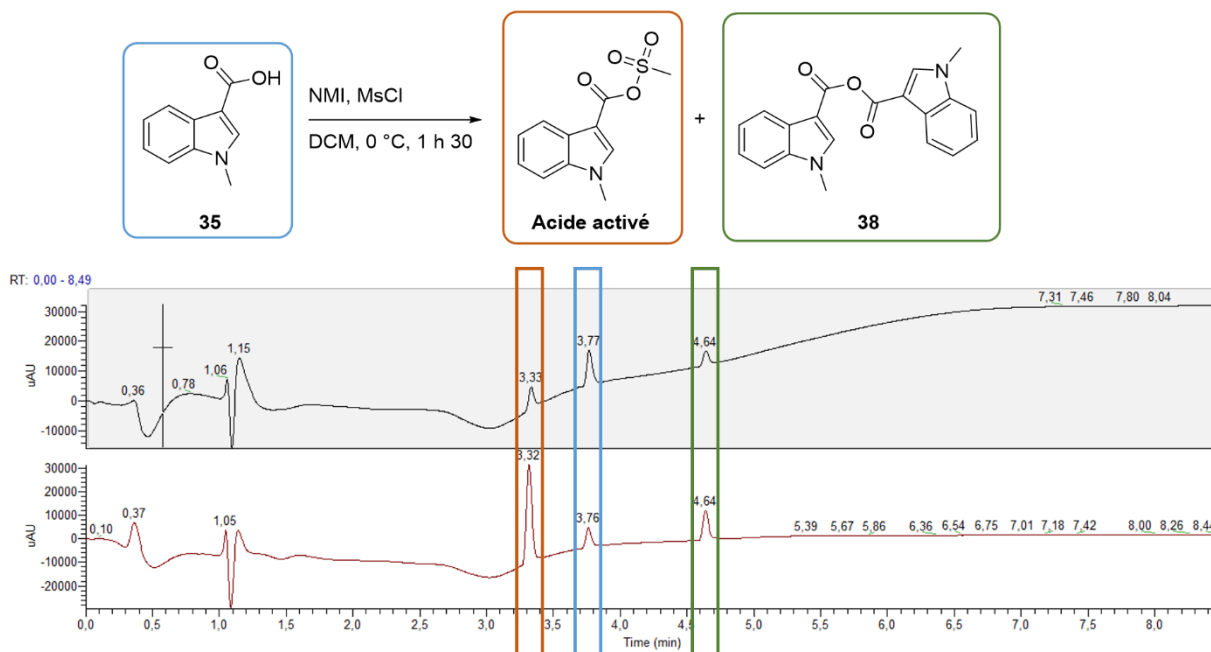


Figure 28. Réaction de couplage des composés modèles et chromatogrammes LC-MS suite à l'activation de l'acide modèle **35** par NMI et MsCl après 5 min (haut) et après 1h30 (bas).

L'application de ces conditions réactionnelles optimisées pour le couplage entre les synthons **19/20** et **31/32** a permis d'obtenir les molécules **39-42** visées avec des rendements compris entre 44 et 63 % (Schéma 34).

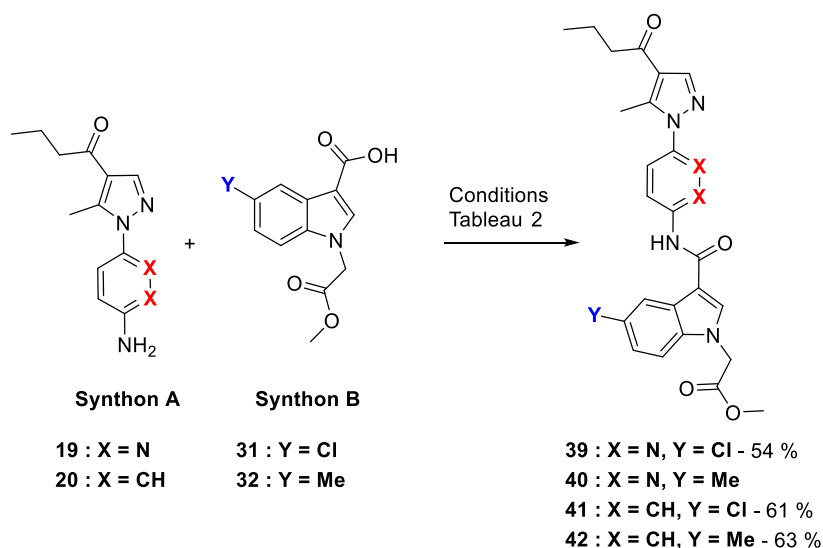


Schéma 34. Couplage entre les différents synthons A et B.

II.4. Synthèse des références froides

Par la suite, les références non radioactives fluorées ou méthylées des ligands ciblés ont été synthétisées. Pour cela, les molécules **39-42** ont d'abord été saponifiées par action de NaOH 2 M puis les acides carboxyliques **43-46** obtenus ont été couplés avec l'amine appropriée (RR'NH) en présence de HATU et de *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) (Schéma 35, Tableau 3). Au total, 8 références froides ont été synthétisées en suivant cette stratégie, 4 d'entre elles comportent une amine méthylée et sont donc des références froides de radioligands marqués au carbone-11 et les 4 autres possèdent un atome de fluor, et sont donc des références de radioligands marqués au fluor-18.

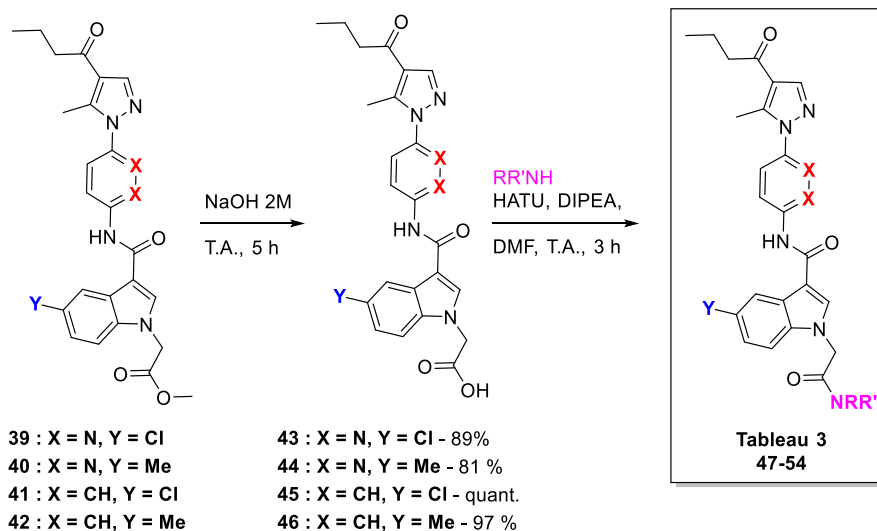
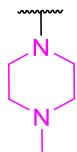
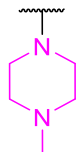
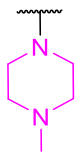
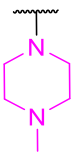
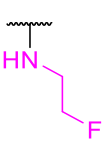
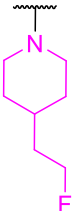
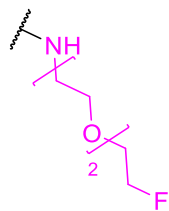
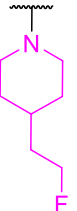


Schéma 35. Préparation des références froides.

Tableau 3. Références froides synthétisées.

Composé	47	48	49	50	51	52	53	54
X	N	N	CH	CH	CH	CH	CH	CH
Y	Cl	Me	Cl	Me	Me	Me	Me	Cl
R'RN-								
Rendement	48 %	43 %	84 %	69 %	63 %	43 %	35 %	75 %

Ces ligands froids ont ensuite été évalués *in vitro* afin de déterminer lesquels possèdent les propriétés biologiques les plus intéressantes pour une utilisation en TEP.

III. Evaluation *in vitro* des composés

Afin de sélectionner les composés les plus intéressants pour une utilisation en TEP, des tests d'affinité et des études de métabolisme ont été effectués. Dans un premier temps, dans le cadre de l'ANR PURImaging, nos collaborateurs du laboratoire du Pr Christa Müller de l'université de Bonn ont mis au point des tests *in vitro* pour déterminer l'affinité des molécules pour les récepteurs P2Y₁₂ humains (résultats en cours de publication). Le premier test est un test fonctionnel basé sur le recrutement de la β -arrestine et le deuxième est un test de compétition avec un radioligand tritié. Dans un deuxième temps, des tests de métabolisme sur les microsomes de rats et humains ont également été réalisés avec le Dr Marie-Anne Peyronneau.

III.1. Tests d'affinité

Ces tests ont été effectués dans le laboratoire du Pr Christa Müller à l'université de Bonn en collaboration avec Haneen Al-Hroub.

III.1.1. Test de recrutement de la β -arrestine

La première évaluation d'affinité des composés est basée sur un test fonctionnel de recrutement de la β -arrestine par le récepteur P2Y₁₂. La β -arrestine est une protéine du cytosol qui se fixe sur les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), famille de récepteurs à laquelle appartient P2Y₁₂. Dans le processus naturel, le récepteur couplé aux protéines G est activé par la fixation de son ligand. Cette fixation permet l'ancrage de la β -arrestine sur ce complexe ligand/RCPG

et permet son internalisation (Figure 29-A). En se basant sur cette voie de signalisation, il est donc possible de mesurer l'activité du complexe β -arrestine/RCPG et donc dans notre cas, l'activité du récepteur P2Y₁₂ en présence des différents ligands que l'on veut évaluer. Pour ce test, une lignée cellulaire spécifique a été utilisée (CHO-K1 β -arrestine), ces cellules ont été transfectées de manière stable pour exprimer les récepteurs P2Y₁₂ humains. Le P2Y₁₂R a été modifié avec l'ajout d'un fragment de la β -galactosidase (ProLink PK) qui est exprimé à sa surface dans la cellule. La β -arrestine, elle aussi mutée, possède la deuxième moitié du fragment de l'enzyme de la β -galactosidase dite enzyme acceptrice (EA). Lors de l'activation du P2Y₁₂R par un ligand, la protéine recombinante de β -arrestine va se fixer sur le récepteur P2Y₁₂ et permettre la complémentation des deux morceaux d'enzyme pour obtenir une β -galactosidase fonctionnelle (Figure 29-B). L'activité du récepteur P2Y₁₂ est ensuite mesurée par chimiluminescence avec un réactif substrat de la β -galactosidase.¹⁶⁹

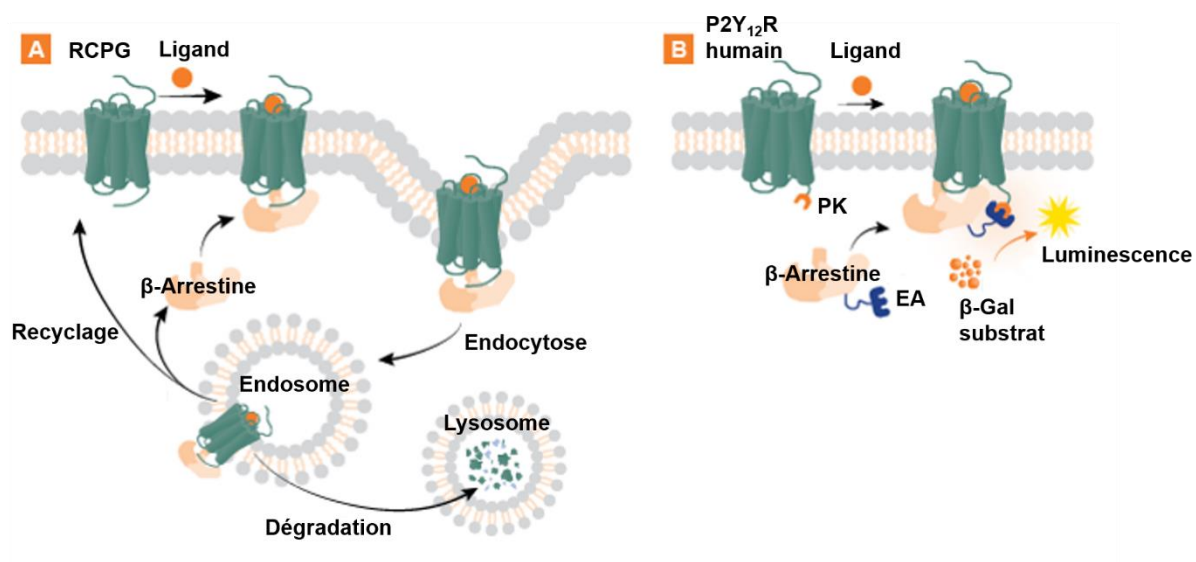


Figure 29. A) Processus biologique de l'activation d'un RCPG avec la fixation de la β -arrestine ; B) Processus modifié de l'activation du P2Y₁₂R avec la fixation d'un complexe β -arrestine mutant pour l'évaluation de l'affinité des composés.

Au préalable, des agonistes et antagonistes connus ont été testés pour vérifier les paramètres du test (Figure 30). L'adénosine diphosphate (ADP) est une molécule endogène et le 2-méthylthioadénosine diphosphate (2-Me-S-ADP) est un dérivé de l'ADP, ils sont tous deux des agonistes des récepteurs P2Y₁₂. Nous avons obtenu des EC₅₀ de 556 ± 128 nM pour l'ADP et de 5.47 ± 0.98 nM pour le 2-Me-S-ADP, respectivement, en accord avec la littérature.¹²⁵ Le Ticagrelor est un médicament antiplaquettaire et un antagoniste des récepteurs P2Y₁₂. Avec ce test du recrutement de la β -arrestine, une IC₅₀ de 34 ± 0.005 nM a été calculée pour ce composé, ainsi qu'un pourcentage d'inhibition de 108 ± 1 % à 1 μ M, ce qui est comparable avec la littérature.¹²⁵

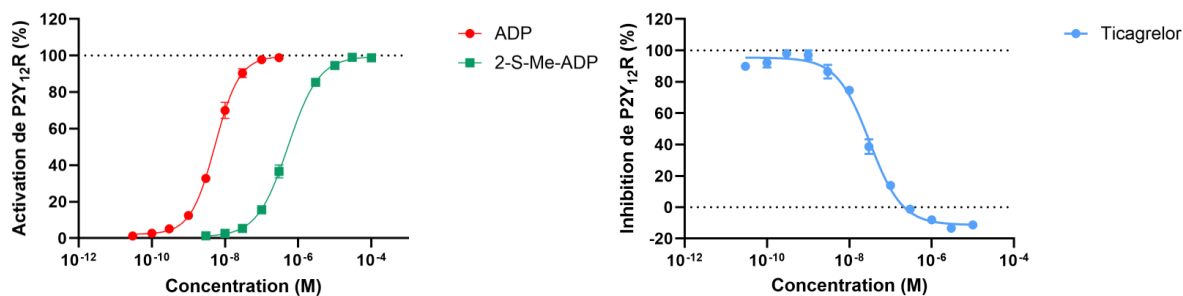


Figure 30. Courbes doses-réponses des composés agonistes ADP et 2-Me-S-ADP et antagoniste Ticagrelor.

Les composés **47-54** ont été testés en présence de l'agoniste 2-Me-S-ADP (ligand compétiteur) à une concentration connue (20 nM) correspondant à son EC₈₀. Dans un premier temps, les cellules exprimant P2Y₁₂ ont été incubées avec différentes concentrations du composé à tester (de 10⁻¹⁰ à 10⁻¹ M) puis en présence de la 2-Me-S-ADP. A la fin de l'incubation avec le ligand compétiteur, un réactif servant de substrat à la β-galactosidase a été ajouté et la chimiluminescence obtenue a été mesurée (Partie expérimentale, procédure β-arrestin assay). Avec ce test, plus le ligand est affiné pour le récepteur, plus la luminescence obtenue est importante. Au vu des résultats obtenus, nous constatons que les composés ont des IC₅₀ globalement similaires (Tableaux 4 et 5). Concernant les références froides méthylées **47-50**, le composé **49** est celui ayant l'affinité la plus haute avec une IC₅₀ de 0.144 ± 0.041 μM. Il semble également que la présence d'un chlore sur l'indole soit bénéfique (Tableau 4, comparer **49** à **50**) et que la substitution de la pyridazine par un noyau phényle ne modifie pas l'affinité (Tableau 4, comparer **48** à **50**).

Tableau 4. IC₅₀ obtenues par le test de recrutement de la β-arrestine pour les références froides méthylées.

Composé	47	48	49	50
IC ₅₀ (μM)	0.379 ± 0.080	0.308 ± 0.068	0.144 ± 0.041	0.372 ± 0.094
% inhibition	97 ± 2 à 10 μM 79 ± 3 à 1 μM	100 ± 1 à 10 μM 84 ± 4 à 1 μM	102 ± 2 à 10 μM	102 ± 2 à 10 μM

En ce qui concerne les références froides fluorées **51-54**, le composé **54** semble être le plus intéressant avec une IC₅₀ de 0.223 ± 0.009 μM (Tableau 5). On observe un facteur 2 entre les affinités des composés **54** et **52**, il semblerait donc que la présence du chlore sur l'indole soit bénéfique pour sa liaison au récepteur. Par ailleurs, la chaîne PEG du composé **53** semble délétère pour la fixation du composé au récepteur.

Tableau 5. IC₅₀ obtenues par le test de recrutement de la β-arrestine pour les références froides fluorées.

Composé	51	52	53	54
IC ₅₀ (μM)	0.318 ± 0.016	0.451 ± 0.085	0.598 ± 0.039	0.223 ± 0.009
% inhibition	80 ± 3 à 1 μM	93 ± 1 à 10 μM	96 ± 3 à 10 μM	99 ± 1 à 10 μM 93 ± 2 à 1 μM

Il faut noter que les IC₅₀ obtenues par le test de recrutement de la β-arrestine ont une tendance à être surestimées. En effet, la valeur de l'IC₅₀ publiée du composé **47** est de 17 nM.¹⁶⁴ Un test d'affinité basé sur l'utilisation d'un ligand tritié est donc nécessaire pour déterminer de manière plus précise l'affinité des composés.

III.1.2. Test de compétition avec un radioligand tritié

Une deuxième évaluation de l'affinité *in vitro* des composés a été effectuée par nos collaborateurs de l'université de Bonn. Les composés ont été mis en compétition avec un nouveau radioligand tritié développé dans le cadre de la collaboration, [³H]PSB-22219 (Figure 31).

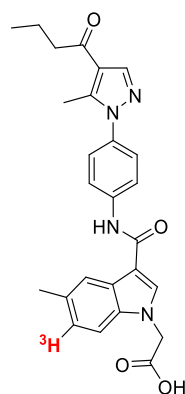


Figure 31. Structure du composé [³H]PSB-22219.

Les composés à tester ont été mis au contact de cellules transfectées de manière stable avec les récepteurs P2Y₁₂ humains (lignée CHO-K1, Figure 32) à différentes concentrations (de 10⁻¹² à 10⁻⁵ M) en présence du radioligand tritié à une concentration connue (2 nM). Après une première étape de co-incubation des récepteurs, du ligand tritié et du composé à tester, les puits ont été lavés afin d'éliminer les molécules non liées aux récepteurs. Enfin, le comptage de la radioactivité du ligand tritié lié au récepteur a permis de déterminer la proportion de ligand tritié lié aux récepteurs en fonction de la concentration des composés à tester. Plus cette valeur de

radioactivité est élevée, plus le pourcentage de ligand tritié est élevé et moins le ligand testé est affiné avec le récepteur.

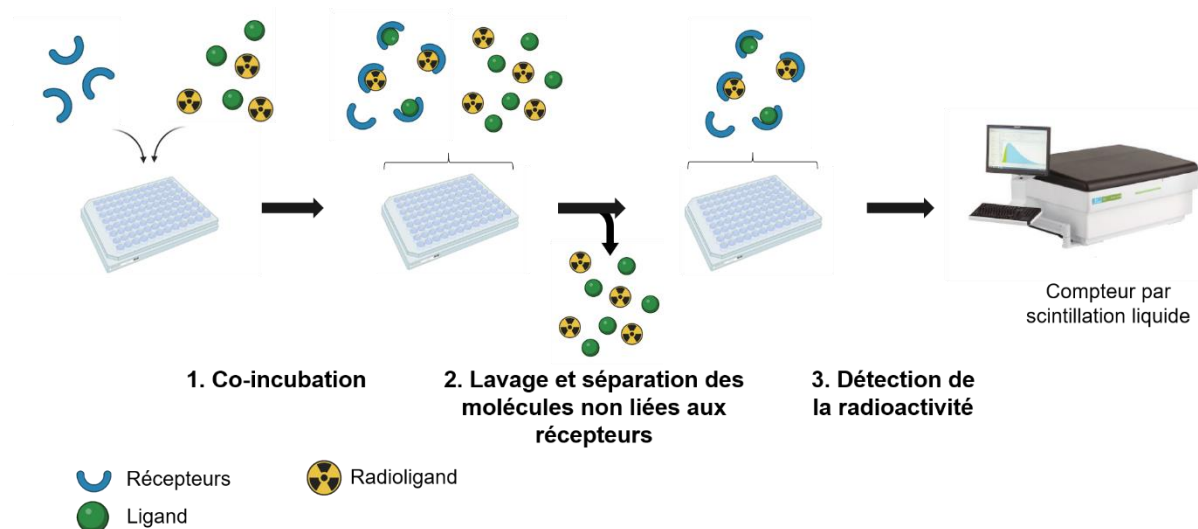


Figure 32. Les différentes étapes du test de compétition avec le radioligand [³H]PSB-22219.

Les constantes d'inhibition obtenues sont similaires entre les différents composés, comme nous l'avons vu précédemment avec le test de recrutement de la β -arrestine (Tableau 6). Le composé le moins affiné est là encore le composé **53** dont la structure comporte une chaîne PEG. La nature des noyaux aromatiques et la fonctionnalisation de l'indole en position 5 ne semblent pas avoir d'impact sur l'affinité du composé. En effet, il n'y a pas de différences notables entre les analogues **47** et **48**, ou entre **48** et **50**.

Tableau 6. Constantes d'inhibitions des composés obtenues par compétition avec [³H]PSB-22219 ($n = 3$).

Composé	47	48	49	50	51	52	53	54
Structure								
Ki (nM)	11.4 ± 3.9	11.5 ± 0.9	12.1 ± 1.2	10.4 ± 1.6	11.2 ± 1.3	15.3 ± 2.4	26.5 ± 3.4	17.1 ± 0.8

Les résultats obtenus avec ce deuxième test d'affinité montrent la bonne affinité globale de cette série de composés pour le récepteur P2Y₁₂.

III.2. Métabolisme des composés

Les ligands développés ont également été testés *in vitro* pour déterminer leur profil métabolique. Pour cela, ils ont été évalués en présence de microsomes hépatiques de rats et humains.

III.2.1. Utilisation de microsomes de rats

L'évaluation de la métabolisation des ligands par les microsomes hépatiques de rat a été déterminée par des analyses LC-MS et MS-MS. Les incubations ont été faites avec et sans système générateur de NADPH, c'est à dire en présence ou en absence des cofacteurs nécessaires à l'activité enzymatique. Les réactions sans système générateur de NADPH servent de contrôle négatif. De manière générale, les composés n'ont été que peu métabolisés, à hauteur de 2 à 12 % environ après 60 min d'incubation selon les ligands testés. Les analyses LC-MS ont démontré la présence de trois à cinq métabolites qui sont plus polaires que les composés de départ. Les profils de fragmentation MS-MS permettent de proposer que ces métabolites proviennent notamment de réactions d'hydroxylation et de déalkylation (*N* et *O*-déalkylation, Figure 33). Différentes positions d'hydroxylation sont ainsi possibles. Tous les ligands ont été oxydés au niveau du méthyle terminal de la chaîne alkyle de la fonction cétone, au niveau du groupement méthyle du pyrazole et au niveau du noyau indole. Le groupement méthyle du noyau indole des composés **48**, **50**, **51**, **52** et **53** a également été hydroxylé, alors que les composés chlorés **47**, **49** et **54** sont restés inchangés sur cette position 5. Des déalkylations ont aussi été observées au niveau du substituant de l'amide. Pour les composés **47-50**, une *N*-déméthylation de la pipérazine a été observée. Cette métabolisation sur cette position peut être problématique pour l'utilisation de ces composés comme radiotraceurs. En ce qui concerne le composé **51**, une déalkylation de la chaîne fluorée a été observée. Pour le composé **53**, la chaîne PEG a été *O*-déalkylée au niveau des deux atomes d'oxygène. La déalkylation des chaînes fluorées de **51** et **53** *in vivo* pourrait engendrer un radiométabolite fluoré qui induirait un signal non spécifique à l'imagerie TEP. Ces composés ne sont donc pas à privilégier pour une utilisation en imagerie TEP.

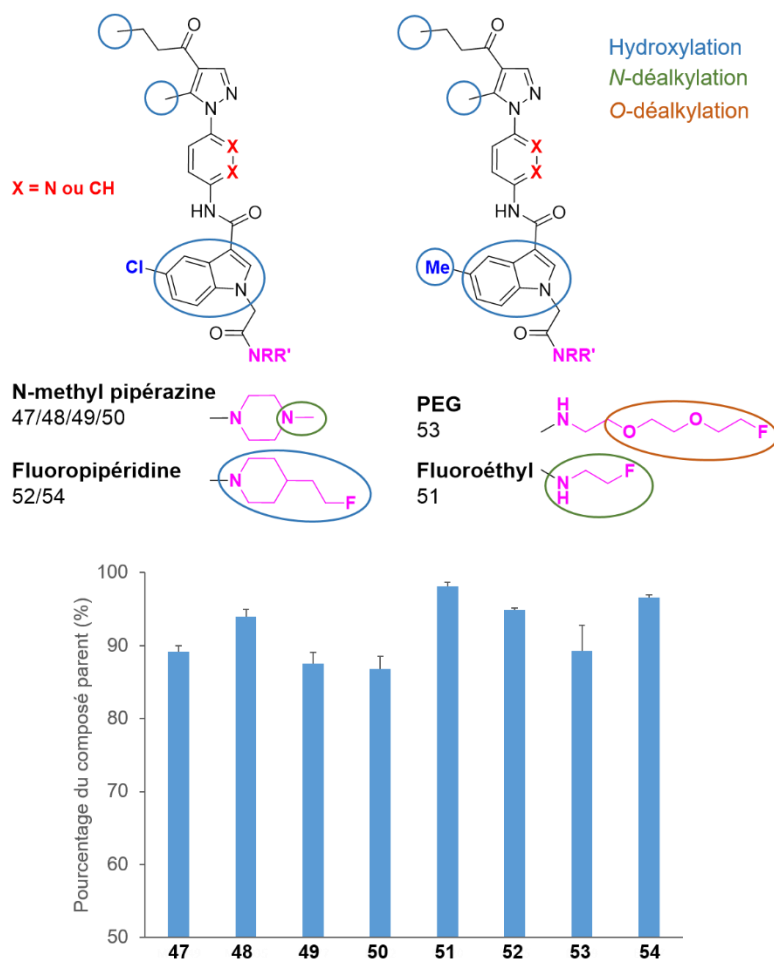


Figure 33. Sites potentiels de métabolisation et pourcentages du composé parent restant après une heure d'incubation à 37 °C avec des microsomes hépatiques de rats.

III.2.2. Utilisation de microsomes humains

De manière générale, les résultats de métabolisation des composés en présence de microsomes humains sont similaires à ceux obtenus avec les microsomes hépatiques du rat. Une différence a été notée au niveau des réactions d'hydroxylation qui ont eu lieu principalement au niveau du méthyle du pyrazole dans ce cas (Figure 34). De plus, les microsomes de foie humain ont été plus actifs au niveau des réactions de O-déalkylation de la chaîne fluorée du composé **53**.

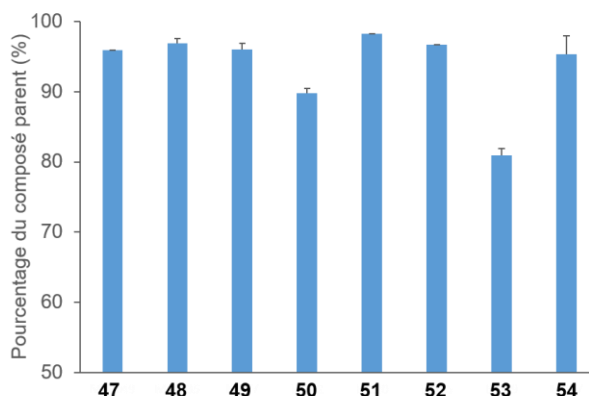


Figure 34. Pourcentages du composé parent des ligands testés après une heure d'incubation à 37 °C avec des microsomes hépatiques humains.

Les résultats des tests d'affinité ainsi que de métabolisme *in vitro* nous ont permis de faire une première sélection de composés pour la suite de ce projet. La molécule **53** a été éliminée car elle présente la moins bonne affinité ($K_i = 26.5$ nM) et la chaîne PEG porteuse de l'atome de fluor est assez fortement métabolisée, ce qui entrainerait la perte de l'atome radioactif du composé marqué. De la même façon, le composé **51** a été écarté malgré sa bonne affinité, sa métabolisation au niveau de la chaîne fluoroéthyle poserait un problème pour l'imagerie TEP. Les composés **48**, **50** et **52** ont aussi été mis de côté à cause de la présence du méthyle facilement hydroxylé sur le noyau indole. Pour le radiomarquage au fluor-18, c'est donc le composé **54** qui a été choisi. Entre les composés **47** et **49**, l'évaluation *in vitro* a démontré une affinité similaire et les mêmes métabolites potentiels. Le radiomarquage de ces composés au carbone-11 ayant lieu sur la même position méthylrique de la pipérazine, notre choix s'est porté sur la molécule **47** qui avait été sélectionnée par *Boldron et al.*¹⁶⁴

En comparaison avec les différentes structures proposées par *Boldron et al.*,¹⁶⁴ ces composés montrent une constante d'affinité similaire ou meilleure, une faible métabolisation ainsi que la possibilité d'un radiomarquage au carbone-11 ou au fluor-18.

IV. Radiomarquage des composés

Les tests d'affinité et les études de métabolisme nous ont conduit à choisir les ligands **47** et **54** comme composés les plus intéressants pour des études *in vivo*. Nous nous intéressons ici à leur radiomarquage.

IV.1. Préparation des précurseurs de marquage

Les deux précurseurs de marquage des ligands sélectionnés ont été obtenus en suivant un schéma réactionnel similaire à celui suivi pour la synthèse des références froides correspondantes.

Pour obtenir le précurseur de marquage au carbone-11 **56** qui correspond au composé **47** déméthylé au niveau de la pipérazine, l'acide **43** a été couplé avec la 1-boc-pipérazine à l'aide d'un agent de couplage (HATU) et d'une base (DIPEA) dans le *N,N*-diméthylformamide pour former le composé **55**. Une étape de déprotection par action de l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane a ensuite été réalisée afin d'obtenir l'amine **56** avec un rendement de 55 % sur deux étapes (Schéma 36).

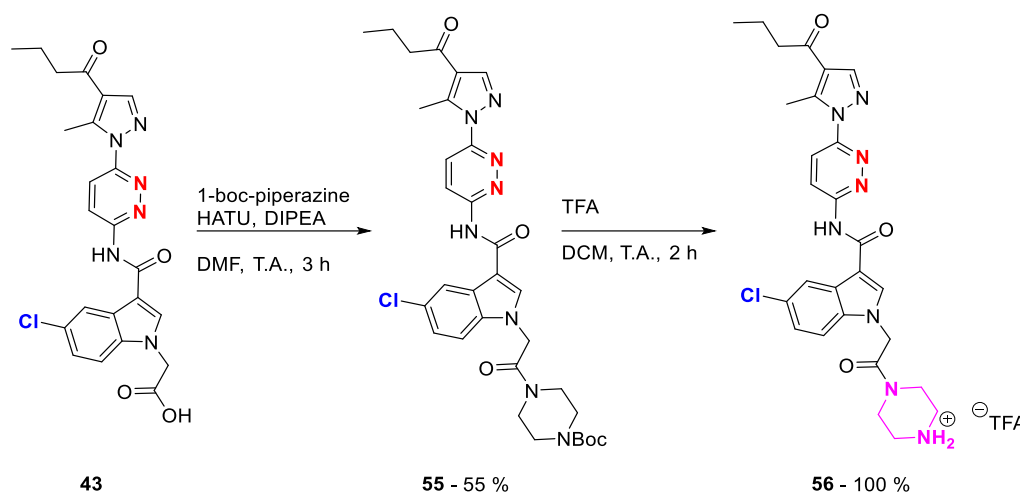


Schéma 36. Préparation du précurseur de marquage **56**.

Concernant la radiofluoration de **61**, nous envisageons d'introduire l'atome de fluor-18 par substitution nucléophile aliphatique. Cela nécessite donc de préparer un précurseur de marquage comportant un bon groupe partant et le choix s'est porté sur un groupement tosylo. Dans cette optique, le linker **60** a préalablement été préparé avant d'être couplé au composé **45** (Schéma 37). Pour cela, la 4-(2-hydroxyéthyl)pipéridine **57** a été protégée par le Boc₂O dans des conditions classiques en présence de triéthylamine dans le méthanol pour donner le composé **58**. Puis le groupement hydroxyle a été tosylé par le chlorure de tosylo en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane pour former l'intermédiaire **59** avec un rendement de 78 % sur deux étapes. Enfin, le composé **60** a été obtenu quantitativement par déprotection du groupement Boc par action de l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane à 0 °C. Enfin, le composé **45** a été couplé à l'amine **60** dans des conditions classiques avec HATU et en présence de DIPEA dans le *N,N*-diméthylformamide. Le précurseur **61** a été obtenu avec un rendement de 61 % sur cette dernière étape.

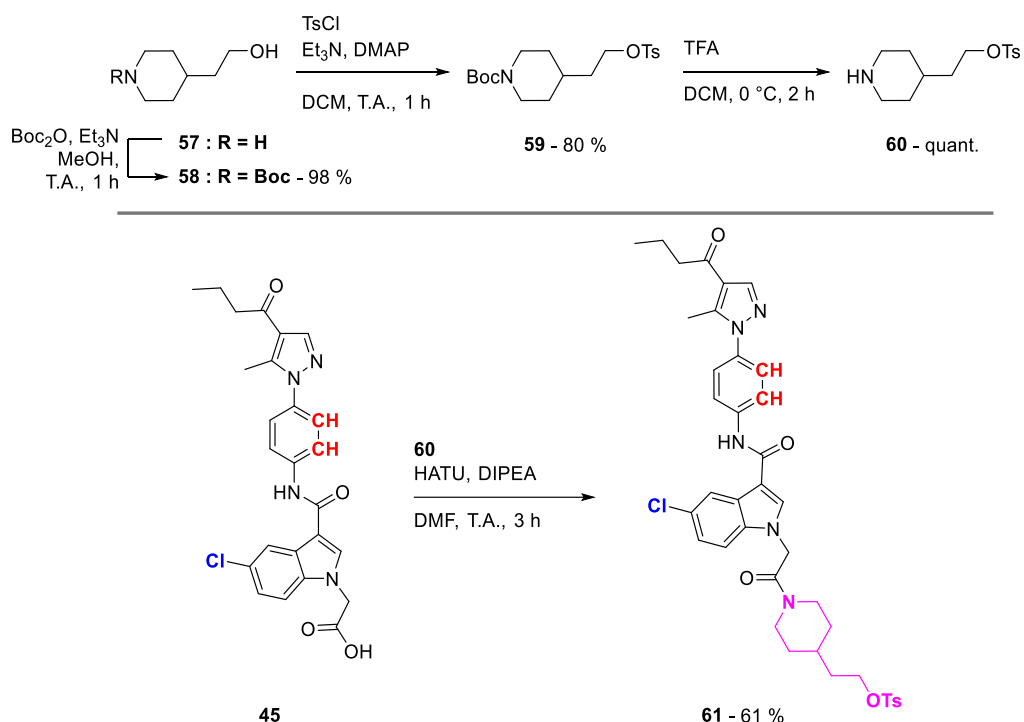


Schéma 37. Préparation du précurseur de marquage 61.

Avec les précurseurs de marquage en main, leur radiosynthèse a ensuite été étudiée, soit par radiométhylation du composé 56, soit par substitution nucléophile du groupement tosylé de la molécule 61 par un [¹⁸F]fluorure.

IV.2. Radiomarquage au carbone 11

L'optimisation des conditions réactionnelles pour méthyler l'amine de la pipérazine du composé 56 a été effectuée sur un automate de synthèse GE Tracerlab™ FX C Pro (méthode gazeuse) et sur un automate iPhase C-11 Pro² (méthode liquide, Schéma 38, Tableau 7).

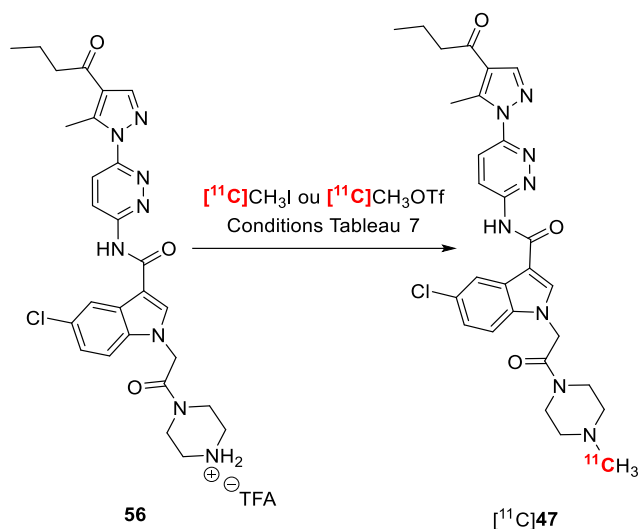


Schéma 38. Réaction de radiométhylation de 56.

Lors de cette radiométhylation, une faible quantité de précurseur est nécessaire (1 mg, soit 1.5 μmol de **56**). Bien que faible, cette quantité de précurseur reste toujours en excès si on la compare à la quantité d'agent méthylant radioactif. La radiosynthèse nécessite également la présence d'une base, il est en effet important de neutraliser le contre anion du composé **56** qui est sous forme de sel de TFA. Pour cette réaction, le choix s'est porté sur NaOH, une base communément utilisée lors de méthylation d'amines. NaOH a donc été ajoutée à la solution du précurseur **56** en excès (5 μmol , soit 3.3 équivalents). Ensuite, différents agents méthylants ont été étudiés. L'utilisation d'iodure de [¹¹C]méthyle comme agent méthylant n'a pas permis d'obtenir le traceur [¹¹C]**47** souhaité avec des conversions suffisantes, quel que soit le solvant (DMF ou butanone) ou la température (70 ou 100°C) (entrées 1, 3, 4 et 7). Le triflate de [¹¹C]méthyle, un agent méthylant plus réactif que l'iodure de méthyle, a également été évalué. En utilisant le DMF comme solvant de méthylation, le traceur n'a pas été obtenu (entrée 2). En revanche, l'utilisation d'acétone a permis d'obtenir le traceur [¹¹C]**47** souhaité avec de bons rendements (entrées 5, 6 et 8).¹⁷⁰ D'autre part, l'impact de la durée de la réaction sur le rendement de la radiosynthèse a été évalué et une meilleure conversion a été obtenue avec une radiométhylation pendant 5 minutes (comparaison entre les entrées 6 et 8).

Tableau 7. Mise au point de la radiométhylation de [¹¹C]47.

Entrée	Automate ^a	Source	Conditions	Température (°C)	Temps (min)	Rendement corrigé de la décroissance (%) ^b
1	FX C Pro	[¹¹ C]MeI	4 µL NaOH 1M 300 µL DMF	100	5	-
2	FX C Pro	[¹¹ C]MeOTf	4 µL NaOH 1M 300 µL DMF	100	5	-
3	FX C Pro	[¹¹ C]MeI	10 µL NaOH 1M 300µL butanone	100	5	2
4	FX C Pro	[¹¹ C]MeI	10 µL NaOH 1M 300µL butanone	70	5	4
5	FX C Pro	[¹¹ C]MeOTf	5 µL NaOH 1M 300µL acétone	80	5	17,7 ± 7,7 (n = 3)
6	C-11 Pro ²	[¹¹ C]MeOTf	5 µL NaOH 1M 300µL acétone	80	5	19,7 ± 3,5 (n = 14)
7	C-11 Pro ²	[¹¹ C]MeI	5 µL NaOH 1M 300µL acétone	80	5	-
8	C-11 Pro ²	[¹¹ C]MeOTf	5 µL NaOH 1M 300µL acétone	80	3	14,3 (n = 2)

(a) Les dénominations FX C Pro et C-11 Pro² correspondent respectivement au module de synthèse GE Tracerlab TM FX C Pro et à l'automate iPhase C-11 Pro². (b) Certaines expériences ont été réalisées plusieurs fois (n = nombre de radiosynthèses pour une condition)

Les conditions de radiométhylation étant optimisées, l'automatisation a été poursuivie par la purification par HPLC semi-préparative (Figure 35) suivie d'une étape de formulation sur cartouche Sep-pak C-18 (Waters) dans un mélange éthanol/sérum physiologique (ratio 1:4). Le radiotraceur [¹¹C]47 a été finalement obtenu sous forme de solution injectable en 45 minutes de synthèse.

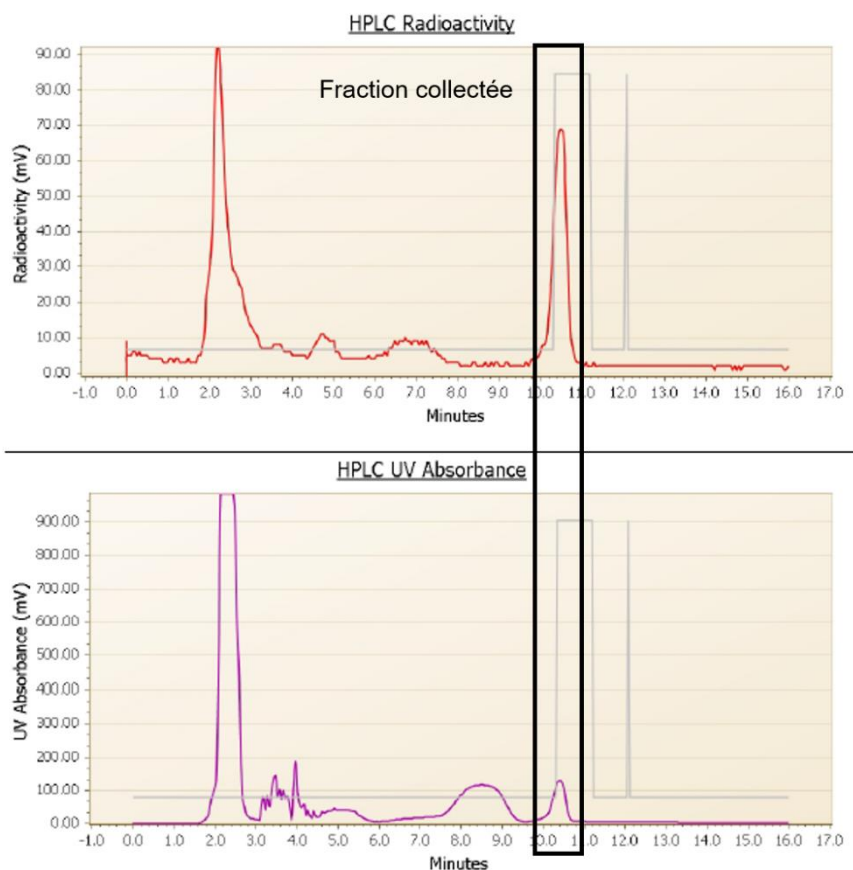


Figure 35. Chromatogrammes radioactif (haut) et UV (bas) de la purification de [¹¹C]47 par HPLC semi-préparative sur automate iPhase C-11 Pro².

Les analyses de contrôle qualité par HPLC analytique ont permis de confirmer l'identité du radiotraceur obtenu (Figure 36) ainsi que sa pureté chimique et radiochimique. Les conditions optimales de radiosynthèse ont permis l'obtention de [¹¹C]47 avec un rendement de $19,7 \pm 3,5$ % (n = 14) corrigé de la décroissance, avec une pureté radiochimique supérieure à 99 % et une activité molaire de $40,9 \pm 23,3$ GBq/ μ mol.

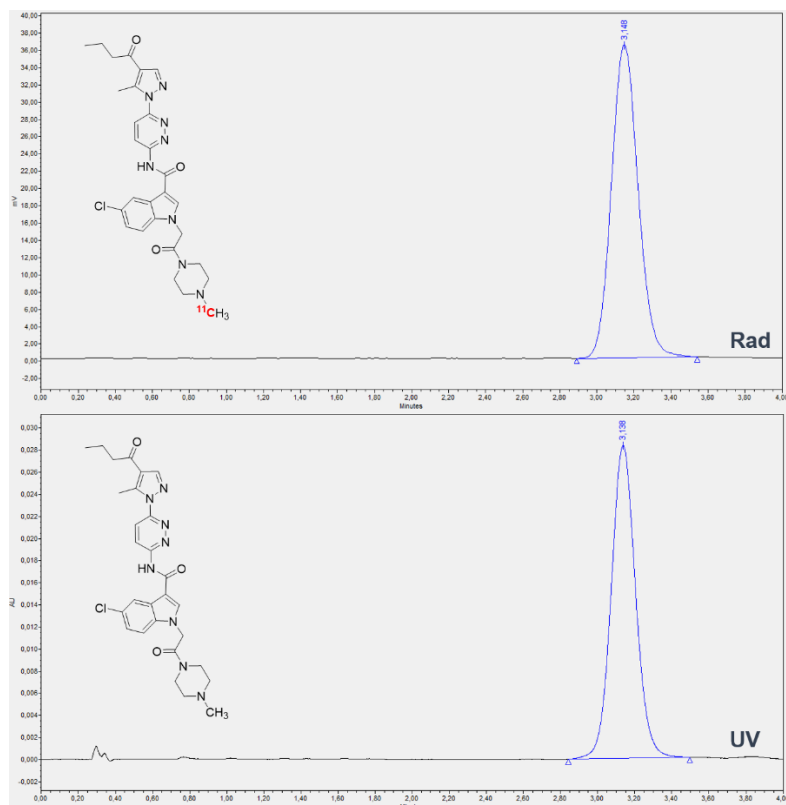


Figure 36. Chromatogrammes analytiques du composé [¹¹C]47 radiomarqué (haut) avec détection γ et 47 froid (bas) avec détection UV.

IV.3. Radiomarquage au fluor 18

Le radiomarquage du composé [¹⁸F]54 a été mis au point sur un automate Trasis AllInOne[®] (Schéma 39).

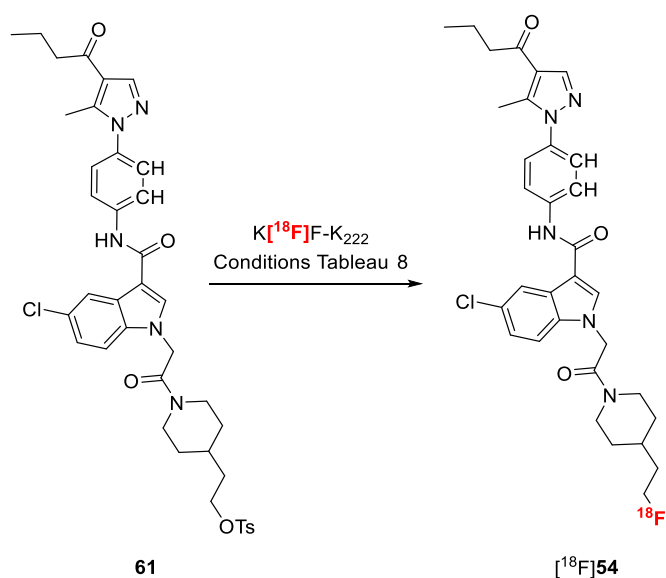


Schéma 39. Radiofluorination du composé 61.

Plusieurs conditions de radiomarquage du précurseur tosylé **61** par le complexe K[¹⁸F]F-K₂₂₂ ont été évaluées et les conversions ont été déterminées par radio-CCM (Tableau 8). Ces optimisations ont toutes été réalisées avec 2 mg de précurseur, soit 2.7 μmoles par condition. Dans un premier temps, le marquage a été étudié dans le DMSO à différentes températures, cependant les conversions obtenues par radio-CCM ont été très faibles (entrées 1, 2 et 3). Le changement de solvant par l'acétonitrile a permis d'augmenter la conversion (entrées 4-7). Le marquage à 90°C pendant 10 minutes (entrée 6) a permis d'obtenir la meilleure conversion à hauteur de 20 % (Figure 37).

Tableau 8. Essais de fluoration du composé 61.

Entrée	Solvant	Température (°C)	Temps (min)	Conversion (%)
1	DMSO	90	10	4
2	DMSO	120	10	3
3	DMSO	130	10	2
4	ACN	70	10	16
5	ACN	80	10	15
6	ACN	90	10	20
7	ACN	100	10	dégradation

L'essai à 100 °C n'a pas permis d'améliorer la conversion (entrée 7). La radio-CCM correspondante a montré qu'un pic large avec un épaulement et de faible intensité a été détecté (Figure 37). Cet épaulement semble démontrer la présence d'un deuxième produit radioactif qui est sûrement dû à la dégradation du précurseur **61**.

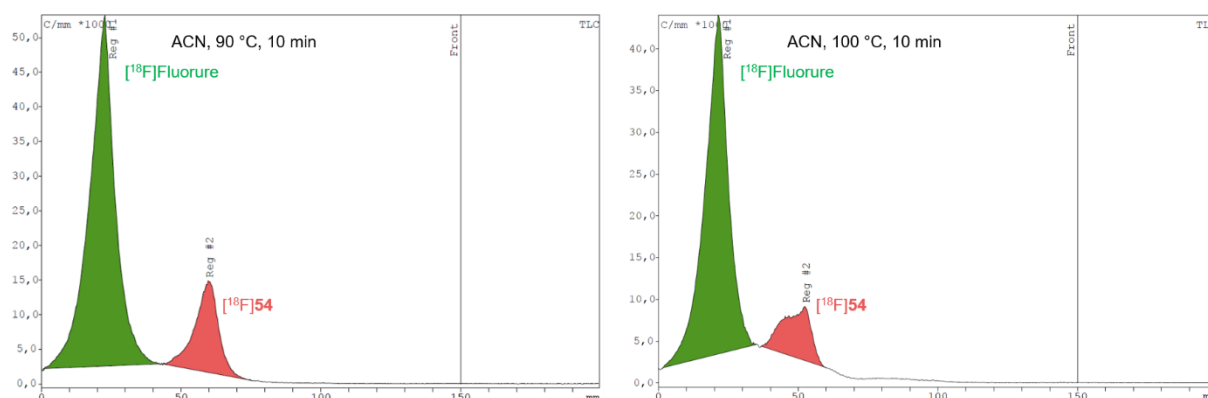


Figure 37. Radio-CCM du brut réactionnel de la radiofluoruration du composé 61.

Après avoir mis au point les conditions de radiomarquage, le processus a été automatisé et des étapes de purification par HPLC semi-préparative (Figure 38) et de reformulation sur cartouche Sep-pak C-18 (Waters) ont été développées. Le composé [¹⁸F]54 pur et en solution dans l'éthanol a ainsi été obtenu en 60 minutes de synthèse.

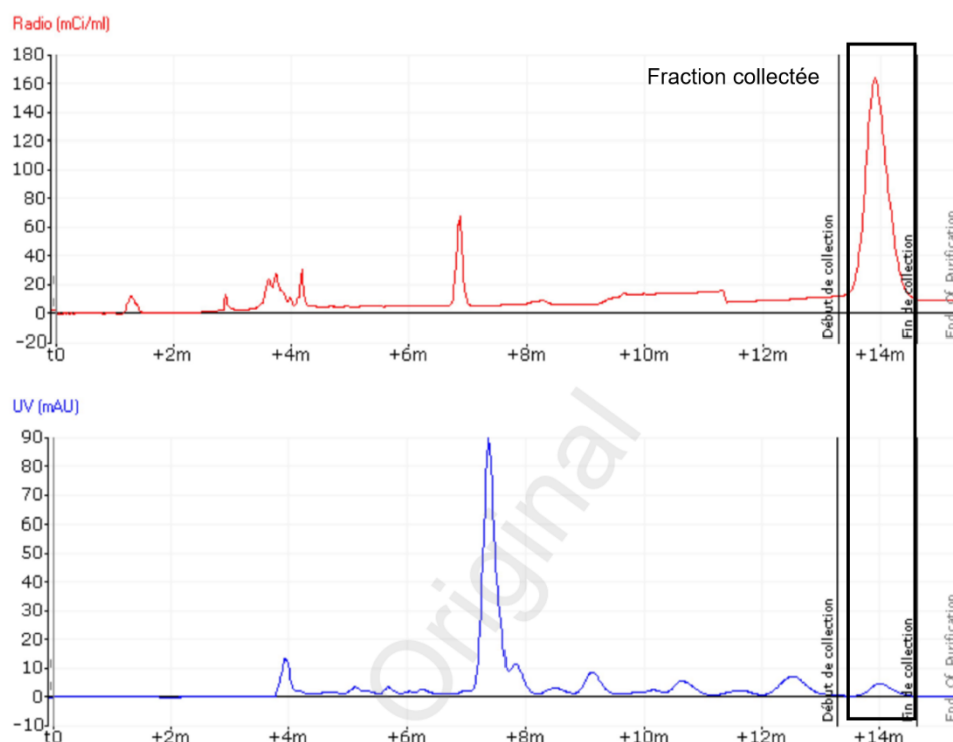


Figure 38. Chromatogrammes (rad en haut et UV en bas) de la purification de [¹⁸F]54 par HPLC semi-préparative sur automate Trasis AllinOne.

Les analyses de contrôle qualité par HPLC analytique ont permis de confirmer l'identité du radiotraceur obtenu (Figure 39) ainsi que sa pureté chimique et radiochimique. Les conditions optimales de radiosynthèse ont ainsi permis l'obtention de [¹⁸F]54 avec un rendement de 16,6 % ± 5,0 (n = 3) corrigé de la décroissance, avec une pureté radiochimique supérieure à 99 % et une activité molaire de 51,3 ± 38,4 GBq/μmol.

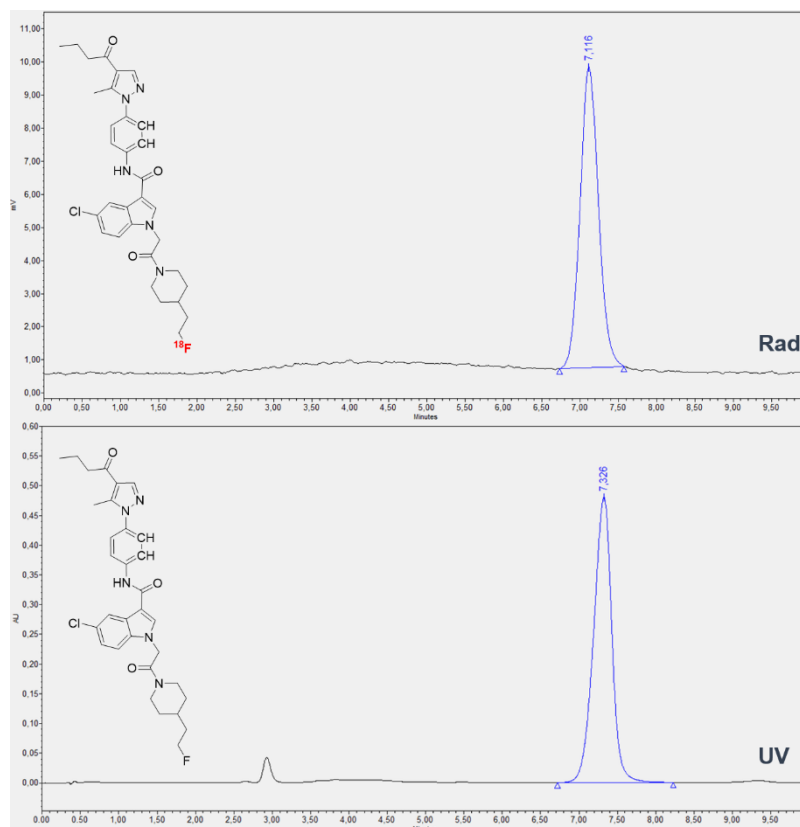


Figure 39. Chromatogrammes analytiques du composé [¹⁸F]54 radiomarqué (haut) avec détection gamma et 54 froid (bas) avec détection UV.

V. Évaluation des composés radiomarqués

V.1. Modèle animal

Une collaboration avec le laboratoire des maladies neurodégénératives (LMN) du CEA MIRCEN (Dr. Van Camp et Dr. Bemelmans) a été mise en place pour l'évaluation biologique des composés ciblant P2Y₁₂. Ils ont développé un modèle animal (rat) surexprimant de manière unilatérale les récepteurs P2Y₁₂ humains dans le cerveau. Pour cela, un virus adéno-associé (AAV) a été obtenu suite à la transfection de cellules avec trois plasmides : un plasmide contenant le génome recombinant du AAV des récepteurs P2Y₁₂ humains, un plasmide helper et un plasmide contenant les informations pour la réplication et de la formation de la capsid du virus (Figure 40-A). Cette transfection a été faite dans des cellules HEK293T qui sont des cellules embryonnaires rénales humaines. Ces cellules ont alors permis l'expression et l'amplification des particules virales, qui ont ensuite été récupérées puis purifiées. Le virus purifié a été ensuite injecté par stéréotaxie intra-cérébrale dans le striatum de l'hémisphère droit (côté ipsilatéral) du cerveau du rat. Le côté gauche du cerveau sert ainsi de contrôle (il est aussi appelé côté contralatéral).

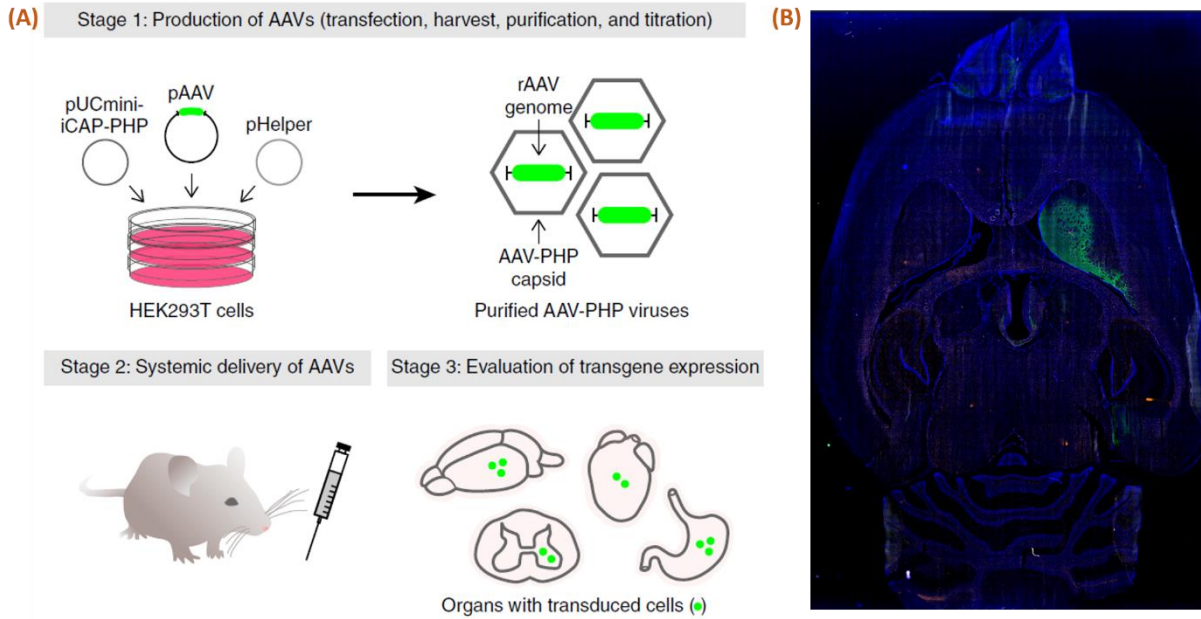


Figure 40. (A) Présentation générale du protocole pour la préparation du modèle animal AAV-*hP2Y₁₂* (B) Coupe IHC d'un cerveau de rat AAV-*hP2Y₁₂* (DAPI : bleu, *hP2Y₁₂* : vert, CD11b : orange)¹⁷¹.

Pour vérifier l'expression des récepteurs *hP2Y₁₂*, des coupes de cerveaux du modèle animal ont été contrôlées par immunohistochimie (IHC). Dans un premier temps, un anticorps anti P2Y₁₂ de lapin a été mis en contact avec les coupes de cerveau afin qu'il se fixe sur les récepteurs P2Y₁₂. Après lavage et élimination de l'anticorps non lié aux récepteurs, un second anticorps couplé à un fluorophore et reconnaissant le premier anticorps a été introduit. L'analyse par microscope a démontré une forte densité de récepteurs P2Y₁₂ au niveau de la zone d'injection du virus (Figure 40-B, coloration verte). On constate également que l'hémisphère gauche du cerveau (côté contralatéral) n'a pas été touché par l'injection puisqu'on ne voit pas de surexpression de P2Y₁₂ de ce côté, il peut donc servir de contrôle négatif. La coloration au 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI, en bleu sur la coupe IHC), qui est un marqueur de noyau cellulaire, sert à définir les différentes zones de la coupe de cerveau.

V.2. Autoradiographies sur coupes de cerveaux

V.2.1. Composé marqué au carbone 11

Le composé [¹¹C]47 a été testé par autoradiographie sur différentes coupes de cerveaux de rats. Tout d'abord, des autoradiographies ont été effectuées sur le modèle AAV-*hP2Y₁₂*. Les résultats obtenus ont montré que le composé [¹¹C]47 semble s'être fixé mais de manière non spécifique car il n'y a pas de différences d'intensité entre les côtés ipsi- et contralatéral (Figure 41). Cependant, en présence d'un excès de la référence froide 47 (20 μM), une extinction du signal à hauteur de 30 % a été observée.

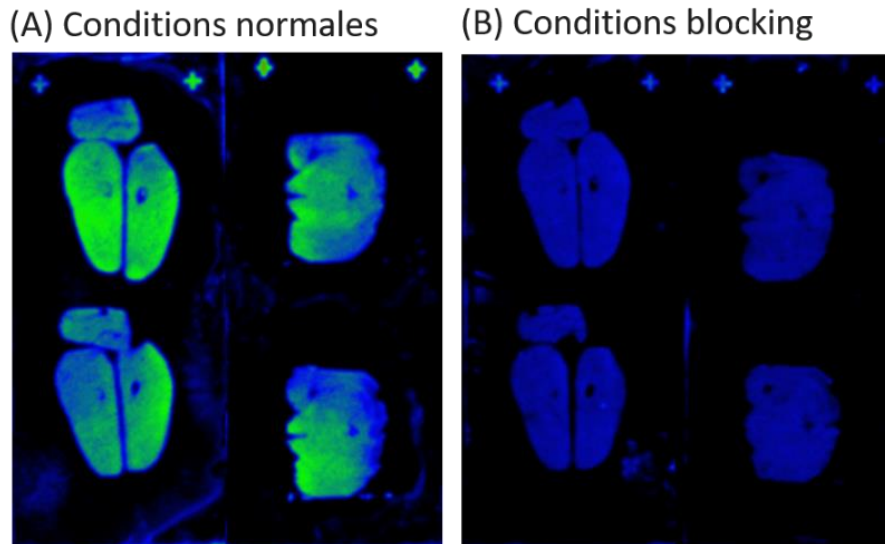


Figure 41. Autoradiographies des coupes de rat AAV-hP2Y₁₂ (A) Incubation avec le radiotraceur [¹¹C]47 (115 MBq) ; (B) Incubation avec le radiotraceur [¹¹C]47 (110 MBq) et la référence froide à 20 μM.

D'autres autoradiographies ont été réalisées sur des coupes de cerveaux d'un modèle de sclérose en plaques (modèle LPC développé par le Dr. Chauveau, CRNL).¹⁷² Ce modèle induit une démyélination au niveau du site d'injection de lysophosphatidylcholine (LPC) et présente également un côté sain (contralatéral). Pour vérifier la neuroinflammation induite, ces coupes ont été incubées avec le [¹⁸F]DPA-714, un marqueur connu de la neuroinflammation. On a bien observé une augmentation du signal dans les zones où il y a eu l'injection de LPC du côté ipsilatéral, c'est-à-dire les zones démyélinisées (Figure 42, zones entourées en rouge).

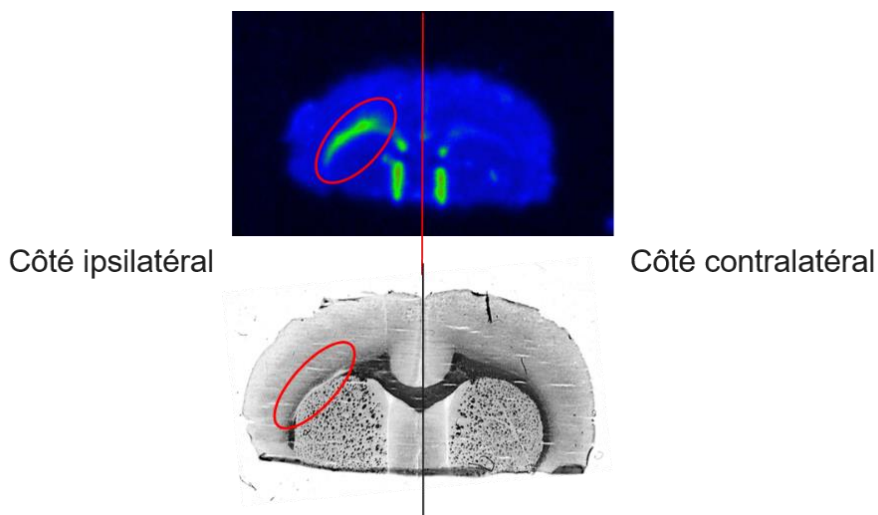


Figure 42. Autoradiographie de coupe de cerveau de rat LPC incubée avec le [¹⁸F]DPA-714

Dans ce modèle LPC, la microglie est à l'état activé et présente peu de ramifications, on s'attend donc à une faible expression des récepteurs P2Y₁₂. Le résultat attendu est une diminution du

signal au niveau des lésions en comparaison avec le côté contralatéral. Cependant, lorsque ces coupes ont été incubées avec le radioligand [¹¹C]47, nous n'avons pas observé de différences entre les côtés ipsi- et contralatéral (Figure 43). L'expérience avec un excès de molécule froide (conditions blocking) a démontré qu'il y avait une fixation du composé radiomarqué, puisque l'on a observé une diminution de 20 % du signal radioactif dans ces conditions.

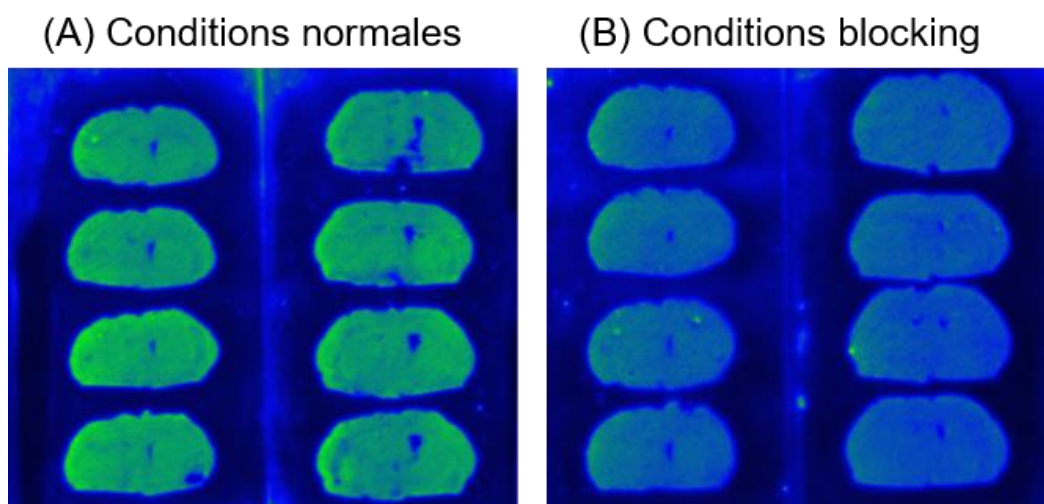


Figure 43. Autoradiographies de coupes de cerveaux de rat LPC (A) Incubation avec le radiotraceur [¹¹C]47 ; (B) Incubation avec le radiotraceur [¹¹C]47 en présence d'un excès de référence froide 47 (20 μ M).

Globalement, les résultats obtenus ont montré que le traceur [¹¹C]47 se fixe de manière uniforme sur les coupes de cerveau. Cela semble démontrer que, même si le composé se fixe probablement sur les récepteurs P2Y₁₂ (au vu de l'affinité déterminée *in vitro*), il se fixe également sur une ou plusieurs autres cibles, qui n'ont pas été identifiées. Le traitement des coupes avec le radiotraceur et un excès de référence froide a montré que le signal était déplacé sur l'ensemble des coupes. Ce déplacement en conditions de blocking prouve également qu'il y a bien une fixation du traceur pour une ou plusieurs cibles, qui peuvent être le récepteur P2Y₁₂ et une ou plusieurs cibles non déterminées.

V.2.2. Composé radiomarqué au fluor 18

Différentes expériences d'autoradiographie ont été menées avec le radioligand [¹⁸F]54 : des expériences directes par incubation de coupes de cerveaux surexprimant P2Y₁₂ avec [¹⁸F]54 et des expériences indirectes par déplacement du ligand tritié [³H]PSB-22219 par le composé 54 sur les mêmes coupes de cerveaux.

Le radioligand [¹⁸F]54 a été testé par autoradiographie sur des coupes de cerveaux du modèle animal AAV, surexprimant les récepteurs *h*P2Y₁₂ sur un hémisphère du cerveau (Figure 44-A) (côté ipsilatéral). Comme pour le traceur [¹¹C]47, aucune différence entre les côtés ipsi- et

contralatéral n'a été observée. Une expérience de blocking avec la molécule froide a été réalisée et a démontré qu'il y avait une fixation du traceur puisque le signal a diminué dans ces conditions (Figure 44-B).

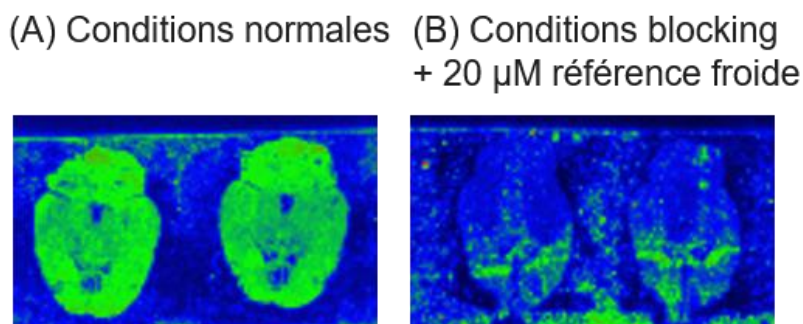


Figure 44. Autoradiographies des coupes de rat AAV-hP2Y₁₂ (A) Incubation avec le radiotraceur [¹⁸F]54 ; (B) Incubation avec le radiotraceur [¹⁸F]54 et la référence froide à 20 μ M.

La référence froide **54** a également été évaluée indirectement par autoradiographie sur des coupes de cerveaux de modèle animal surexprimant les récepteurs hP2Y₁₂. Pour cette expérience, les coupes de cerveaux ont préalablement été incubées avec le ligand tritié [³H]PSB-22219 (Figure 45-A). On voit clairement le signal et donc la surexpression des récepteurs P2Y₁₂ du côté ipsilatéral dans le cas du ligand [³H]PSB-22219 seul. En présence d'un excès de **54**, on a observé une extinction de 70 % du signal dû au ligand [³H]PSB-22219, ce qui démontre la capacité de fixation de **54** sur les récepteurs P2Y₁₂ (Figure 45-B).

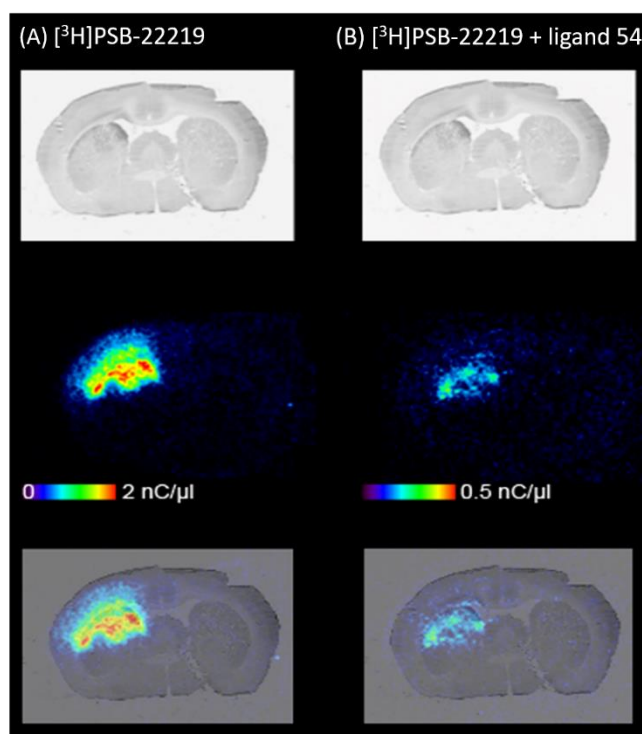


Figure 45. Autoradiographies de [³H]PSB-22219 seul (A) et en présence de **54** à 1 μ M (B).

Les résultats des autoradiographies sont similaires à ceux obtenus pour la molécule [¹¹C]47. Le traceur [¹⁸F]54 se fixe sur différentes cibles et notamment sur les récepteurs P2Y₁₂, comme le démontre le déplacement du signal du ligand [³H]PSB-22219 en présence de la référence froide 54. Cependant, cette fixation ne semble pas spécifique aux récepteurs P2Y₁₂.

V.3. Imagerie TEP

En parallèle aux expériences d'autoradiographie menées sur les coupes de cerveaux de modèles animaux, le composé a été évalué *in vivo*, afin d'étudier sa métabolisation et le passage de la BHE.

V.3.1. Composé méthylé [¹¹C]47

L'imagerie *in vivo* du composé [¹¹C]47 a été effectuée dans un premier temps sur des rats sains. Sur les images TEP obtenues (Figure 46), le signal observé dans le cerveau est très faible, indiquant que le composé passe difficilement la BHE. De plus, le signal observé sur les images correspond à la circulation sanguine autour du cerveau. En effet, le signal a été légèrement plus important sur les dix premières minutes que pour le reste de l'examen TEP (Figure 46-comparer A et B).

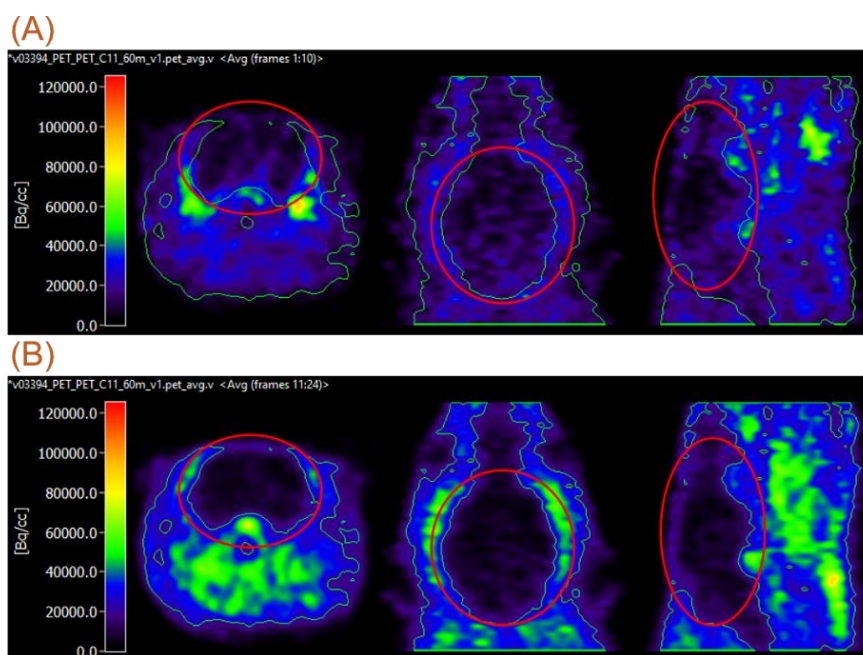


Figure 46. Images microTEP des coupes coronale, transversale et sagittale d'un cerveau de rat sain injecté avec le composé [¹¹C]47 (zone entourée rouge = cerveau). (A) Acquisition de 0 à 10 minutes après injection (B) Acquisition du signal de 10 à 60 minutes après injection.

Le composé [¹¹C]47 a aussi été évalué *in vivo* sur le modèle animal AAV-hP2Y₁₂ (Figure 47). Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus chez le rat sain, le composé ne passe que

très peu la BHE et la différence entre les côtés contra- et ipsilatéral n'est pas visible. Il n'y a pas d'accumulation spécifique du radiotraceur au niveau du côté ipsilatéral où sont surexprimés les récepteurs *hP2Y₁₂*. On observe seulement un peu de signal au niveau des ventricules, zones très vascularisées du cerveau.

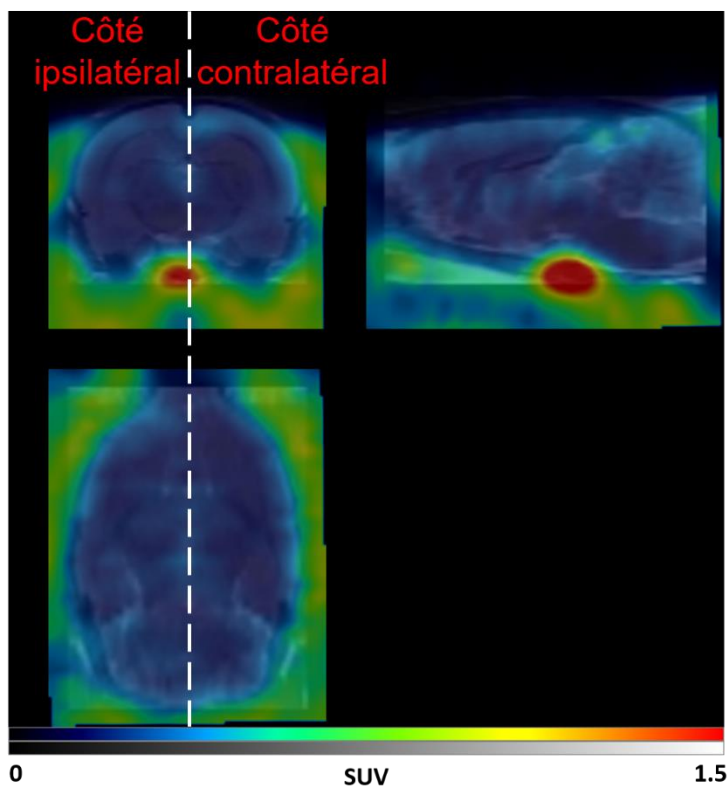


Figure 47. Images microTEP des coupes coronale, transversale et sagittale d'un cerveau de rat surexprimant P2Y₁₂ injecté avec le composé [¹¹C]47 (26.8 MBq) avec un temps d'acquisition de 60 minutes.

Pour expliquer la faible concentration de traceur dans le cerveau, une première hypothèse est que [¹¹C]47 soit substrat d'un transporteur se trouvant au niveau de la BHE. L'un de ces transporteurs est la glycoprotéine-P (P-gp), une protéine transmembranaire de la membrane plasmique. Elle est très étudiée car elle a été mise en cause dans le phénomène de multirésistance aux médicaments. Elle est retrouvée dans divers tissus du corps et notamment au niveau de la BHE car elle sert de filtre pour éviter l'entrée de tous types de composés dans le cerveau. Pour bloquer ce phénomène de filtrage et permettre au radioligand [¹¹C]47 de traverser la BHE, le tariquidar, un inhibiteur spécifique de la P-gp a été utilisé.

Une expérience TEP a donc été réalisée avec une injection de tariquidar 30 minutes avant l'injection du radiotraceur et de l'acquisition des images TEP chez le rat sain et chez le modèle AAV (Figure 48). Sur les images TEP obtenues, le signal semble un peu plus important dans le

cerveau comparé aux images sans injection de tariquidar, que ce soit pour le rat sain ou le modèle AAV.

Ceci se confirme avec les courbes temps/activité qui moyennent l'activité dans le cerveau durant l'acquisition (Figure 48). En effet la courbe correspondant à l'expérience avec tariquidar montre que la radioactivité dans le cerveau est légèrement plus importante que sans tariquidar : SUV_{max} : 0,35 contre SUV_{max} : 0,30 chez le rat sain (Figure 48-A) et SUV_{max} : 0,36 contre SUV_{max} : 0,30 chez le modèle AAV (Figure 48-B). De plus, chez le rat sain, il pourrait y avoir une légère accumulation du traceur au vu du calcul de la différence d'aire sous la courbe (Figure 48-A). Cependant, ces courbes révèlent aussi que le composé possède un temps de résidence faible dans le cerveau et celui-ci est majoritairement éliminé au bout d'une dizaine de minutes.

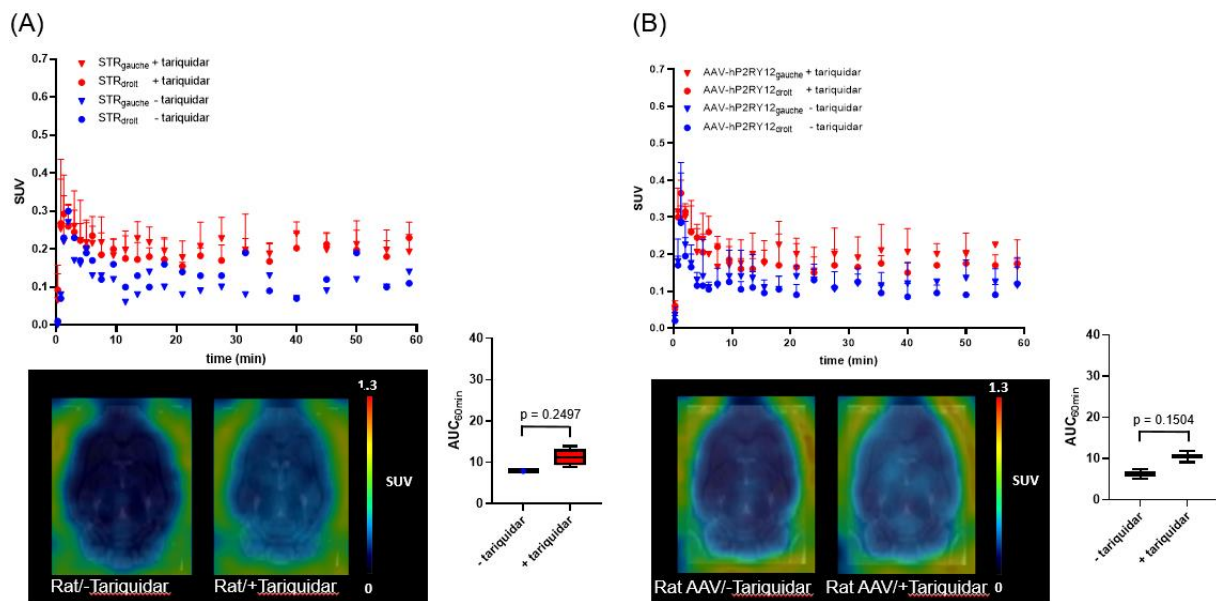


Figure 48. Images TEP et courbes temps activité du traceur [¹¹C]47 en absence et présence de tariquidar dans le striatum chez le rat sain (A, n = 3) et chez le modèle animal AAV (B, n = 1 sans tariquidar et n = 2 avec tariquidar).

Enfin, pour évaluer l'influence de l'espèce animale considérée sur le passage de la BHE, le radioligand [¹¹C]47 a aussi été évalué *in vivo* chez le singe (*Macaca fascicularis*). En effet, la différence de densité de transporteurs entre les espèces pourrait interférer avec le passage de la BHE. Les résultats obtenus n'ont pas validé cette hypothèse et le composé [¹¹C]47 n'a été que faiblement détecté dans le cerveau (Figure 49-A). Seule une faible quantité de radiotraceur traverse la BHE (SUV_{max} : 0,9) et l'élimination de ce dernier est très rapide (Figure 49-B)

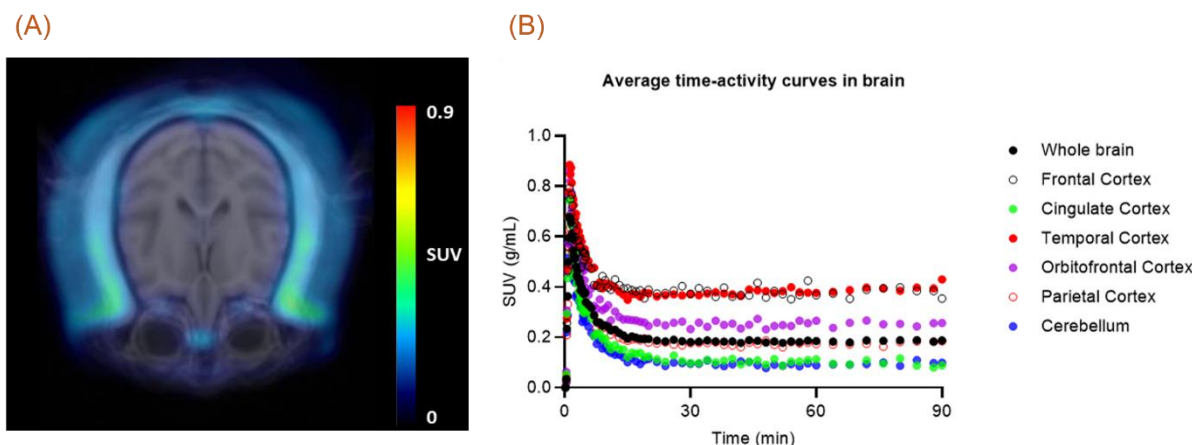


Figure 49. Image TEP d'un cerveau de singe injecté avec le composé [¹¹C]47 (223.6 MBq/kg) avec un temps d'acquisition de 90 minutes (A) ; Courbes temps-activité du composé [¹¹C]47 de tout le cerveau et par zones (B).

V.3.2. Composé radiofluoré [¹⁸F]54

L'analogue fluoré [¹⁸F]54 a lui aussi été évalué *in vivo* chez l'animal sain et dans le modèle animal AAV-*hP2Y₁₂*. Les résultats ont également montré que le composé [¹⁸F]54 traverse peu la BHE et le faible signal observé dans le cerveau se retrouve au niveau des ventricules (Figure 50). Ce composé a également été évalué en présence de tariquidar chez le rat sain et le modèle AAV. Le prétraitement au tariquidar a permis d'augmenter légèrement l'accumulation de la radioactivité dans le cerveau, cependant, il n'y a pas de signal observé spécifiquement dans la zone ipsilatérale du cerveau où les récepteurs sont surexprimés.

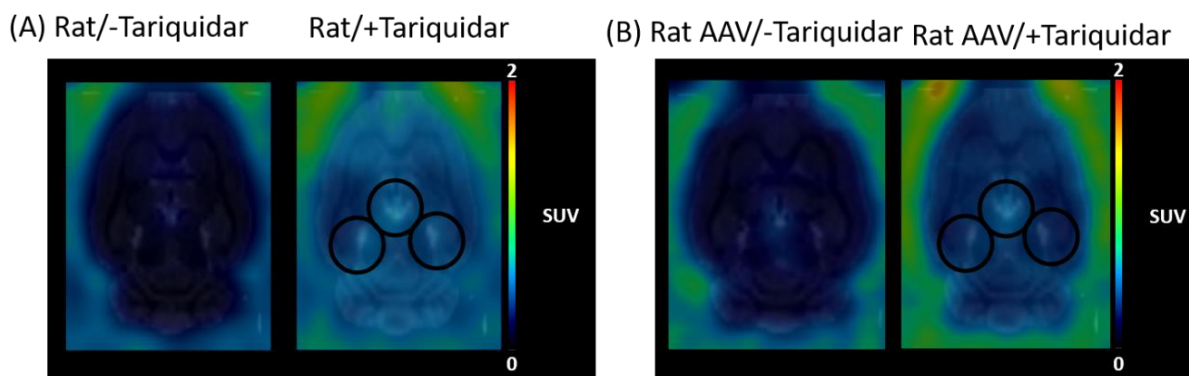


Figure 50. Images microTEP des coupes coronale, transversale et sagittale d'un cerveau de rat sain prétraité ou non avec le tariquidar (A), et de rat surexprimant P2Y₁₂ injecté avec le composé [¹⁸F]54 (56.7 MBq-B) avec un temps d'acquisition de 60 minutes (zones entourées = ventricules).

Les courbes temps/activités obtenues suite aux expériences TEP ont permis de constater qu'en présence de tariquidar, on observe une meilleure pénétration du traceur ainsi qu'une légère accumulation. Chez le rat sain, on observe une SUV_{max} de 0,4 chez l'animal prétraité au

tariquidar contre une SUV_{max} de 0,1 chez l'animal non traité à 60 minutes (Figure 51-A). Dans le modèle AAV prétraité au tariquidar, on observe une SUV_{max} de 0,45 au début de l'acquisition puis une baisse avant d'observer de nouveau une accumulation de la radioactivité avec une SUV autour de 0,3 à 60 min (Figure 51-B). Pour le rat AAV non prétraité au tariquidar, la SUV_{max} est de 0,4 au début de l'acquisition mais passe à 0,1 après 60 minutes. Cela n'a pas permis d'obtenir une accumulation dans le cerveau suffisante pour différencier les côtés ipsi- et contralatéral. Une hypothèse émise est que le composé a peut-être une affinité importante pour les récepteurs natifs des rats utilisés, ce qui ne permet pas de mettre en évidence la surexpression des récepteurs humains du modèle AAV.

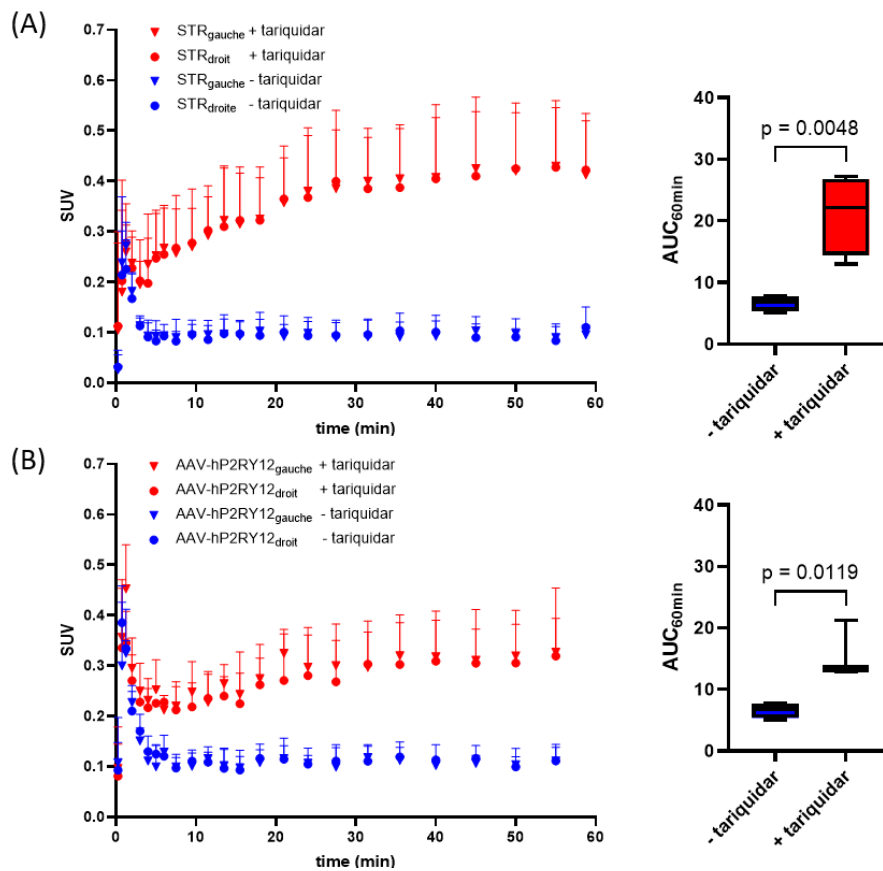


Figure 51. Courbes temps activité du traceur [¹⁸F]54 en absence et présence de tariquidar dans le striatum chez le rat sain (A) et chez le modèle animal AAV (B).

V.4. Biodistribution des traceurs

Une évaluation de la biodistribution *ex vivo* des traceurs [¹¹C]47 et [¹⁸F]54 a été réalisée par injection sur des animaux sains.

V.4.1. Radioligand [¹¹C]47

La molécule [¹¹C]47 a été injectée chez le rat sain par voie intraveineuse, puis les animaux ont été sacrifiés et le sang et leurs organes ont été prélevés pour comptage par un compteur γ à

différents temps après injection (5, 15, 30 et 60 minutes-Figure 52). Après 5 minutes d'injection, la radioactivité se retrouve principalement dans les organes d'élimination comme le foie (3,14 %ID/g) et le rein (1,67 %ID/g) et diminue avec le temps (respectivement 1,83 %ID/g et 0,90 %ID/g à 60 min après l'injection). Cette tendance est inversée dans les intestins avec une augmentation de la concentration de la radioactivité avec le temps (0,69 %ID/g à 5 min après injection à 2,26 %ID/g à 60 min après injection), ce qui suggère une élimination hépato-biliaire du composé et possiblement une élimination rénale des radiométabolites plus polaires. On remarque aussi que la concentration du traceur est élevée dans les poumons 5 minutes après injection (3,78 %ID/g) et diminue avec le temps. La radioactivité est aussi retrouvée dans le cœur, la rate, le pancréas et l'estomac. Dans le cerveau, la concentration de la radioactivité est très faible avec seulement 0,06 %ID/g 60 minutes après injection. Ceci démontre que le composé [¹¹C]47 a des difficultés à traverser la BHE comme cela avait déjà été observé lors de l'imagerie TEP. De manière générale, le traceur a été rapidement distribué dans tout le corps avec une élimination hépato-biliaire préférentielle.

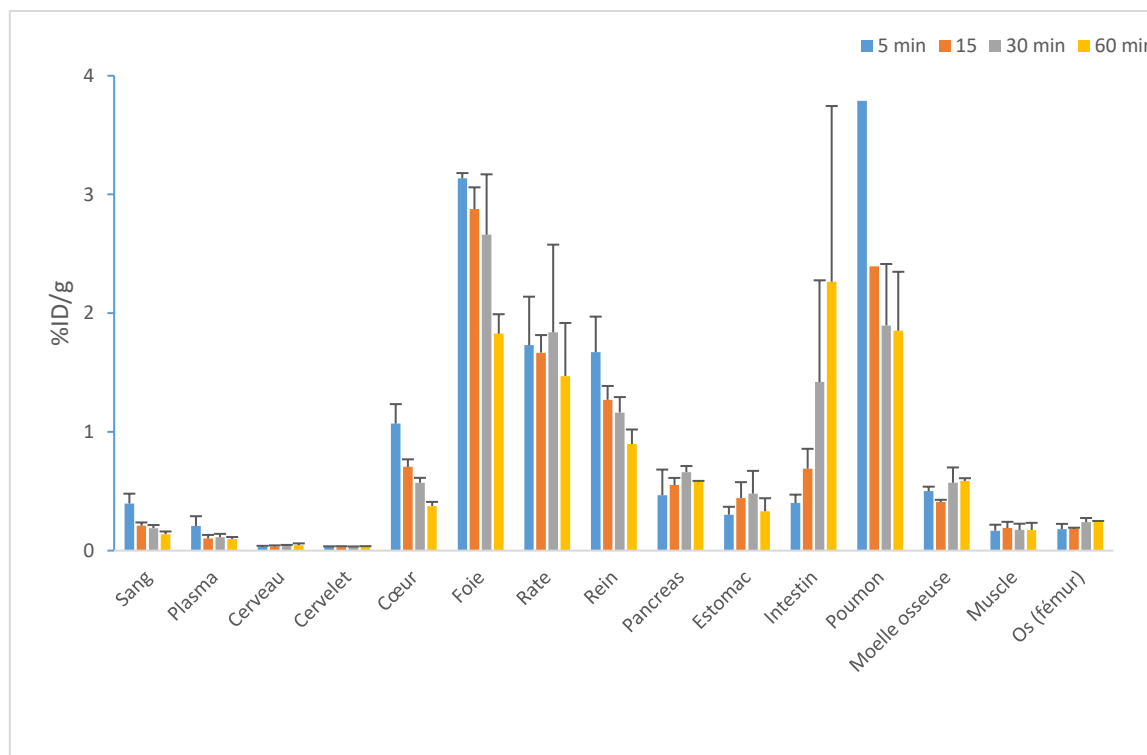


Figure 52. Biodistribution ex vivo de la molécule [¹¹C]47 chez le rat à 5, 15, 30 et 60 minutes après injection (n =3/temps d'injection).

V.4.2. Radioligand [¹⁸F]54

Pour le composé [¹⁸F]54, une étude de biodistribution a été réalisée dans les mêmes conditions (Figure 53). Une première observation est que la concentration de la radioactivité est très importante dans le foie 5 minutes après l'injection et que cette proportion diminue avec le temps

(3,4 %ID/g à 5 min puis 2,1 %ID/g à 60 min). La tendance inverse est observée dans les intestins : il y a peu de radiotraceur après 5 minutes et la proportion augmente avec le temps (0,3 %ID/g 5 min après injection puis 2,9 %ID/g 60 min après injection). Les profils de ces deux organes suggèrent une élimination hépato-biliaire du radiotraceur. L'élimination par le rein est aussi observée avec une quantité décroissante de radioactivité avec le temps (1,1 %ID/g 5 min après injection puis 0,5 %ID/g 60 min après injection) qui pourrait correspondre à l'élimination des radiométabolites polaires. De plus, la quantité de radioactivité dans les os est similaire à celle observée dans les muscles avec une valeur d'environ 0,2 %ID/g et ne varie pas au cours du temps. Le [¹⁸F]54 ne semble donc pas subir de réaction de défluorination, qui impliquerait une accumulation de fluor-18 dans les os. On peut également constater que la concentration de la radioactivité dans le cerveau est très faible, passant de 0,032%ID/g après 5 minutes d'injection à 0,02%ID/g après 60 minutes d'injection.

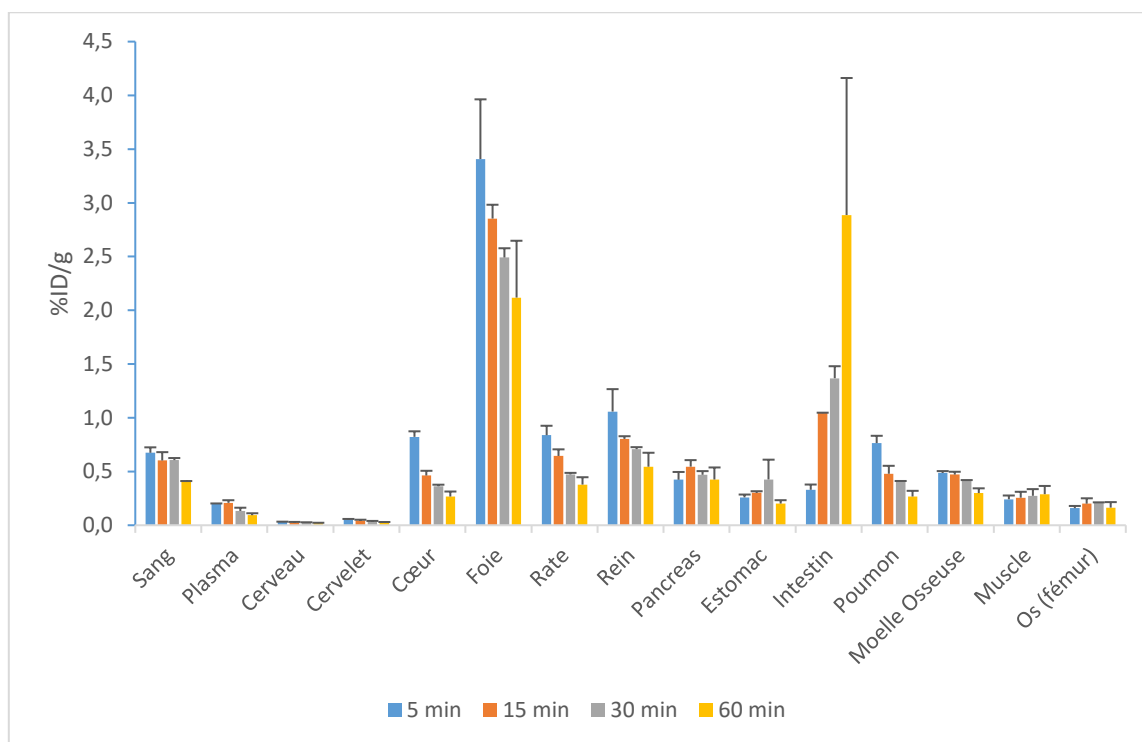


Figure 53. Biodistribution de la molécule [¹⁸F]54 chez le rat à 5, 15, 30 et 60 minutes après injection.

Le rapport cerveau sur plasma du pourcentage de dose injectée par gramme a été calculé pour les quatre différents temps (Figure 54). Ce ratio est très faible, largement inférieur à 1, ce qui est en accord avec la faible concentration de radioactivité observée dans le cerveau. De plus, la concentration de radioactivité dans le cerveau diminue avec le temps (0,16 %ID/g à 5 min puis 0,10%ID/g à 60 min après injection). Ceci suggère que le traceur ne s'accumule pas dans le cerveau et qu'il ne peut donc pas se fixer aux récepteurs d'intérêt.

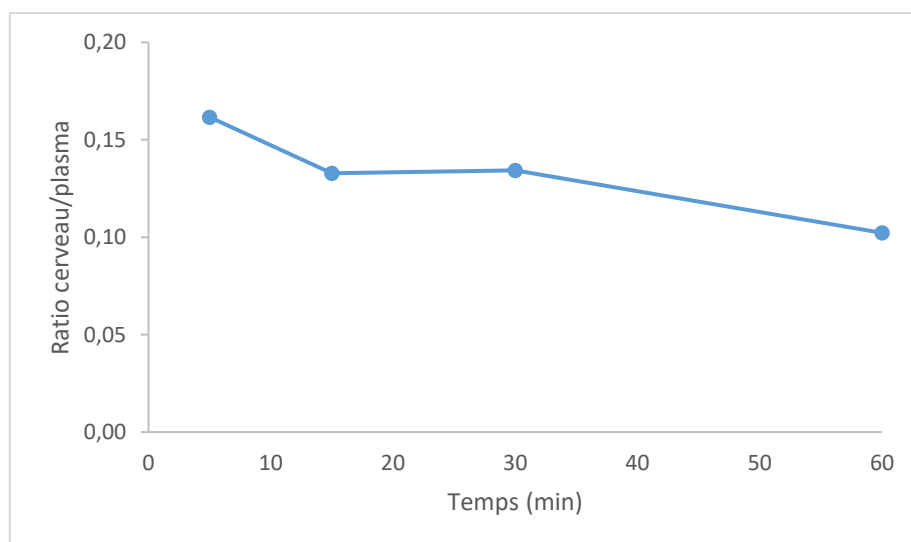


Figure 54. Ratio %ID/g cerveau/ %ID/g plasma de la radioactivité après injection du traceur [¹⁸F]54 à 5, 15, 30 et 60 minutes.

Les résultats de la biodistribution du radioligand [¹⁸F]54 sont en accord avec les résultats obtenus en imagerie TEP *in vivo*. Malgré la bonne affinité de ce ligand pour les récepteurs P2Y₁₂, celui-ci n'est pas en mesure de traverser suffisamment la BHE pour obtenir un signal significatif en imagerie TEP.

V.5. Métabolisme *in vivo* du composé marqué au fluor-18

Le métabolisme *in vivo* du composé [¹⁸F]54 a été évalué sur des animaux sains. La molécule [¹⁸F]54 a été injectée chez le rat sain par voie intraveineuse, puis les animaux ont été sacrifiés et le sang et le cerveau ont été prélevés à différents temps après injection (5, 15, 30 et 60 minutes). Le plasma a été récupéré après centrifugation du sang. Pour cela, les extraits ont été injectés et analysés par radio-HPLC. Les résultats obtenus dans le plasma ont démontré la présence de quatre radiométabolites ([¹⁸F]M1 à [¹⁸F]M4), plus polaires que le [¹⁸F]54. Le traceur [¹⁸F]54 était encore intact à hauteur de 41 % 60 minutes après l'injection (Figure 55-A). Dans le cerveau, le traceur [¹⁸F]54 est bien détecté ainsi que deux radiométabolites ([¹⁸F]M2 et [¹⁸F]M3). Ici aussi, environ 40 % du traceur [¹⁸F]54 était encore intact 60 minutes après l'injection (Figure 55-B). La présence de ces deux radiométabolites dans le cerveau pourrait potentiellement engendrer un signal autre que celui du radiotraceur lors de l'imagerie TEP et donc une image faussée. Cependant, la concentration totale de radioactivité dans le cerveau reste très faible.

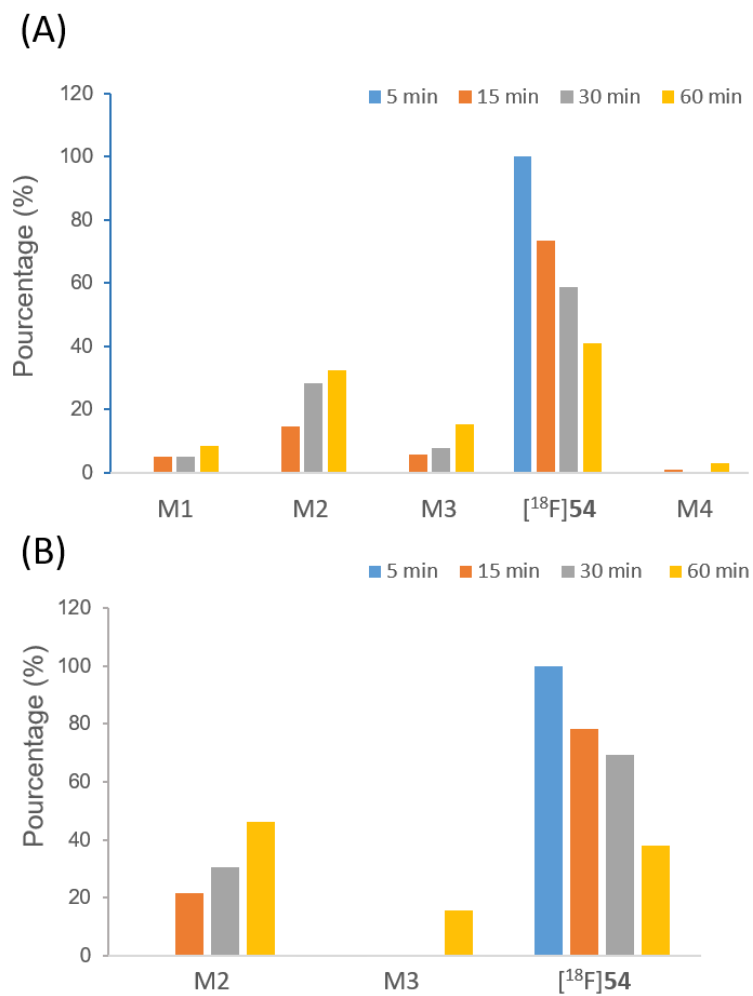


Figure 55. Profil métabolique in vivo du traceur [¹⁸F]54 dans le plasma (A) et dans le cerveau (B).

VI. Conclusions et perspectives

La synthèse d'une bibliothèque de molécules ciblant les récepteurs P2Y₁₂ a été réalisée. Huit références froides ont été synthétisées en 10 étapes de synthèses avec des rendements globaux allant de 3 % à 26 % (Figure 56).

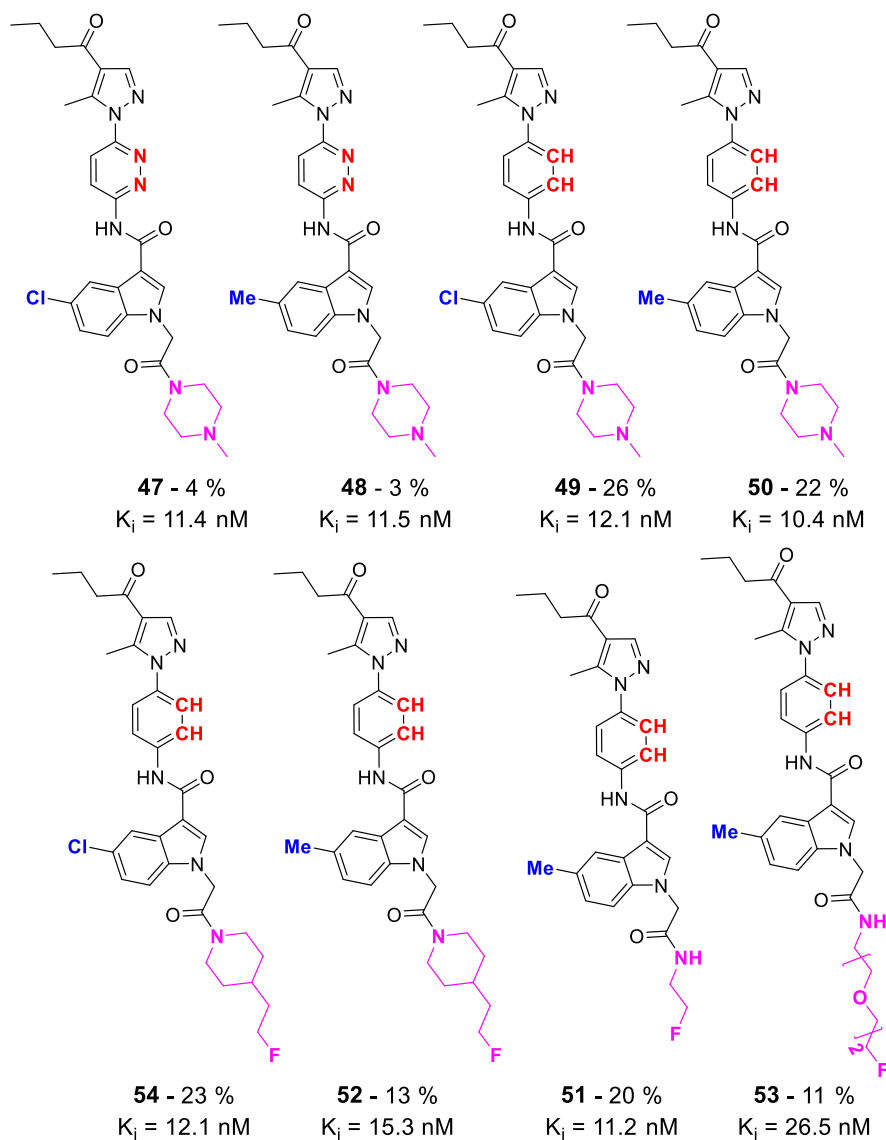


Figure 56. Ligands développés ciblant les récepteurs P2Y₁₂.

Ces huit références froides ont été évaluées *in vitro* pour déterminer leur affinité pour les récepteurs P2Y₁₂ et ont montré des constantes d'inhibition très intéressantes, entre 10 et 30 nM. Le métabolisme de ces ligands a été étudié *in vitro* et a permis de mettre en évidence des métabolites similaires, notamment dus à l'hydroxylation de la chaîne alkyle de la cétone ou sur le noyau indole et surtout au niveau du méthyle pour les composés comportant un 5-méthyle-indole. Pour les composés fluorés, la présence d'une chaîne PEG ainsi que d'une chaîne fluoroéthyle a engendré des métabolites défluorés. En considérant tous ces résultats *in vitro*,

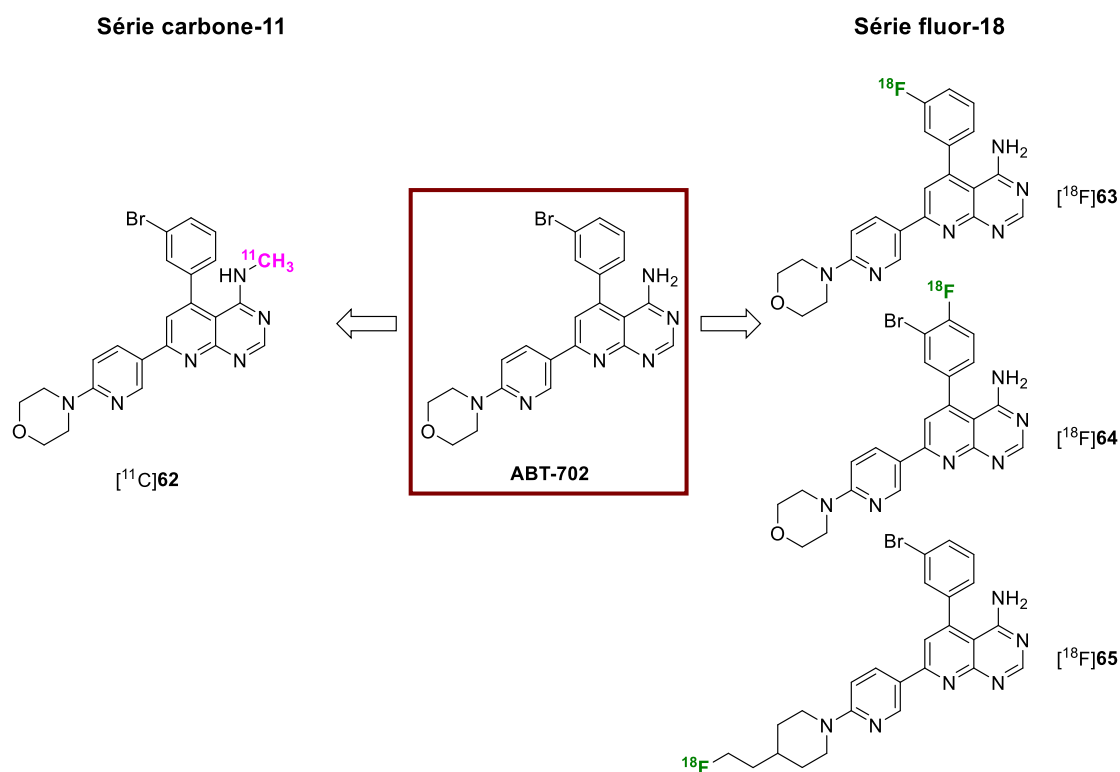
nous avons choisi les analogues **47** et **54** pour le radiomarquage au carbone-11 et au fluor-18. Après préparation des précurseurs de marquage correspondants, le radiomarquage de ces composés a été optimisé et automatisé afin d'obtenir [¹¹C]**47** et [¹⁸F]**54** purs et en solution injectable. Ces deux radiotraceurs ont été étudiés *in vitro* par autoradiographie et *in vivo* via injection chez l'animal sain ou chez un modèle animal présentant une surexpression des récepteurs P2Y₁₂ humains dans un hémisphère du cerveau. Les études de biodistribution *in vivo* ont montré que les composés [¹¹C]**47** et [¹⁸F]**54** étaient très peu retrouvés dans le cerveau et que ces derniers étaient rapidement éliminés par les organes de détoxification et d'élimination comme le foie, les reins et les intestins. Cette faible capacité de traverser la BHE a ensuite été confirmée avec l'imagerie TEP. L'ensemble de ces résultats amène à une conclusion relativement décevante quant à l'utilisation de ses composés comme outils de diagnostic pour la neuroinflammation. Aucun des deux radioligands n'a démontré de capacité de traverser la BHE. En comparaison avec le ligand [¹¹C]**1** développé par Villa *et al.*,¹²⁸ le traceur [¹⁸F]**54** présente une plus grande stabilité. Cependant, les propriétés de franchissement de la BHE sont similaires à celles observées pour les radioligands [¹¹C]**2** et [¹⁸F]**3**, dérivés de thiénoypyrimidines, développé par le groupe de Windhorst.¹³⁰ Il est donc nécessaire de changer de stratégie en cherchant de nouveaux motifs moléculaires affins pour les récepteurs P2Y₁₂ et ayant la capacité de traverser la BHE pour les utiliser pour le diagnostic et le suivi de la neuroinflammation en TEP.

Même si l'emploi de ces radiotraceurs pour imager des cibles neurologiques semble compromis, l'utilisation de ces composés pour des études en oncologie est envisageable. En effet, les récepteurs P2Y₁₂ jouent un rôle important dans l'activation plaquettaire et dans l'amplification de l'agrégation des plaquettes. Cette agrégation contribue au microenvironnement des cellules tumorales *via* la libération de molécules bioactives comme l'ADP, et favorise ainsi la progression de la tumeur.¹⁷³ En effet, l'activation des P2Y₁₂R favorise une interaction plaquettes-tumeurs qui est essentielle au développement de métastases et à l'angiogenèse tumorale. Cette interaction se fait *via* les microvésicules tumorales. Des études sur le cancer du pancréas ont par exemple démontré des phénomènes d'hypercoagulation que l'on peut apparenter au syndrome de Trousseau et qui correspondent à la formation de caillots sanguins localisés près des tumeurs. Les risques de thromboses veineuses qui en découlent sont à surveiller particulièrement car ils contribuent significativement à l'aggravation de la maladie et à la mortalité des patients. Une étude sur l'inhibition des récepteurs P2Y₁₂ dans ce contexte a montré une baisse des risques de thromboses ainsi qu'une diminution du développement des cellules cancéreuses au sein d'un modèle animal de cancer pancréatique.¹⁷⁴

Développement de radiotraceurs ciblant l'adénosine kinase

I. Conception de traceurs basés sur ABT-702

Comme nous l'avons vu dans la partie introductive de ce manuscrit, le composé **ABT-702** a été développé dans le but d'inhiber l'ADK pour augmenter la concentration intracellulaire en adénosine et être utilisé comme antiépileptique. D'après les données de la littérature, la molécule **ABT-702** possède un IC_{50} de 1.7 nM pour l'inhibition de l'enzyme ADK et la capacité à traverser la BHE.¹⁷⁵ Néanmoins, un marquage isotopique n'est pas réalisable sur cette structure. Différentes positions d'introduction du fluor-18 et du carbone-11 ont donc été envisagées (Schéma 40). Une méthode simple d'insertion du carbone-11 sur **ABT-702** est la méthylation de l'amine de la pyrido-pyrimidine ($[^{11}C]$ **62**). Pour l'incorporation du fluor-18, nous avons envisagé de remplacer l'atome de brome par un fluor-18 ($[^{18}F]$ **63**) ou d'insérer le radioisotope en ortho de cet atome de brome ($[^{18}F]$ **64**). Il a également été envisagé d'insérer l'atome de fluor-18 par une modification au niveau de la morpholine ($[^{18}F]$ **65**). En effet, d'après les études du groupe de Jarvis et de Bhagwat sur ce composé, la modification de la morpholine ne devrait pas trop modifier l'affinité pour l'ADK.¹⁶¹ Dans cette étude, un dérivé présentant une chaîne pipéridine-4-ol à la place de la morpholine a démontré une IC_{50} de 1.8 nM similaire au composé de référence **ABT-702**.



*Schéma 40. Composé **ABT-702** et radiotraceurs analogues envisagés, marqués au carbone-11 ou au fluor-18.*

Dans un premier temps, la synthèse des différentes références froides a été réalisée. Ensuite, l'affinité de ces nouveaux analogues a été testée par nos collaborateurs à l'Université de Bonn.

En parallèle, les précurseurs de marquage correspondants ont été synthétisés et les conditions de radiomarquage des précurseurs au carbone-11 et au fluor-18 ont été développées. Ces radiotraceurs ont ensuite été évalués dans un modèle animal inflammatoire.

II. Synthèse de radioligands analogues d'ABT-702

II.1. Synthèse d'ABT-702

Deux voies de synthèse basées sur les données de la littérature ont été étudiées pour obtenir le composé **ABT-702** et les dérivés ciblés.^{161,176} La première molécule visée a été le composé **ABT-702** lui-même, puisqu'il est le précurseur de marquage pour la radiométhylation et la préparation des précurseurs de radiofluoration.

II.1.1. Stratégie de synthèse linéaire

Le groupe de Jarvis et Bhagwat a développé une stratégie de synthèse linéaire avec l'introduction du groupement morpholine lors de la dernière étape après l'obtention du noyau pyrido-pyrimidine (Schéma 41).¹⁷⁵ C'est la première voie que nous avons étudiée pour la préparation des composés ciblés.

Elle a débuté par la condensation de Knoevenagel du malononitrile avec le 3-bromobenzaldéhyde **66** dans le toluène en présence de pipéridine, ce qui a permis d'obtenir le composé dicyano **67** avec un rendement de 74 %. La molécule **67** a ensuite été mise en réaction avec la 1-(6-chloropyridin-3-yl)éthan-1-one commerciale **68** dans le dichloroéthane à reflux pour former l'intermédiaire di-pyridine **69** avec un rendement de 53 %. Ce rendement moyen s'explique par la formation de sous-produits non identifiés. Cet intermédiaire **69** a ensuite été cyclisé par réaction avec le formamide à 180 °C pour conduire au cycle pyrido-pyrimidine **70**. Cependant le composé n'a pas pu être obtenu. Le produit a été détecté en LC-MS avec divers sous-produits non identifiés à cause de la haute température de réaction. Pour essayer d'améliorer le rendement de cette étape de synthèse et de limiter la formation de ces sous-produits, cette réaction a été réalisée à des températures plus basses (110 °C ou 130 °C). Cependant, le suivi LC-MS a démontré qu'à ces températures plus basses, le composé **69** ne réagissait pas avec le formamide, il est donc indispensable de réaliser la réaction à 180 °C. La dernière étape de substitution de l'atome de chlore de la pyridine par la morpholine pour former le composé **ABT-702** n'a donc pas pu être réalisée.

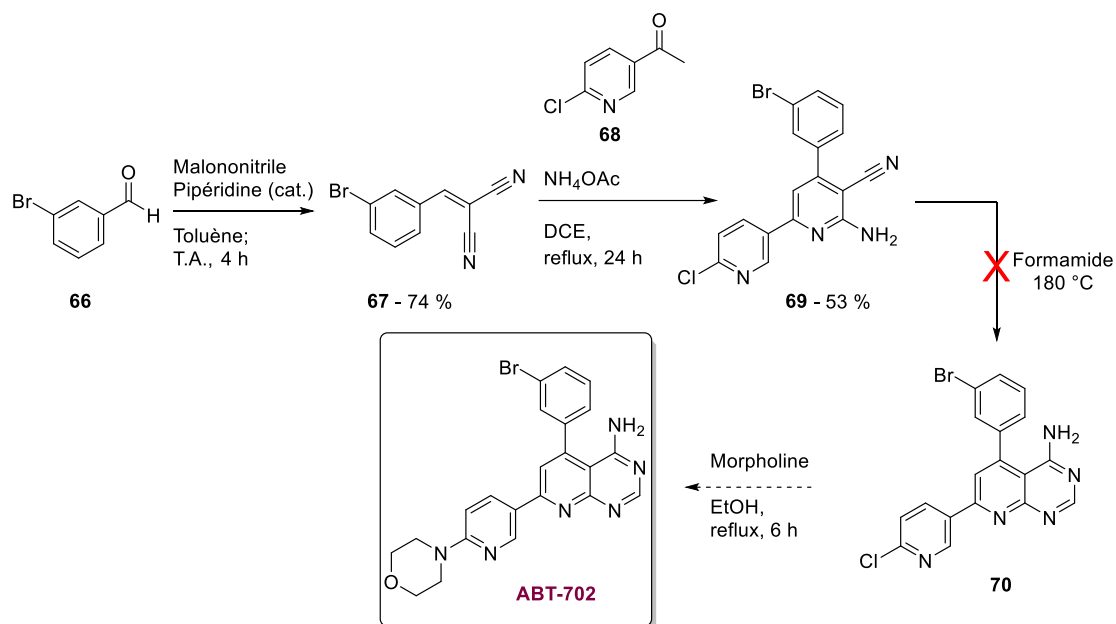


Schéma 41. Synthèse linéaire du composé **ABT-702**.

II.1.2. Stratégie de synthèse convergente

La deuxième voie de synthèse étudiée est une synthèse convergente qui passe par la préparation de deux synthons intermédiaires, le dérivé dicyano **67** et une céto-pyridine **71**, qui sont ensuite couplés (Schéma 42). Dans ce cas, la morpholine est d'abord introduite sur le noyau pyridine avant la formation du cycle pyrido-pyrimidine. La synthèse a débuté là aussi par la condensation de Knoevenagel du malononitrile avec le dérivé benzaldéhyde **66** pour obtenir le composé dicyano **67**. En parallèle, la cétone **71** a été préparée à partir de la morpholine et de la 1-(6-chloropyridin-3-yl)éthan-1-one **68** par substitution nucléophile aromatique avec un rendement de 77 %. Le composé dicyano **67** a ensuite été couplé avec la cétone **71** en présence d'acétate d'ammonium dans le dichloroéthane à reflux pour former la bis-pyridine **72**. Cette molécule a été directement engagée dans la réaction suivante après traitement et sans purification. En effet, le composé **72** ainsi que son réactif de départ **71** co-éluent lors de la purification. La cyclisation avec le formamide à $180\text{ }^\circ\text{C}$ a enfin conduit à la molécule **ABT-702** avec un rendement de 39 % sur deux étapes. Le rendement obtenu est similaire à ceux des travaux du groupe de Jarvis et Bhagwat.¹⁷⁶

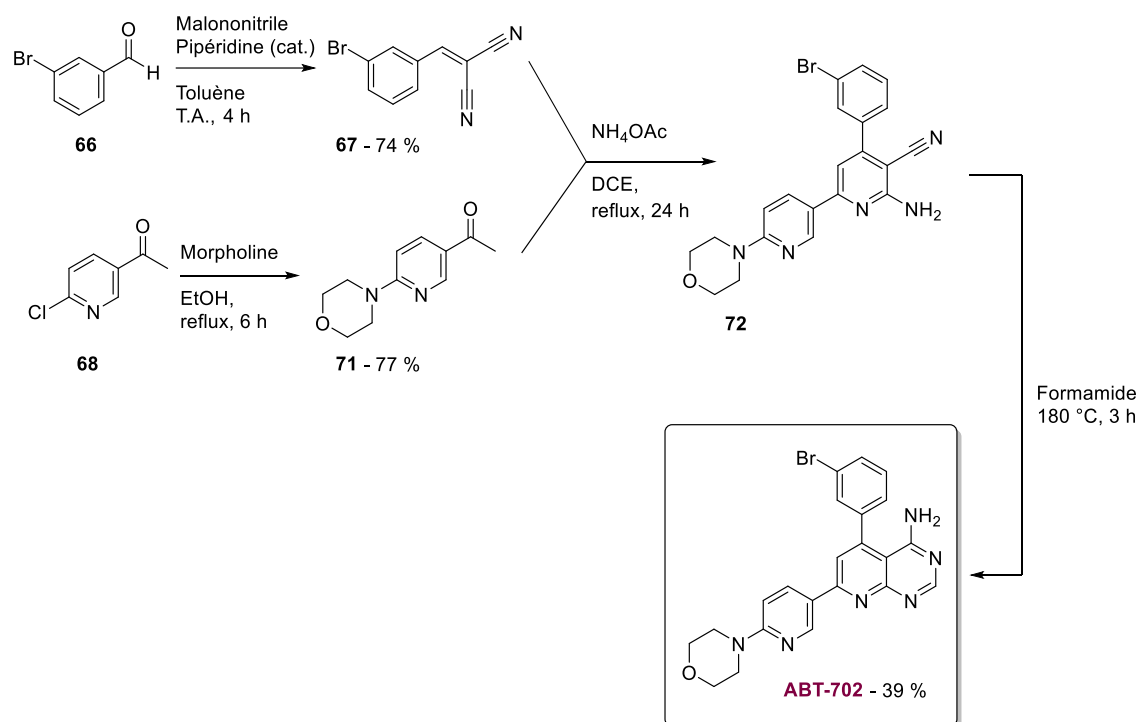


Schéma 42. Synthèse convergente de la molécule ABT-702.

La formation de sous-produits, observés en CCM et en LC-MS, ainsi que la difficulté de purification de la dernière étape de synthèse expliquent le faible rendement de ces deux dernières étapes. Il a été nécessaire de faire une double purification, une première sur silice en phase normale et une deuxième en phase inverse pour obtenir le composé propre. Cependant, les rendements obtenus avec cette stratégie restent supérieurs aux rendements obtenus avec la voie de synthèse linéaire, nous l'avons donc adoptée pour la préparation des autres analogues.

II.2. Préparation des références froides et des précurseurs de marquage

Une fois la stratégie de synthèse choisie, nous nous sommes d'abord intéressés à la préparation des références froides.

II.2.1. Synthèse de la référence froide méthylée

Le composé ABT-702 préalablement obtenu constitue le précurseur de marquage pour la radiométhylation au carbone-11 du motif 4-amino-pyrimidine. La référence froide correspondante a donc été synthétisée par méthylation de ABT-702 avec l'iodométhane dans le DMF. Le composé méthylé **62** a ainsi été obtenu avec un rendement très moyen de 30 % (Schéma 43-A).

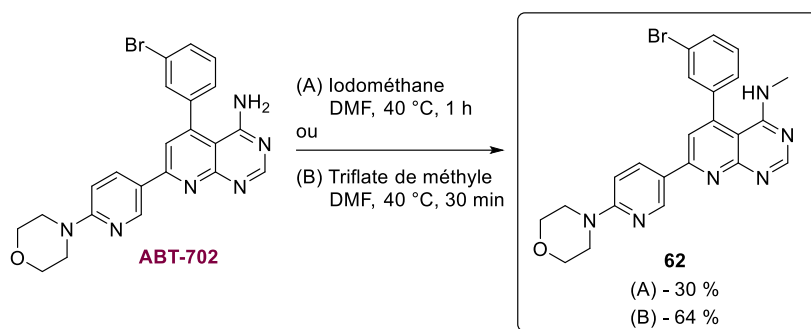


Schéma 43. Préparation de la référence froide **62**.

La méthylation de l'amine a aussi été réalisée avec du triflate de méthyle pour comparer les rendements et déterminer quel agent méthylyant serait le plus intéressant pour le radiomarquage au carbone-11. En présence de triflate de méthyle dans les mêmes conditions, soit 10 équivalents, la réaction a été quasi immédiate. Après 30 minutes de réaction, le suivi LC-MS a en effet montré que le réactif de départ **ABT-702** avait été entièrement converti en **62**. Après purification, la molécule **62** a été obtenue avec un rendement de 64 % (Schéma 43-B).

II.2.2. Synthèse des analogues fluorés et de leurs précurseurs de marquage

Concernant le marquage au fluor-18, nous avons imaginé différents radioligands, et notamment les molécules [^{18}F]**63** et [^{18}F]**64** (Schéma 44). Dans un premier temps, nous avons envisagé l'introduction du fluor-18 à la place du brome présent sur la structure d'**ABT-702** (molécule **63**). Le brome est un bon nucléofuge qui permet l'insertion d'un groupement réactif qui servira de précurseur de marquage. Nous avons également envisagé un autre radioligand pour lequel le fluor est en ortho du brome (molécule **64**). En effet le remplacement de l'atome de brome par un atome de fluor peut engendrer une baisse de l'affinité du composé pour la cible. Or le changement d'un atome d'hydrogène par un atome de fluor ne devrait pas altérer l'affinité du composé car l'atome de fluor est considéré comme un bioisostère de l'atome d'hydrogène. Pour cela, différents précurseurs de marquage ont été envisagés afin de réaliser le radiomarquage au fluor-18 aux positions souhaitées : un dérivé stannylé, un dérivé borylé et précurseur de type un sel d'iodonium. Pour cette radiofluoration sur un noyau aromatique enrichi en électrons, il est nécessaire d'employer ce type de précurseurs qui sont plus réactifs que des précurseurs classiquement employés en $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ (nitro ou ammoniums par exemple). Ces différents précurseurs de marquage peuvent être obtenus à partir des composés bromé et/ou iodé correspondants.

Selon les résultats obtenus pour la préparation d'**ABT-702**, nous avons opté pour la stratégie de synthèse convergente pour la préparation des composés ciblés.

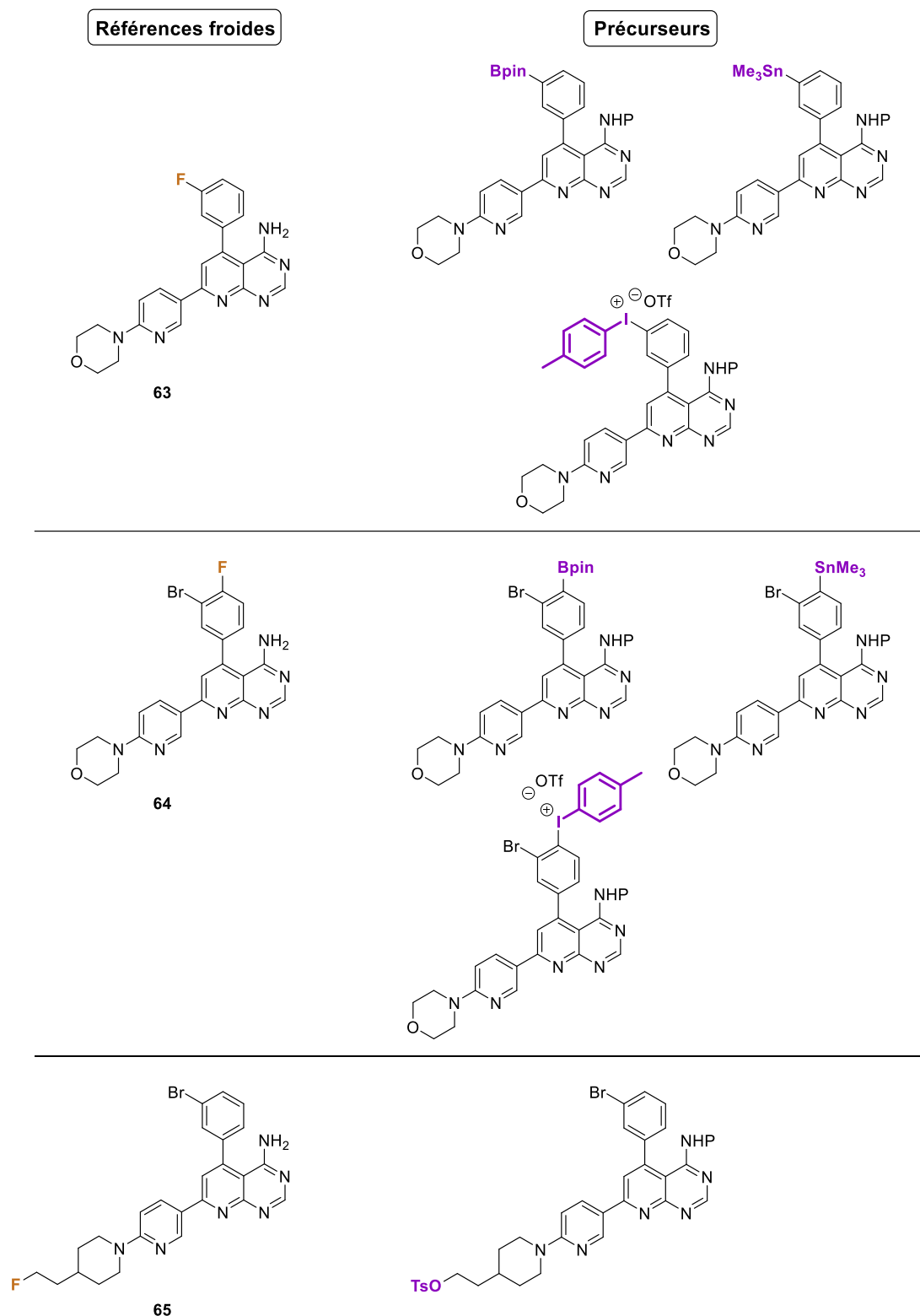


Schéma 44. Précurseurs et références froides envisagés pour le marquage au fluor-18.

Concernant la molécule [^{18}F]**65** envisagée, son précurseur nécessiterait une chaîne alkyle tosylée au niveau du motif pipéridine. Au vu des conditions réactionnelles utilisées pour la synthèse du motif pyridino-pyrimidine, la synthèse de ce précurseur n'est envisageable que si

le motif pipéridine est introduit à la fin de la synthèse. Cette voie de synthèse étant très limitante du fait du rendement très faible de l'avant-dernière étape, nous nous sommes focalisés uniquement sur les radioligands [^{18}F]**63** et [^{18}F]**64** dans ce travail.

II.2.2.a. Préparation des analogues halogénés

Les synthons intermédiaires dicyano **77-80** ont été préparés par réaction de Knoevenagel avec le malonitrile à partir des molécules commerciales **73-76**, respectivement (Schéma 45). Les composés **77-80** obtenus ont ensuite été couplés avec la cétopyridine **71** pour former les bis-pyridines **81-84**. Ces molécules ont ensuite été mises en réaction sans purification dans le formamide à 180 °C pour obtenir le cycle pyrido-pyrimidine. Les références froides fluorées **63** et **64** ont ainsi été obtenues en deux étapes avec des rendements de 26 % et 10 %, respectivement. Les intermédiaires iodé et iodo-bromé **85** et **86** ont été obtenus en deux étapes avec des rendements de 20 % et 3 %, respectivement. Ici aussi, les faibles rendements obtenus s'expliquent par la formation de nombreux sous-produits lors des différentes étapes réalisées à des températures élevées.

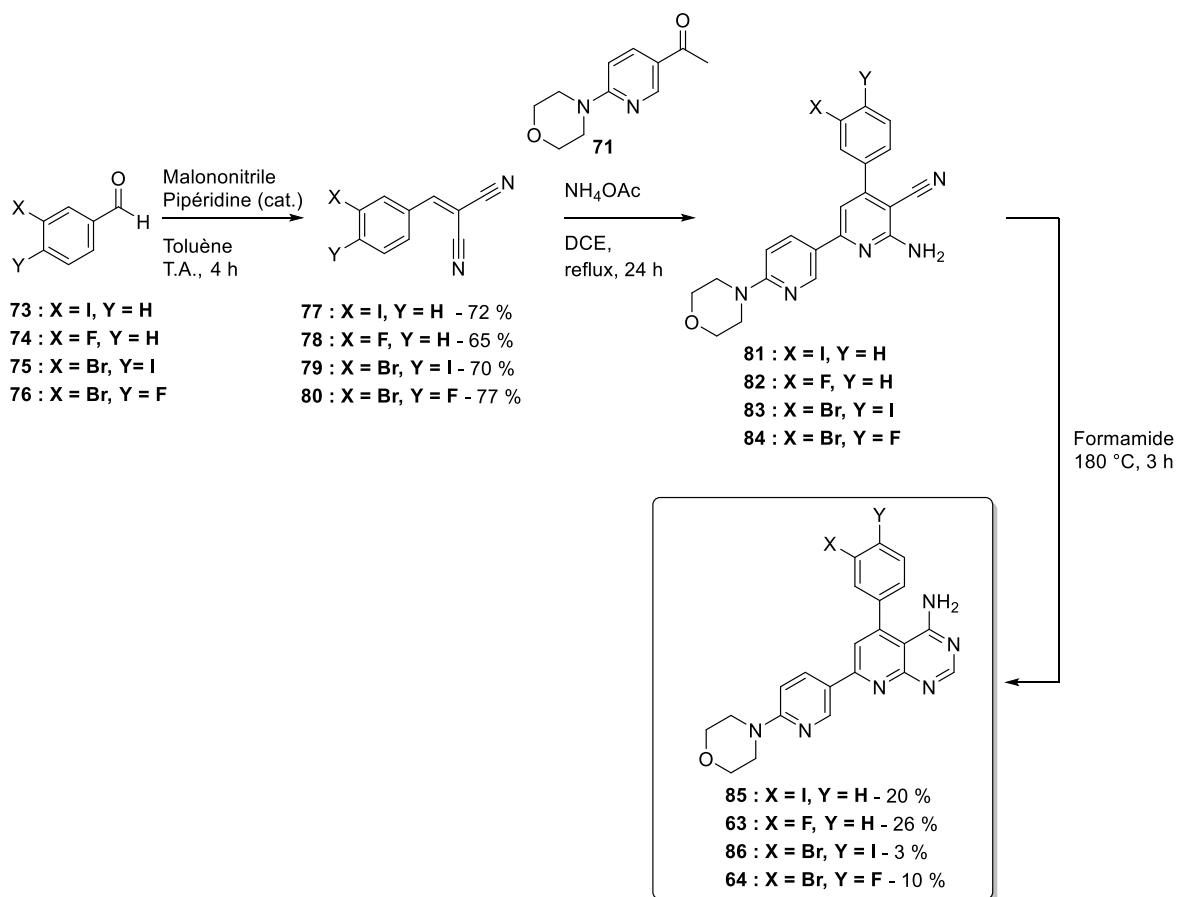


Schéma 45. Synthèse des différents analogues halogénés d'ABT-702.

II.2.2.b. Préparation des précurseurs de marquage de [¹⁸F]63

Une fois les composés iodés ou/et bromés obtenus, différentes stratégies de préparation des précurseurs de marquage ont été étudiées.

Préparation à partir du dérivé bromé

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au composé radiofluoré [¹⁸F]63. Pour cela, il a d'abord été nécessaire de protéger l'amine aromatique pour éviter la formation de sous-produits lors de la préparation des précurseurs de marquage ou lors de la radiosynthèse. Pour cela, la protection d'ABT-702 par un groupement *tert*-butoxycarbone a été réalisée avec du dicarbonate de di-*tert*-butyle (Boc₂O) en présence de triéthyle amine et de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) dans le dichlorométhane à reflux (Schéma 46).

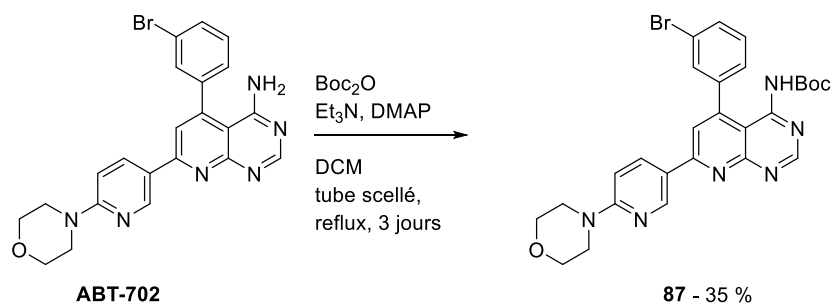


Schéma 46. Protection de l'amine aromatique par un groupement Boc.

Le composé **87** a été obtenu avec un rendement de 35 %, un rendement modeste mais cependant suffisant pour étudier la préparation des différents précurseurs de marquage.

a) Précurseur borylé

Une fois l'amine protégée, l'introduction du groupement pinacolborane sur le composé **87** a ensuite été étudiée. Une réaction de borylation de Suzuki-Miyaura a été réalisée dans des conditions classiques avec du bis(pinacolato)dibore (B₂pin₂) en présence d'un complexe de Pd(II) dans le dioxane à 100 °C (Schéma 47). Cependant, dans ces conditions étudiées, le produit **88** attendu n'a pas pu être obtenu et la perte de l'atome de brome a été observée. Un suivi par LC-MS a montré que le produit de déhalogénéation **89** était formé avant le produit borylé souhaité après une heure de réaction. Une déprotection concomitante de l'amine a également été observée.

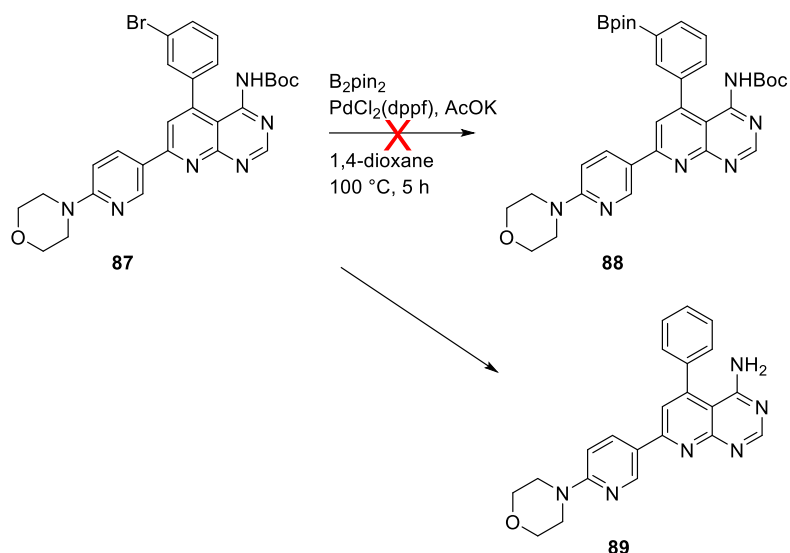


Schéma 47. Essais de borylation du composé 87.

b) Précurseur triméthylétain

Dans un deuxième temps, l'insertion d'un groupement triméthylétain par couplage de Stille a été étudiée (Schéma 48). L'atome de brome du composé **87** a été substitué par réaction avec l'hexaméthyl-di-étain en présence de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ à 110 °C dans le 1,4-dioxane. Dans ce cas également, la perte du groupement protecteur de l'amine a été observée mais le composé stannylé **90** a bien été obtenu avec un rendement de 42 %.

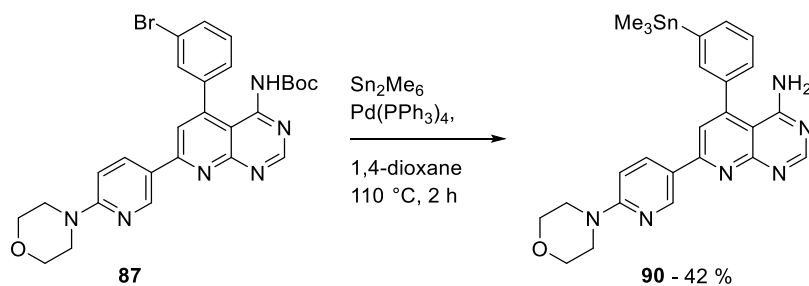


Schéma 48. Réaction de stannylation du composé 87.

Au vu de l'instabilité du groupement protecteur Boc lors de la réaction de stannylation, il a été envisagé de réaliser le couplage sur le composé déprotégé **ABT-702** dans un premier temps et de protéger l'amine dans un second temps. Pour cela, les conditions de la réaction de Stille ont été utilisées pour coupler **ABT-702** avec le triméthylétain, ce qui a conduit au produit **90** avec un rendement de 31 % (Schéma 49).

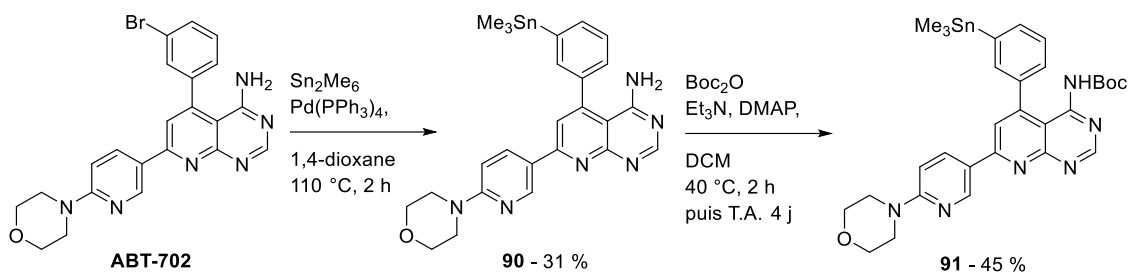


Schéma 49. Synthèse du précurseur de marquage **91**.

L'amine **90** a ensuite été engagée dans une réaction de protection avec un groupe Boc. Pour cette protection, les conditions ont été optimisées au vu du rendement modeste obtenu lors de la réaction de protection du composé **87**. Tout d'abord, il a été indispensable de chauffer le milieu réactionnel à 40 °C avec un excès de Boc₂O (2,4 équivalents) afin que le produit de départ réagisse. En effet, des tests à température ambiante et avec moins de Boc₂O n'ont pas permis la protection de l'amine. Après deux heures à 40 °C, le suivi LC-MS a montré que le produit de départ a été totalement consommé et que le produit souhaité a été formé, mais un sous-produit a également été détecté. Après purification, le produit **91** attendu a été obtenu avec un rendement très faible (inférieur à 10 %). La formation de ce sous-produit a donc été examinée car il est largement majoritaire par rapport au produit souhaité. Pour cela, un suivi LC-MS de la réaction à différents temps a été effectué (Figure 57, tableau 9). Après 2 heures de réaction à 40 °C, le produit de départ **ABT-702** a totalement disparu et seul ce sous-produit, qui a un rapport m/z de + 28 par rapport au composé voulu, a été détecté. La température du milieu réactionnel a ensuite été abaissée à température ambiante et la disparition progressive du sous-produit ainsi que la formation concomitante du produit attendu ont été observées. En laissant évoluer la réaction à température ambiante pendant 72 heures, seul le composé attendu a été détecté par LC-MS. Le composé protégé **91** a finalement été obtenu après purification avec un rendement moyen de 45 %. Cette différence entre la conversion observée en LC-MS et le rendement obtenu s'explique par une perte lors de la purification sur silice et la présence d'autres sous-produits en plus faible quantité.

Ce sous-produit n'a pas pu être isolé par purification car il ne semble pas être stable sur gel de silice, sa structure n'a donc pas pu être élucidée. Cependant, au vu de la masse supplémentaire par rapport au composé attendu, il est envisageable qu'un C=O supplémentaire soit présent sur le sous-produit.

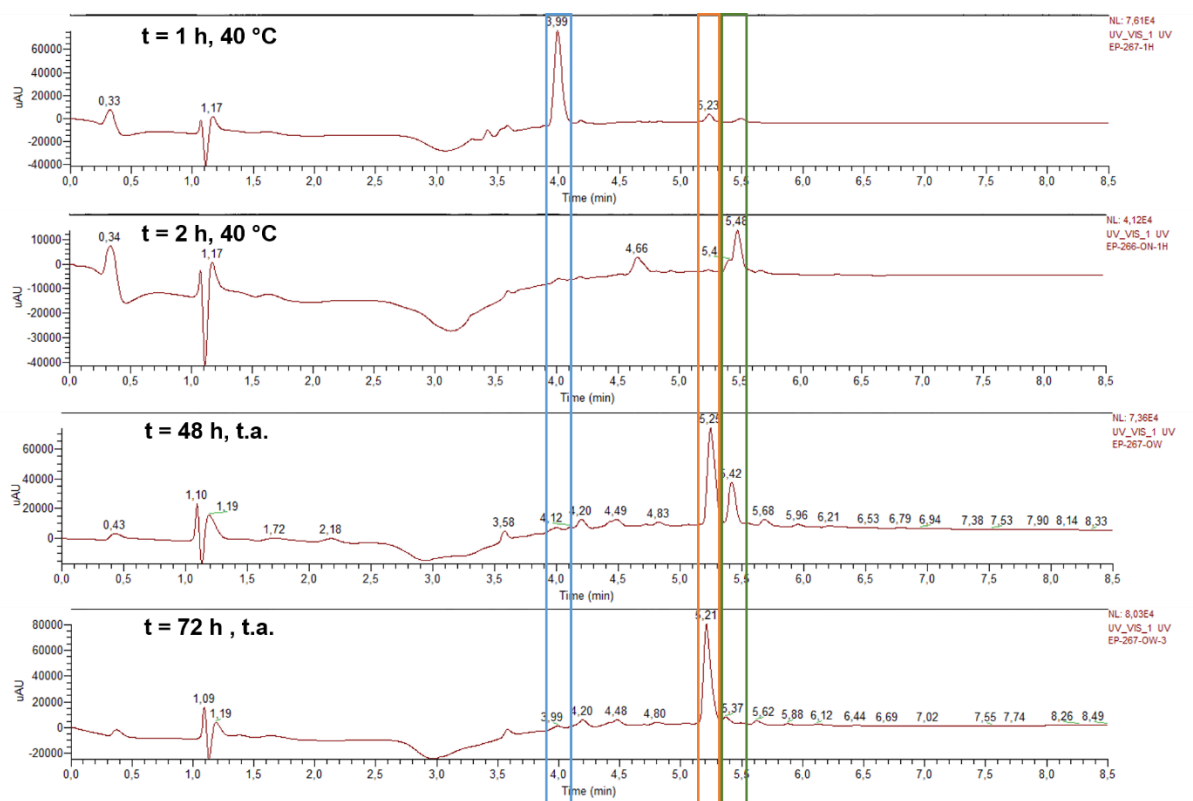


Figure 57. Chromatogrammes LC-MS de la réaction de protection de l'amine par un groupement Boc (bleu : produit de départ ABT-702, orange : produit attendu 91, vert : sous-produit).

Tableau 9. Suivi LC-MS de la réaction de protection de l'amine 90 par un groupement Boc.

Temps de réaction	Température	Produit de départ ABT-702 (%)	Produit attendu 91 (%)	Sous-produit (%)
1 h	40 °C	85	7	8
2 h	40 °C	0	7	93
48 h	25 °C	0	68	32
72 h	25 °C	0	94	6

La méthode de radiofluoruration assistée au cuivre envisagée pour le marquage de ce composé nécessite des températures élevées.⁶⁴ Au vu de la thermolyse possible du groupement Boc de l'amine aromatique à 110 °C, l'emploi d'un autre groupement protecteur a également été envisagé. En effet, la présence de l'amine libre pourrait engendrer des difficultés lors de la radiosynthèse. Une protection de l'amine 90 avec un groupement benzoyle a donc été étudiée. Pour cela, 90 a été mis en réaction avec le chlorure de benzoyle et la pyridine dans le dichlorométhane (Schéma 50).¹⁷⁷ Le composé protégé 92 a ainsi été obtenu avec un rendement de 63 %. Il est à noter que le sous-produit observé lors de la protection avec le Boc n'a pas été observé dans ce cas.

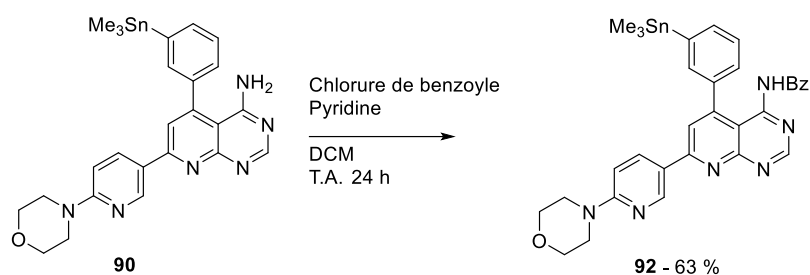


Schéma 50. Préparation du précurseur de marquage benzoylé 92.

Préparation à partir du dérivé iodé

En ce qui concerne le dérivé iodé **85**, la protection de l'amine a été effectuée avec les conditions utilisées pour la protection du composé **90**, soit les conditions suivantes : 2,4 équivalents de Boc_2O en présence de triéthylamine et de DMAP dans le dichlorométhane à 40 °C pendant 1 heure, puis à 25 °C pendant plusieurs jours (Schéma 51). Ici aussi, la formation transitoire d'un sous-produit non identifié a été observée lors du suivi LC-MS. En revanche, dans le cas du composé iodé, le produit monoprotégé **94** a été obtenu avec le produit diprotégé **93** avec des rendements de 35 % et 21 %, respectivement.

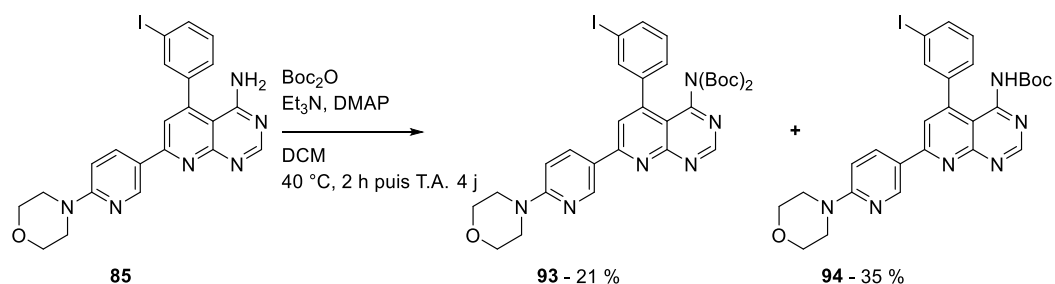


Schéma 51. Protection de l'amine aromatique du dérivé iodé 85.

a) Précurseur borylé

Des essais de borylation ont également été menés sur le dérivé iodé **94** (Schéma 52). En utilisant les mêmes conditions réactionnelles que pour la borylation de la molécule **87**, le produit **88** attendu n'a pas pu être obtenu. Dans ce cas, le suivi LC-MS a montré la formation de deux produits, le produit déhalogéné **89**, qui avait également été observé pour **87**, et l'acide boronique **95**, obtenu majoritairement à hauteur de 56 % contre 44 % pour la molécule **89**. Il est à noter que la déprotection de l'amine a également été observée pour ce composé.

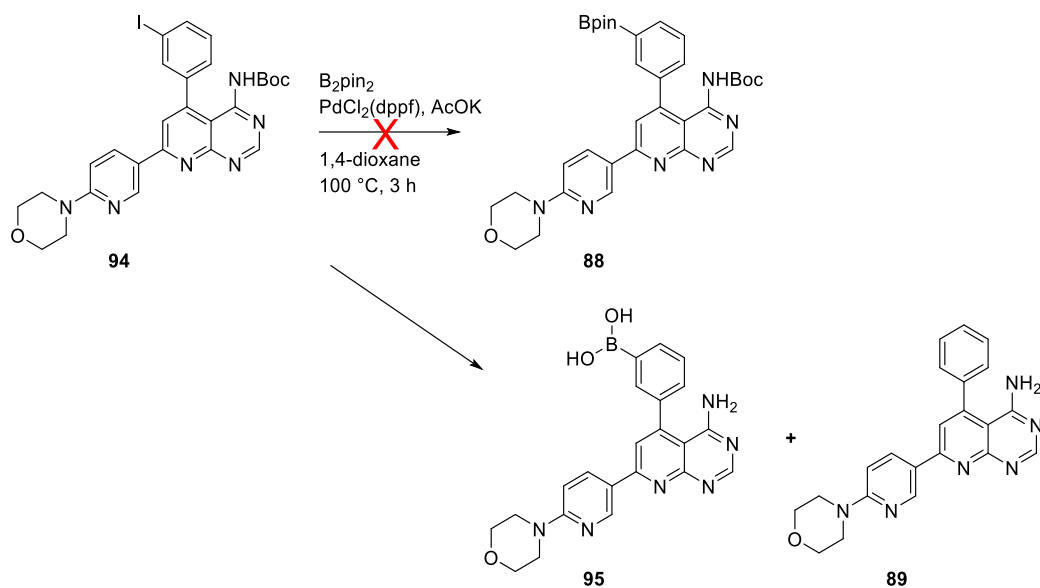


Schéma 52. Réaction de borylation du composé 94.

Ces deux essais de borylation n'ont pas été concluants et n'ont pas abouti à l'obtention d'un précurseur utilisable pour un radiomarquage au fluor-18. Une nouvelle stratégie basée sur la préparation d'un groupement triméthylétain comme précurseur de marquage de $[^{18}\text{F}]\mathbf{63}$ a donc été étudiée.

b) Précurseur sel d'iodonium

La formation d'un précurseur type sel d'iodonium a aussi été étudiée en partant du dérivé d'ABT-702 iodé (Schéma 53). Cette réaction a été réalisée sur le composé di-protégé **93** qui a d'abord été traité par l'acide triflique (TfOH) dans le dichlorométhane pendant 10 minutes puis par l'acide métachloroperbenzoïque (mCPBA) dans le toluène. Après 1 heure à 65 °C, le suivi LC-MS de la réaction a montré la formation du composé attendu mais déprotégé. Cependant, lors de la purification sur silice, le composé s'est dégradé et n'a pas pu être isolé, seul le produit iodé non protégé **85** a été obtenu. Pour éviter cette dégradation, il serait envisageable d'isoler ce sel par précipitation^{178,179} ou par purification sur alumine.¹⁸⁰

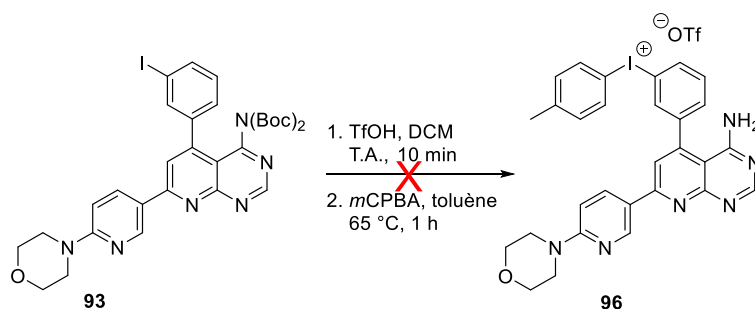


Schéma 53. Préparation du sel d'iodonium à partir du dérivé iodé 93.

Un deuxième essai de préparation du sel d'iodonium à partir du dérivé stannylé a été réalisé.⁵⁷ La réaction a été réalisée à partir du composé protégé **91** (Schéma 54). Ce dernier a été mis en réaction avec le réactif de Koser, l'hydroxy(tosyloxy)iodobenzène, dans le dichlorométhane à 0 °C afin de réaliser la substitution du groupement triméthylétain par l'hydroxy(tosyloxy)iodobenzène et former le sel d'iodonium **97**. Cependant, le composé **97** attendu n'a pas été observé et le produit de départ s'est dégradé.

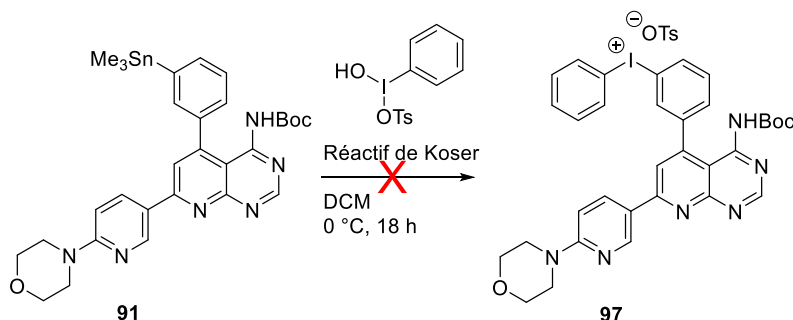


Schéma 54. Préparation du sel d'iodonium à partir du composé **91**.

II.3. Radiomarquage des composés

L'optimisation des conditions réactionnelles pour méthyler l'amine **ABT-702** a été effectuée sur un automate iPhase C-11 Pro². La radiofluoruration des différents précurseurs de marquage a été effectuée sur un automate AllinOne (Trasis).

II.3.1. Radiométhylation

Le radiomarquage au carbone-11 du composé **ABT-702** a été réalisé par méthylation avec le [¹¹C]CH₃I ou le [¹¹C]CH₃OTf (Schéma 55).

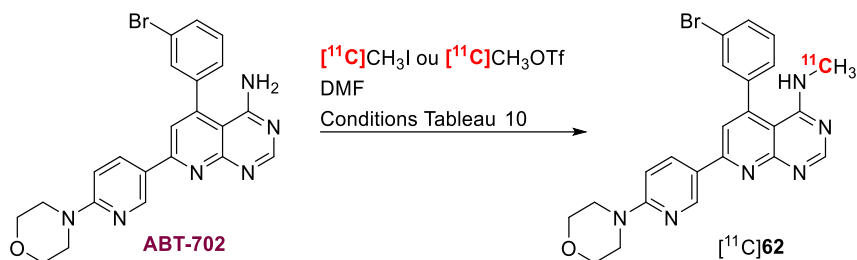


Schéma 55. Radiométhylation du composé **ABT-702**.

Différentes conditions ont été testées en faisant varier la température, le temps de réaction et/ou l'agent méthyliant (Tableau 10). L'utilisation du iodure de [¹¹C]méthyle comme agent méthyliant a permis d'obtenir [¹¹C]**62** à l'état de traces, que la réaction ait lieu à 40 °C ou à 80 °C (entrées 1 et 2). Des conditions plus basiques ont aussi été testées avec l'iodure de méthyle en ajoutant NaH au milieu réactionnel (entrée 3). Dans ces conditions, à 110 °C pendant 5 minutes, une

légère augmentation de la conversion a été observée. Cependant, comme observé lors de la préparation de la référence froide **62**, c'est l'utilisation du triflate de [¹¹C]méthyle qui a permis d'obtenir le composé radiomarqué avec des conversions plus intéressantes (entrées 4 et 5). Les conversions ont été similaires à 80 °C (entrée 4) ou à 110 °C (entrée 5).

Tableau 10. Conditions étudiées pour la radiométhylation d'ABT-702.

Entrée	Agent méthylant	Base	Température (°C)	Temps (min)	Conversion (%)
1	[¹¹ C]MeI	-	40	3	2
2	[¹¹ C]MeI	-	80	3	8
3	[¹¹ C]MeI	NaH	110	5	10
4	[¹¹ C]MeOTf	-	80	3	28
5	[¹¹ C]MeOTf	-	110	3	26

Pour la suite, nous avons décidé de privilégier la réaction à 110 °C car le chromatogramme analytique du brut réactionnel montre une proportion plus faible de sous-produits radioactifs comparé au chromatogramme obtenu à 80 °C (Figure 58). L'étape de purification par HPLC semi-préparative sera ainsi facilitée si les sous-produits sont limités.

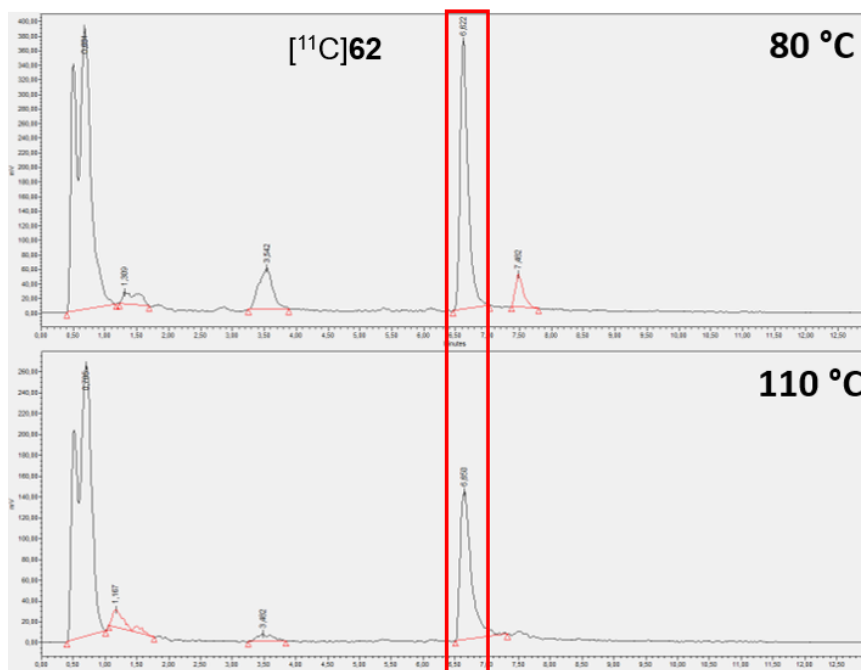


Figure 58. Chromatogrammes HPLC analytiques des bruts réactionnels de la radiométhylation d'ABT-702 à 80°C et 100°C (détection γ).

Les conditions de radiométhylation étant optimisées, l'automatisation a été poursuivie par la mise au point de la purification par HPLC semi préparative (Figure 59) suivie de l'étape de formulation sur cartouche Sep-pak C-18 (Waters).

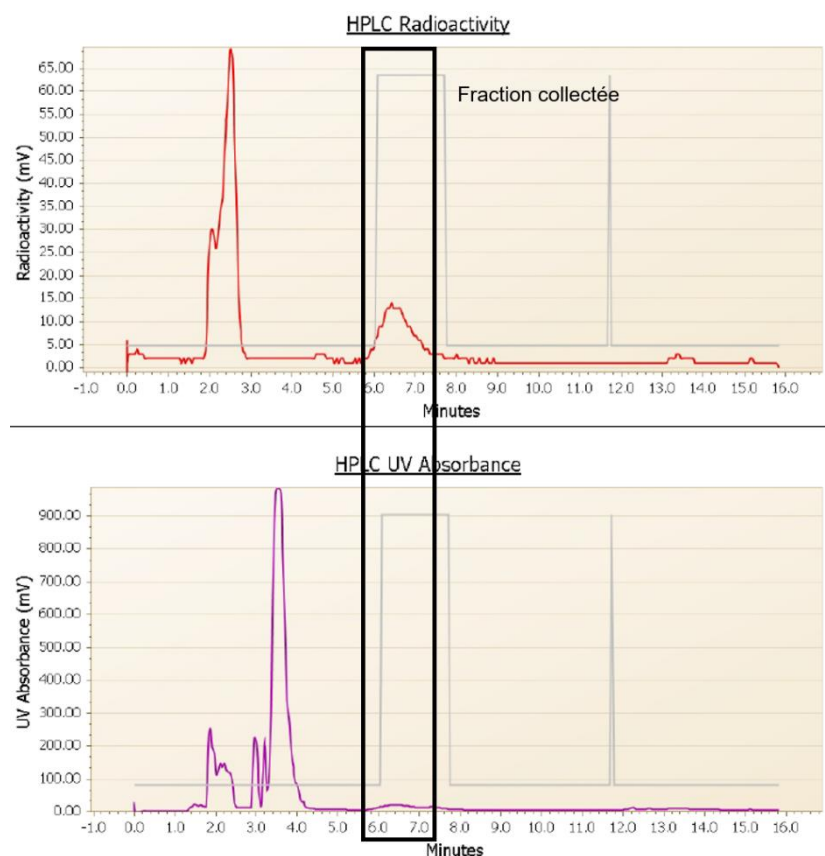


Figure 59. Chromatogrammes de la purification par HPLC semi-préparative de la radiométhylation du composé [^{11}C]62, radioactif (en haut) et UV (en bas) sur automate iPhase C-11 Pro².

Les conditions de marquage optimisées ont permis d'obtenir le composé [^{11}C]62 sous forme de solution injectable avec un rendement corrigé de la décroissance de $7,9 \pm 5,0$ % ($n = 3$) et une activité moyenne de $0,30 \pm 0,16$ GBq ($n = 3$) avec un temps total de radiosynthèse de 45 minutes après purification et reformulation. La molécule [^{11}C]62 a été obtenue avec une pureté radiochimie supérieure à 95 % et avec une activité molaire de $9,0$ GBq/ μmol ($n = 1$), déterminées par analyse HPLC et à l'aide d'une courbe de calibration (Figure 60). Cette faible activité molaire du traceur devrait être optimisée pour un usage en préclinique. De plus, la mauvaise reproductibilité de cette radiosynthèse pourrait être limitante. Toutefois, au vu des résultats d'affinité obtenus sur ce composé (voir partie IV.1), le développement de la réaction de radiométhylation n'a pas été plus loin.

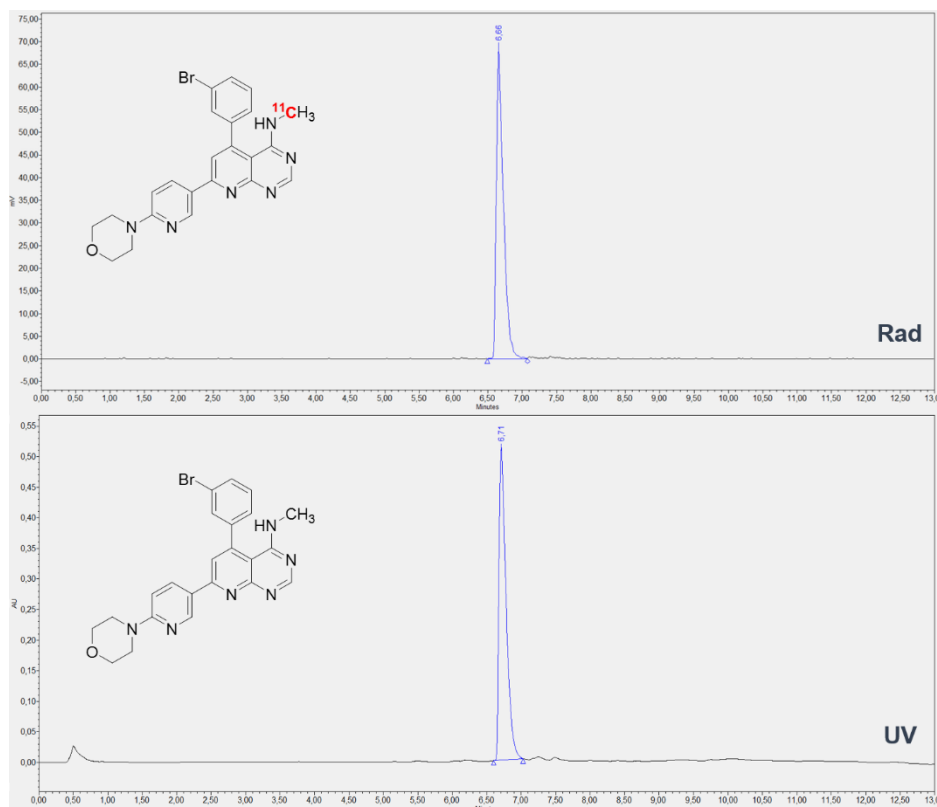


Figure 60. Chromatogrammes HPLC analytiques de la référence **62** avec détection UV (bas) et de $[^{11}\text{C}]\mathbf{62}$ avec détection γ (haut).

II.3.2. Radiofluoruration

II.3.2.a. Radiofluoruration du composé $[^{18}\text{F}]\mathbf{63}$

La radiosynthèse du composé $[^{18}\text{F}]\mathbf{63}$ a été étudiée à partir des précurseurs triméthylétain **90** et **91** (Schéma 56). Cette radiofluoruration nécessite une catalyse au cuivre et nous avons choisi d'utiliser le tetrakis(pyridine) triflate de cuivre (II) ($\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4$) qui est souvent utilisé dans la littérature.³⁸

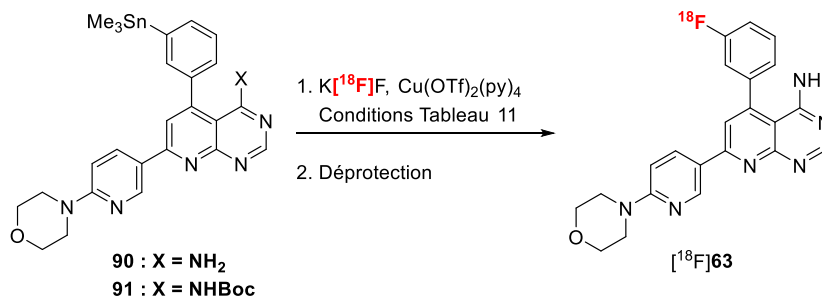


Schéma 56. Réaction de radiofluoruration de $[^{18}\text{F}]\mathbf{63}$.

Différentes conditions de marquage ont été testées et les conversions ont été déterminées par radio-CCM (Tableau 11) en variant les paramètres suivants : activation et élution de la cartouche contenant la résine échangeuse d'anions (QMA), quantité de Kryptofix, la durée et la température de marquage ainsi que le solvant.

D'après les travaux de la littérature, l'activation et l'élution de la QMA, qui sert à extraire les [¹⁸F]fluorures de l'eau enrichie, ont d'abord été réalisées avec des sels de triflate (entrées 1, 2 et 3).¹⁸¹ L'activation et l'élution par le triflate de potassium suivies du radiomarquage dans le DMI ont permis d'obtenir 2 % de conversion après 10 minutes de réaction à 110 °C (entrée 1) et 7 % de conversion après 20 minutes de réaction à 120 °C (entrée 3). Cependant, le produit [¹⁸F]**63** n'a pas été formé en cas d'emploi de DMA comme solvant de radiofluoration (entrée 2).

L'activation de la QMA par une solution d'hydrogénocarbonate de potassium 1 M suivie de l'élution des ions fluorures avec une solution contenant du carbonate de potassium ont également été étudiées (entrées 4-7). Dans ces conditions, et avec le radiomarquage réalisé dans le DMI à 120 °C, nous avons pu observer la formation du composé déprotégé [¹⁸F]**63** à hauteur de 7 % en partant du précurseur Boc **91** (entrée 4, Figure 61). Cette conversion limitée est certainement due à la labilité du groupement protecteur Boc, notamment à haute température. Ici aussi l'utilisation du DMA au lieu du DMI lors du marquage n'a permis d'obtenir que des traces de la molécule [¹⁸F]**63** (entrée 5). En partant de l'amine libre **90**, [¹⁸F]**63** n'a pas été obtenu (entrée 6). Ce résultat est en accord avec les données de la littérature, il a en effet été rapporté que les amines libres peuvent complexer le catalyseur au cuivre et inhiber la radiofluoration.^{63,64} Enfin, l'impact de la quantité de K₂₂₂ a été étudiée et la radiosynthèse avec une quantité doublée a conduit à la formation de [¹⁸F]**63** dans des proportions similaires (comparaison entre les entrées 4 et 7). Pour finir, une activation de la QMA par KHCO₃ puis une élution des ions fluorures avec une solution de bicarbonate de tétrabutylammonium ont également permis d'obtenir la molécule [¹⁸F]**63** avec une conversion de 7 % lorsque le radiomarquage a été réalisé à 120 °C pendant 20 minutes (entrée 8).

Tableau 11. Conditions de radiofluoruration testées pour l'obtention du composé [¹⁸F]63.

Entrée	X	Activation QMA	Elution QMA	Quantité de K ₂₂₂	Température et temps	Solvant	Conversion
1	NHBoc	KOTf	KOTf (10.5 mg)	-	110 °C, 10 min	DMI	2 %
2	NHBoc	KOTf	KOTf (10.5 mg)	-	110 °C, 10 min	DMA	-
3	NHBoc	KOTf	KOTf (10.5 mg)	-	120 °C, 20 min	DMI	7 %
4	NHBoc	KHCO ₃	K ₂ CO ₃ (1.8 mg)	7.1 mg	120 °C, 20 min	DMI	7 %
5	NHBoc	KHCO ₃	K ₂ CO ₃ (1.8 mg)	7.1 mg	120 °C, 20 min	DMA	traces
6	NH ₂	KHCO ₃	K ₂ CO ₃ (1.8 mg)	7.1 mg	120 °C, 20 min	DMI	-
7	NHBoc	KHCO ₃	K ₂ CO ₃ (1.8 mg)	11.5 mg	120 °C, 20 min	DMI	7 %
8	NHBoc	KHCO ₃	Et ₄ NHCO ₃ (3mg)	-	120 °C, 20 min	DMI	7 %

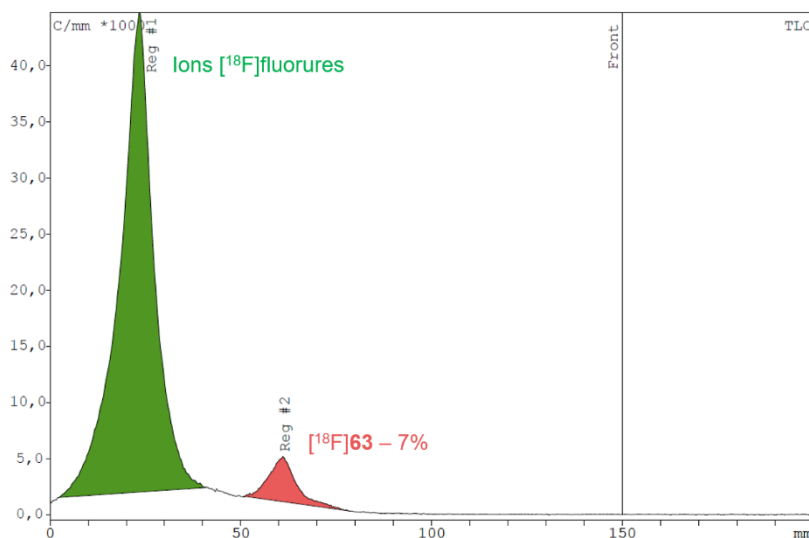


Figure 61. Radio-CCM du brut réactionnel de la radiofluoruration du composé [¹⁸F]63 (conditions de l'entrée 4).

Les bruts réactionnels de ces essais de radiofluoruration ont également été analysés par HPLC analytique (Figure 62). Sur les chromatogrammes radioactifs, un seul pic identifié comme étant le composé [¹⁸F]63 a été observé.

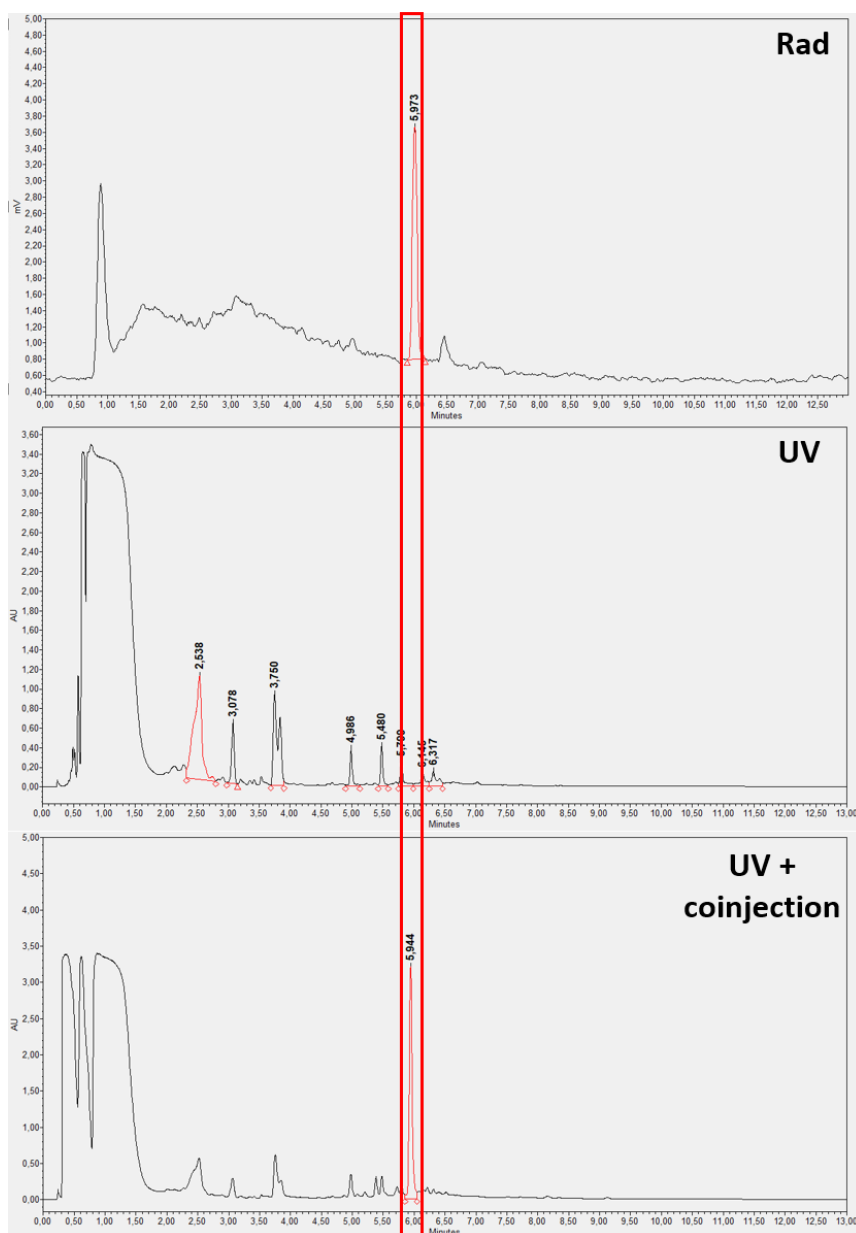


Figure 62. Chromatogrammes HPLC analytiques du brut réactionnel de la radiofluoration de **91** par détection γ (haut), détection UV (milieu) et co-injecté avec la référence froide **63** (bas).

Même si les différents essais n'ont pas permis d'obtenir une conversion supérieure à 7 %, des essais d'automatisation ont été réalisés avec les conditions des entrées 3, 4, 7 et 8. Le meilleur rendement a été obtenu en utilisant les conditions de l'entrée 8, c'est-à-dire en conditionnant la QMA avec le triflate de potassium puis en éluant des ions fluorures avec une solution de bicarbonate de tétrabutylammonium. Après radiofluoration de **91** en présence de $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{Py}_4$ (6 mg pour 2 mg de précurseur) pendant 20 minutes à 120 °C, le composé ^{18}F **63** a été purifié par HPLC semi-préparative (Figure 63) et reformulé dans l'éthanol par passage sur Sep pak C18. ^{18}F **63** a finalement été obtenu après 60 minutes environ avec un rendement de 1.5 ± 0.5 % ($n = 3$) corrigé de la décroissance, avec une pureté radiochimique supérieure à 99 % et une activité molaire de 28.8 GBq/ μmol .

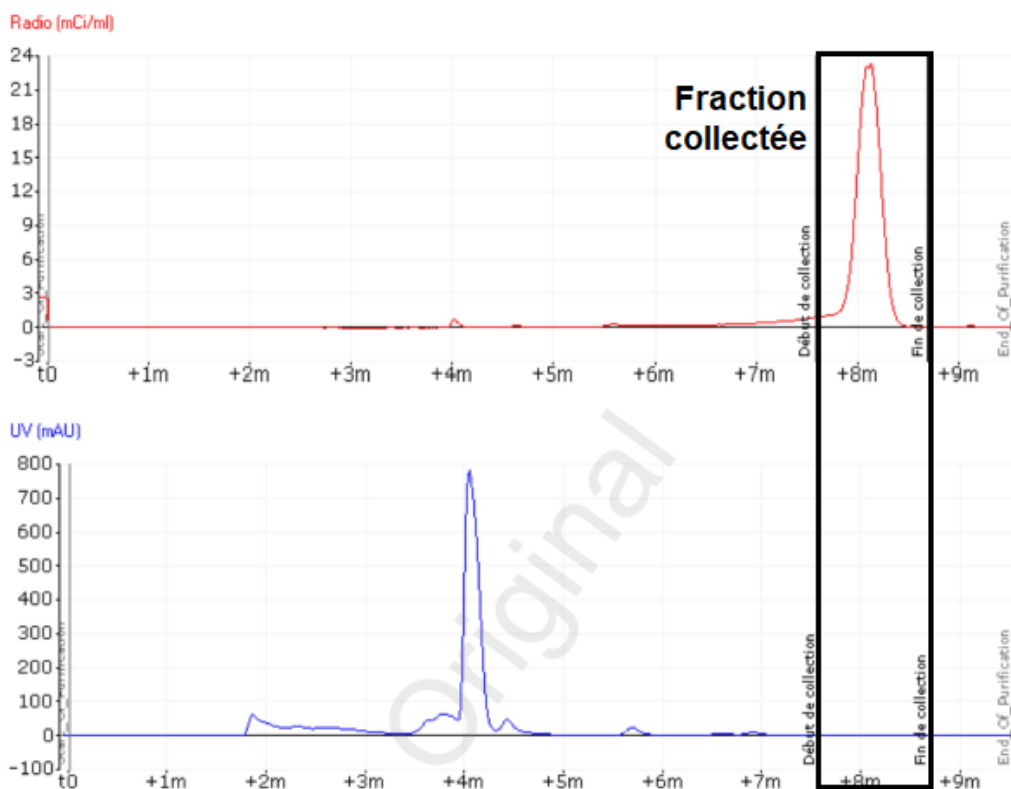


Figure 63. Chromatogrammes de la purification par HPLC semi-préparative du composé $[^{18}\text{F}]63$, radioactif (en haut) et UV (en bas)

Plusieurs conditions de réactions ont été testées et le rendement de cette radiosynthèse est tout de même resté très faible. Ceci pourrait s'expliquer par la mauvaise réactivité du précurseur stannylé ou le manque de stabilité du groupement protecteur. Il serait intéressant de tenter cette radiofluoration en partant du composé **92**, protégé avec un groupement benzoyle.

II.3.2.b. Composés de nos collaborateurs à Bonn

En partenariat avec le laboratoire de l'université de Bonn dirigé par Christa Müller, un couple référence froide/précurseur a été synthétisé pour un marquage au fluor-18 (Figure 64).

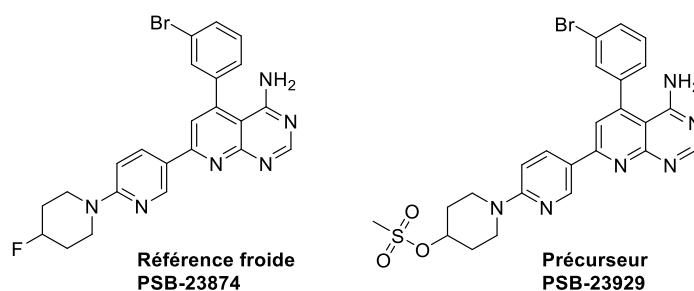


Figure 64. Structures de la référence froide et du précurseur de marquage des composés de Bonn.

Dans ce cas, l'introduction du fluor-18 est envisagée sur le motif pipéridine qui remplace la morpholine de la molécule originale. Le précurseur est un dérivé mésylate qui pourrait être substitué par l'ion $[^{18}\text{F}]\text{fluorure}$ (Schéma 57).

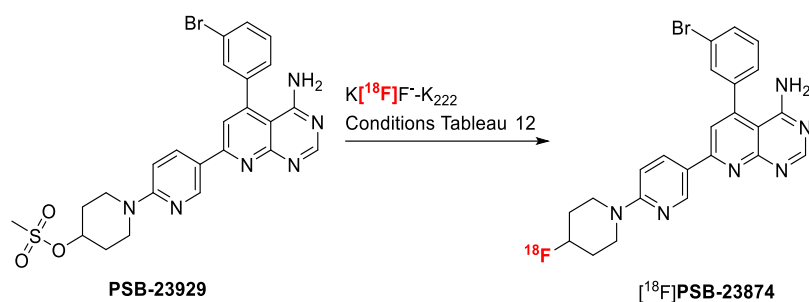


Schéma 57. Radiofluorination du précurseur PSB-239329.

Des conditions classiques de marquage avec le complexe $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F}-\text{K}_{222}$ ont été testées (Tableau 12). Les premières expériences ont été menées dans l'acétonitrile. A $70\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 10 minutes, le produit $[^{18}\text{F}]\text{PSB-23874}$ n'a pas été observé par analyse du brut réactionnel (entrée 1). En augmentant la température et le temps de réaction (entrée 2), l'analyse HPLC du brut a montré la formation de deux produits radioactifs en faibles proportions, l'un d'entre eux ayant un temps de rétention similaire au produit attendu (Figure 65). Cette faible conversion peut s'expliquer par l'instabilité du précurseur et sa pureté qui avoisine les 40 %. D'autres expériences réalisées dans le DMF à des températures plus élevées (entrées 3 et 4) n'ont pas permis d'obtenir le produit radiomarké, seule la dégradation du précurseur a été observée.

Tableau 12. Conditions de radiofluorination testées.

Entrée	Solvant	Température	Temps	Conversion
1	ACN	$70\text{ }^\circ\text{C}$	10 min	-
2	ACN	$90\text{ }^\circ\text{C}$	20 min	traces
3	DMF	$100\text{ }^\circ\text{C}$	10 min	-
4	DMF	$120\text{ }^\circ\text{C}$	10 min	-

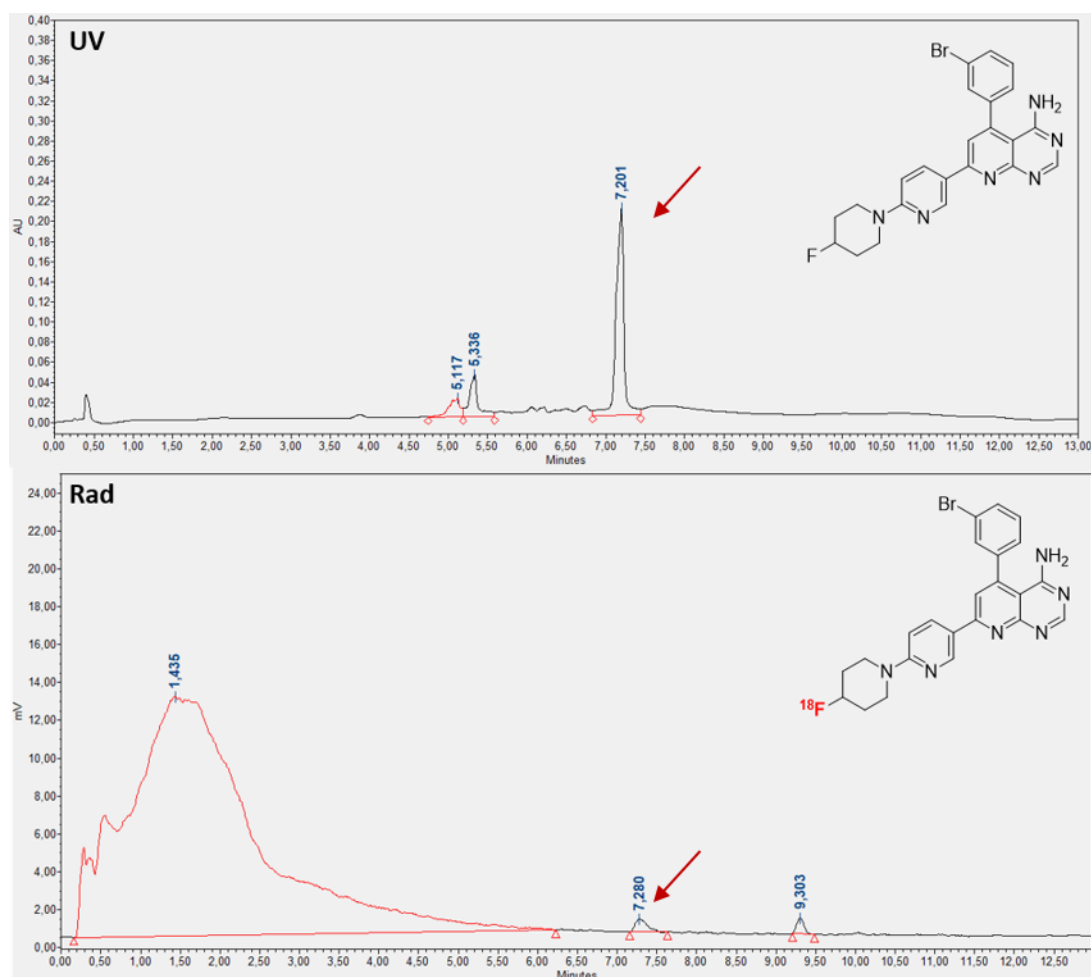


Figure 65. Chromatogrammes HPLC analytiques de la référence froide (UV) et du brut réactionnel (rad) de $[^{18}\text{F}]$ PSB-23874.

Des essais complémentaires restent à mener pour pouvoir envisager une utilisation pré-clinique de ce radioligand. Lors de la préparation de ce précurseur mésylate, il a été remarqué que celui-ci n'était pas stable et que sa purification n'était pas évidente. De ce fait, il est envisagé de remplacer le groupement partant par un groupement tosylé. De plus, il pourrait être intéressant de protéger l'amine pour éviter toute interférence lors de la réaction.

III. Evaluations biologiques

III.1. Détermination de l'affinité des composés

La détermination de l'affinité des composés **62**, **63** et **64** a été effectuée par notre laboratoire partenaire à l'Université de Bonn. Ils ont développé un test mesurant l'inhibition de l'activité de l'adénosine kinase par le ligand à évaluer.¹⁸² Pour cela, des cellules astrocytaires saines exprimant l'enzyme ADK ont été incubées avec le ligand à tester et l'adénosine radiomarquée au tritium (Figure 66). Ensuite, les cellules ont été récupérées puis lysées pour récupérer

différents composés : l'enzyme ADK, le ligand testé, l'adénosine radiomarquée et l'adénosine monophosphate (AMP) radiomarquée formée par action de l'ADK. Pour finir, la constante d'inhibition a été calculée par rapport à la quantité d'AMP marquée récupérée. En effet, si cette quantité d'AMP marquée obtenue est faible, l'inhibition de l'ADK par le ligand compétiteur est élevée et donc ce ligand a une bonne affinité pour cette enzyme.

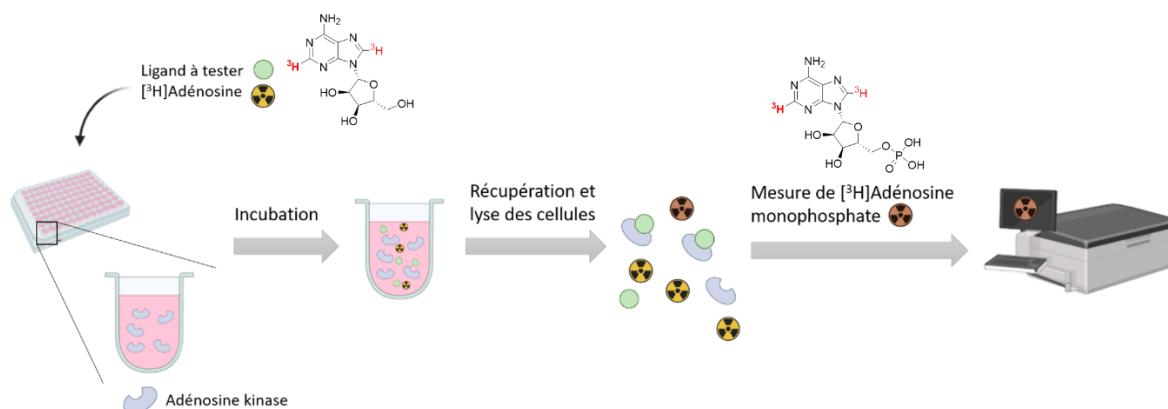


Figure 66. Test de mesure d'inhibition de l'ADK.

La référence **62** méthylée présente une mauvaise IC_{50} d'environ 10 μ M (Tableau 13). Ceci s'explique certainement par le fait que l'amine joue un rôle dans la liaison avec l'ADK.¹⁸³ Cependant, les composés **63** et **64** présentent des IC_{50} de l'ordre de la dizaine de nM ainsi que des constantes d'inhibitions toutes aussi intéressantes. Le changement de l'atome de brome par un atome de fluor engendre une hausse de l' IC_{50} (**63** : 64.2 nM comparé à **ABT-702** : 1.7 nM). L'ajout d'un atome de fluor en ortho de l'atome de brome augmente aussi l' IC_{50} mais l'affinité est plus intéressante (23.2 nM). Ces résultats ont conduit à l'abandon du radioligand [¹¹C]**62**.

Tableau 13. IC_{50} et constantes d'inhibition des références froides.

Composés	$IC_{50} \pm SEM$ (nM)	$K_i \pm SEM$ (nM)
62	10800 \pm 1400	8340 \pm 1110
63	64.2 \pm 10.9	49.6 \pm 14.5
64	23.2 \pm 2.6	18.0 \pm 2.0
PSB23874	16.8 \pm 0.8	13.0 \pm 0.6
ABT-702	1.7 ¹⁷⁵	

III.2. Imagerie TEP

Le traceur fluoré [^{18}F]63 a été évalué *in vivo* dans un modèle animal de neuroinflammation aïgue. Ce modèle animal (rat) a été développé par injection stéréotaxique de lipopolysaccharides (LPS d'*escherichia coli*) dans le striatum dans un seul hémisphère du cerveau (côté ipsilatéral) en laissant l'autre hémisphère intact (côté contralatéral). Les résultats obtenus ont montré une faible pénétration dans le cerveau mais une fixation au niveau du striatum (Figure 67, cercles noirs). La distinction entre les deux hémisphères du cerveau n'est pas visible sur ces images, ce qui pourrait s'expliquer par la faible dose injectée (12,6 MBq). Ces premiers résultats préliminaires doivent être confirmés avec d'autres expériences TEP.

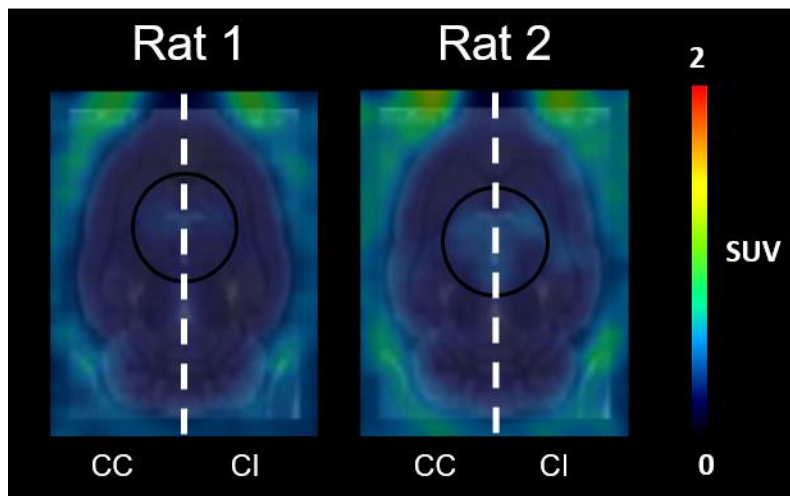


Figure 67. Images microTEP des coupes transversales de cerveaux de rats LPS injectés avec le composé [^{18}F]63 (12.6 MBq), temps d'acquisition de 60 minutes (CC = côté contralatéral ; CI = côté ipsilatéral ; striatum = cercle noir).

IV. Conclusion et perspectives

Deux voies de synthèses pour la formation de la molécule **ABT-702** ont été étudiées. La première voie est une stratégie linéaire en 4 étapes qui ne permet pas d'obtenir le composé **ABT-702**. L'intermédiaire avec la formation du cycle pyrido-pyrimidine n'a pas pu être isolé et ne peut donc pas conduire à **ABT-702**. La deuxième voie est une stratégie convergente qui a conduit au composé **ABT-702** avec un rendement global de synthèse de 29 % en 3 étapes. En se basant sur ce pharmacophore, trois références froides, une pour la radiométhylation (**62**) et deux pour la radiofluoration (**63** et **64**), ont été synthétisées (Figure 68).

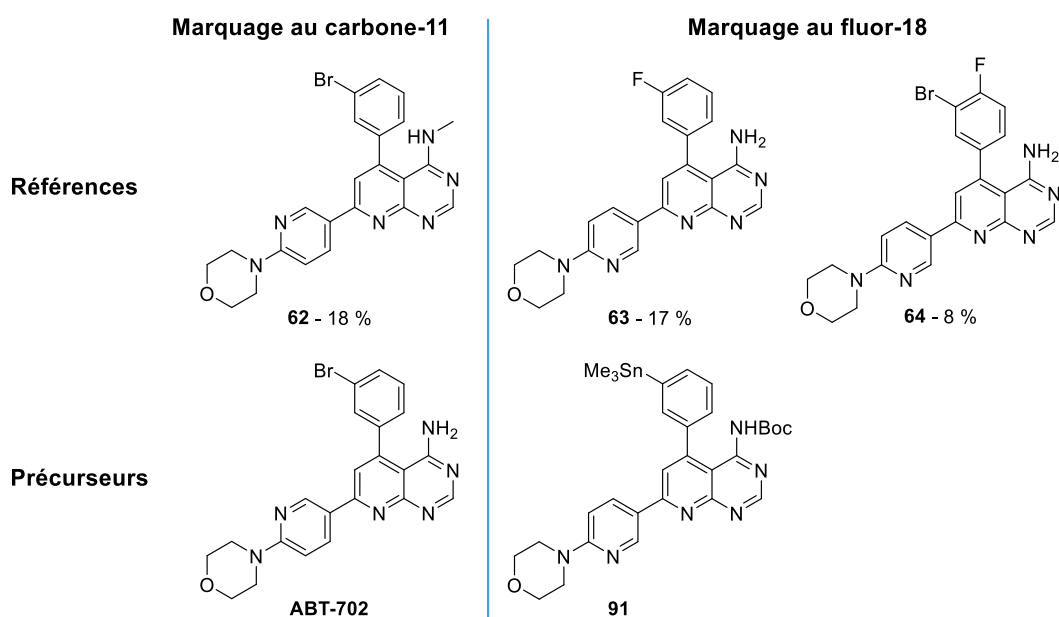


Figure 68. Structures des références froides et des précurseurs de marquage obtenus.

Leur capacité à inhiber la liaison adénosine-adénosine kinase a ensuite été évaluée *in vitro*. La modification de l'amine sur le composé **62** a modifié grandement l'affinité de la molécule pour sa cible, avec une IC_{50} de 10,8 μ M. Les composés fluorés **63** et **64** présentent des IC_{50} de 64.2 et 23.2 nM, respectivement, et ont donc été retenus pour la suite des études sur le développement de nouveaux radiotraceurs. Différents précurseurs de marquage ont été envisagés pour l'insertion d'un atome de fluor-18.

A ce jour, seul le précurseur stannylé **91** a été obtenu et la radiosynthèse de [18 F]**63** à partir de ce précurseur a été optimisée et automatisée. Cependant, la préparation de nouveaux précurseurs de marquage avec des groupements protecteurs différents, comme le groupement benzoyle, pourrait permettre d'optimiser les conditions de radiosynthèse pour l'obtention des radioligands [18 F]**63** et [18 F]**64**. Des résultats préliminaires *in vivo* d'imagerie TEP dans un modèle animal d'inflammation ont montré que le composé traversait faiblement la BHE. Il semble se fixer dans le striatum, mais la différence entre les deux hémisphères n'a pas été détectée. De nouvelles expériences seront réalisées pour confirmer ces résultats.

Conclusions et perspectives

Ces travaux de thèse s'articulent autour de nouveaux radiotraceurs pour l'imagerie TEP de la neuroinflammation. A ce jour, il existe très peu de radiotraceurs capables de mettre en lumière ce phénomène complexe. Ce document rapporte la synthèse de nouveaux radioligands pour deux cibles spécifiques : les cellules microgliales et les astrocytes.

Dans la première partie, nous nous sommes intéressés aux récepteurs P2Y₁₂ qui sont exprimés au niveau des microglies. Une approche de médecine médicamenteuse avait mis en avant un pharmacophore qui avait démontré dans une étude préliminaire des caractéristiques intéressantes telles qu'une haute affinité pour les récepteurs P2Y₁₂ ou encore la possibilité de réaliser un radiomarquage isotopique. A partir de ce pharmacophore, une bibliothèque de huit références fluorées ou méthylées a été synthétisée. Des variations ont été introduites sur différentes fonctions de la molécule : au niveau du noyau aromatique central, du substituant du noyau indole ainsi que du linker de la pipérazine. Ces ligands ont été obtenus par le couplage entre deux synthons fonctionnalisés, un acide carboxylique et une amine aromatique, permettant de conduire à un premier intermédiaire portant un ester méthylique. Après déprotection, l'acide carboxylique obtenu a ensuite été fonctionnalisé avec une pipérazine méthylée ou différents linkers fluorés. Les composés ont été obtenus avec des rendements globaux allant de 3 à 26 % sur 10 étapes de synthèse. Les ligands ont ensuite été testés *in vitro* pour déterminer leur affinité pour les récepteurs P2Y₁₂ selon deux tests : un test de recrutement de la β -arrestine et un test de compétition avec un radioligand tritié. Ces tests ont été réalisés dans la faculté de pharmacie de l'université de Bonn. Le métabolisme de ces composés a également été évalué *in vitro* en utilisant des microsomes humains ou de rat. Ces tests *in vitro* nous ont permis de sélectionner deux composés potentiellement intéressants pour une utilisation en imagerie TEP : le composé méthylé **47** et le composé fluoré **54**. Les précurseurs de marquage des ligands sélectionnés ont ensuite été préparés et radiomarqués, ce qui a conduit, après optimisation et automatisation, aux radiotraceurs [¹¹C]**47** et [¹⁸F]**54** avec des rendements respectifs corrigés de la décroissance de $19,7 \pm 3,5$ % (n = 14) et $16,6 \pm 5,0$ % (n = 3). Ces radioligands ont ensuite été évalués par autoradiographie sur des coupes de cerveaux de différents modèles animaux (modèle AAV surexprimant les récepteurs P2Y₁₂ humains et modèle de sclérose en plaques LPC). En parallèle, ces deux radioligands ont été injectés à des animaux sains et aux animaux modèles AAV afin de déterminer leur biodistribution, leur métabolisme *in vivo* et d'utiliser l'imagerie TEP pour détecter une éventuelle accumulation sur les zones surexprimant le récepteur. Cependant, les résultats obtenus n'ont pas permis de démontrer une spécificité des ligands pour les récepteurs P2Y₁₂. Les études *in vivo* sur le métabolisme du composé [¹⁸F]**54** ont démontré sa bonne stabilité (41 % restant après 60 minutes) mais une faible capacité du radiotraceur à traverser la BHE. Les radiotraceurs basés sur ce pharmacophore ne semblent donc pas être adaptés pour le suivi de la neuroinflammation par imagerie TEP. Il est donc important de trouver de nouveaux motifs moléculaires affins pour

les récepteurs P2Y₁₂ et présentant une bonne capacité à traverser la BHE afin de disposer de nouveaux outils de diagnostic de la neuroinflammation.

Concernant la deuxième partie du travail, nous nous sommes intéressés à l'enzyme adénosine kinase qui est exprimée par les astrocytes. La molécule **ABT-702** est un composé connu capable d'inhiber cette enzyme et de traverser la BHE. Un marquage isotopique sur ce composé n'étant pas réalisable, nous avons envisagé trois structures de radioligands dérivés : une pour un marquage au carbone-11 et deux pour un marquage au fluor-18. Pour l'obtention de ces trois composés, deux voies de synthèse ont été étudiées. Une première voie basée sur une stratégie linéaire n'a pas été concluante. Une stratégie de synthèse convergente a permis d'obtenir le composé souhaité avec un rendement global de 29 % sur 3 étapes. Par la suite, l'application de cette voie de synthèse aux molécules commerciales fluorées et/ou bromées a permis d'obtenir les références froides fluorées. La méthylation de l'amine a été effectuée à partir d'**ABT-702** afin d'obtenir la référence froide méthylée. Ces trois références ont ensuite été évaluées *in vitro* pour déterminer leur capacité à inhiber l'ADK par des collaborateurs à l'université de Bonn. Ces tests ont montré que la modification au niveau de l'amine affectait grandement l'affinité de la molécule pour l'ADK. En ce qui concerne les molécules fluorées, même si l'affinité est diminuée par rapport à **ABT-702**, les valeurs restent dans l'ordre de la dizaine de nanomolaire avec des constantes d'inhibitions intéressantes. De ce fait, seules les molécules fluorées **63** et **64** ont été retenues pour la suite du développement de nouveaux radiotraceurs ciblant l'ADK. Pour cela, l'insertion de l'atome de fluor-18 a été envisagée à partir de plusieurs précurseurs de marquage : un précurseur boronique, un précurseur stannylé et un précurseur de type sel d'iodonium. A ce stade, seul le précurseur stannylé a été obtenu et a permis la radiosynthèse de [¹⁸F]**63** après optimisation et automatisation. Le traceur a été obtenu avec un rendement corrigé de la décroissance de $7,9 \pm 5,0$ % (n = 3). Pour le traceur [¹⁸F]**64**, la préparation des précurseurs de marquage et la mise au point de la radiofluoration restent à réaliser. Des expériences préliminaires sur des modèles animaux d'inflammation (modèle LPS) avec le traceur [¹⁸F]**63** ont permis d'obtenir des premières images *in vivo*. Ces premiers résultats semblent montrer que le composé ne passe que très peu la BHE et se fixe dans le striatum sans distinction des deux hémisphères. De nouvelles expériences TEP seront réalisées pour confirmer ou non ces résultats.

Une autre piste d'étude pour comprendre le phénomène de la neuroinflammation par TEP est basée sur le ciblage des récepteurs à adénosine. Ces récepteurs sont exprimés dans tout le corps, et notamment dans le cerveau. Ils sont divisés en quatre groupes : A₁, A_{2A}, A_{2B} et A₃ et appartiennent tous à la famille des RCPG.¹⁴⁵ Au cours de la neuroinflammation, les récepteurs A_{2A} et A_{2B} sont surexprimés et induisent un signal provoquant un effet toxique pour le cerveau. A ce jour, il existe quelques radiotraceurs ciblant les récepteurs A_{2A} et les récepteurs A_{2B}, mais ces derniers ne sont pas assez affins ou n'ont pas la capacité à traverser la BHE. Issue d'un

brevet¹⁸⁴, la molécule SEL330-639 cible les récepteurs à adénosine A_{2A} (Figure 69) avec une constante d'inhibition de 2.2 nM et les études préliminaires semblent montrer que ce composé peut traverser la BHE.¹⁸⁵ Pour cette molécule, un marquage isotopique est possible, soit au niveau du fluorophényle par radiofluoration d'un précurseur de marquage approprié, soit au niveau de l'amide méthylé pour le marquage au carbone-11. La synthèse de ce composé ainsi que des précurseurs de marquage associés est une option intéressante pour obtenir un radiotracer capable de visualiser la neuroinflammation par imagerie TEP, permettant ainsi le diagnostic et le suivi des maladies neurodégénératives.

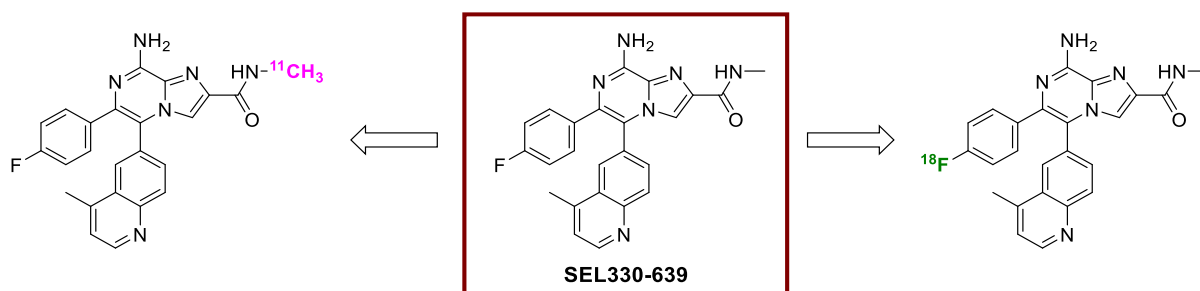


Figure 69. SEL330-639 et les radiotraceurs envisagés marqués au carbone-11 ou au fluor-18.

Partie expérimentale

I. Organic synthesis

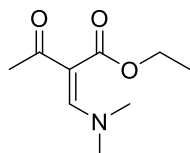
I.1. General procedures

All commercially available reagents and solvents were used without further purification. Unless otherwise stated, reactions were performed under argon atmosphere. Reactions were monitored by TLC (silica gel 60 254F, Merck), visualized thanks to an UV lamp at 254 or 365 nm or revealed by a potassium permanganate, ninhydrin or bromocresol green stain. Purifications of products were carried out by column chromatography using Merck silica gel (63-200 μm) and Flash chromatography purifications were realized with a Puriflash PF-XS 520 Plus (Interchim) device. ^1H NMR (400 MHz) and ^{13}C NMR (100 MHz) were measured on a Bruker Avance 400 MHz spectrometer. All NMR spectra were recorded at 23 °C. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm, δ) downfield from residual solvents peaks and coupling constants are reported in Hertz (Hz). For both ^1H -NMR and ^{13}C -NMR, data are presented as follows: chemical shifts, multiplicity, integration, coupling constant (J in Hz), and attribution. Splitting patterns are designated as singlet (s), doublet (d), triplet (t), quartet (q), sextuplet (sext). Splitting patterns that could not be interpreted or easily visualized are designated as multiplet (m). High-resolution mass spectra (HRMS) of new compounds were performed by the SALSA platform from ICOA laboratory (UMR 7311, Orléans) on a Bruker maXis mass spectrometer coupled to a Dionex Ultimate 3000 HPLC system (Thermo). Low-resolution mass spectra (MS) were measured on a Thermo Electron Ion Trap LCQ Deca XP+ spectrometer (ThermoFischer, France) by electron spray ionization (ESI). Liquid chromatography was performed on Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 x 100 mm, 1.7 μm , Waters, France) using $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (from 5 % of CH_3CN to 100 % over 8 min, 0.1% formic acid) as the mobile phase.

I.2. Experimental procedures

I.2.1. P2Y₁₂ ligands

2-[1-Dimethylamino-methylidene]-3-oxo-butyric acid ethyl ester **5**



Chemical Formula: C₉H₁₅NO₃
Molecular Weight: 185,22 g.mol⁻¹

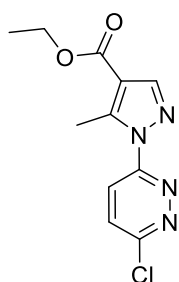
N,N-Dimethylformamide dimethyl acetal (3.9 mL, 30.7 mmol, 1 eq) and 3-oxobutyric acid ethyl ester (4.90 g, 36.8 mmol, 1.2 eq) were stirred at room temperature during 5 h under argon. The reaction mixture was then concentrated under vacuum to afford **5** as an orange oil (5.7 g, quant).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 7.60 (s, 1H, *H*_{C=C}), 4.10 (q, 2H, *J* = 7.0 Hz, *CH*₂), 3.27-2.64 (m, 6H, 2 *CH*₃), 2.13 (s, 3H, *CH*₃), 1.22 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, *CH*₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 192.7 (*C*=O), 167.7 (*C*=O), 155.5 (*C*=CH), 102.3 (*C*=CH), 59.3 (*CH*₂), 39.8 (2 *CH*₃), 28.4 (*CH*₃), 14.2 (*CH*₃).

LC-MS (ESI): *m/z* calculated for C₉H₁₆NO₃ [*M*+*H*]⁺: 186.2; found: 186.1.

Ethyl 1-(6-chloropyridazin-3-yl)-5-methyl-1*H*-pyrazole-4-carboxylate **8**



Chemical Formula: C₁₁H₁₁ClN₄O₂
Molecular Weight: 266,69 g.mol⁻¹

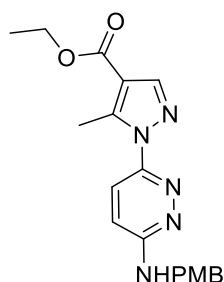
A solution of 3-chloro-6-hydrazinylpyridazine **6** (1.56 g, 10.8 mmol, 1 eq) was added to a solution of **5** (2.00 g, 10.8 mmol, 1 eq) in ethanol (50 mL). The reaction mixture was stirred under reflux for 2 h under argon. Then, the reaction mixture was concentrated to 20 mL and water was added (50 mL). The aqueous phase was extracted with dichloromethane. The organic phase was washed three times with water and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified by silica gel chromatography (n-heptane/EtOAc 8/2) to afford **8** as a white powder (1.28 g, 44 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 8.23 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, *H*_{ar}), 8.20 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.17 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, *H*_{ar}), 4.28 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, *CH*₂), 2.87 (s, 3H, *CH*₃), 1.31 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, *CH*₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 162.5 (C=O), 155.6 (C_{ar}), 155.1 (C_{ar}), 145.5 (C_{ar}), 143.1 (C_{ar}), 131.7 (C_{ar}), 125.5 (C_{ar}), 114.3 (C_{ar}), 60.0 (CH₂), 14.2 (CH₃), 12.7 (CH₃).

HRMS (ESI): m/z calcd for C₁₁H₁₂ClN₄O₂ [M+H]⁺: 267.0643 ; found: 267.0643.

1-[6-(4-Methoxybenzylamino)pyridazin-3-yl]-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxylic Acid Ethyl Ester 11



Chemical Formula: C₁₉H₂₁N₅O₃
Molecular Weight: 367,41 g.mol⁻¹

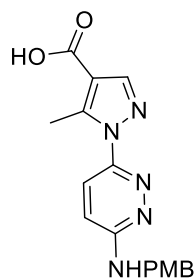
4-Methoxybenzylamine (5.6 mL, 42.84 mmol, 9 eq) was added to a solution of **8** (1.24 g, 4.67 mmol, 1 eq) in dioxane (8 mL). The reaction mixture was stirred under reflux for 24 h. The reaction mixture was quenched with water and the aqueous phase was extracted three times with ethyl acetate. The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated to dryness. The residue was purified on silica gel chromatography (n-heptane/EtOAc 6/4) to afford **11** as a white powder (1.56 g, 91 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 8.04 (s, 1H, H_{ar}), 7.69 (t, 1H, J = 5.7 Hz, NH), 7.62 (d, 1H, J = 9.7 Hz, H_{ar}), 7.32 (d, 2H, J = 8.9 Hz, 2 H_{ar}), 7.09 (d, 1H, J = 9.7 Hz, H_{ar}), 6.91 (d, 2H, J = 8.9 Hz, 2 H_{ar}), 4.54 (d, 2H, J = 5.7 Hz, CH₂), 4.26 (q, 2H, J = 7.0 Hz, CH₂), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 2.68 (s, 3H, CH₃), 1.29 (t, 3H, J = 7.0 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 162.8 (C=O), 158.3 (C_{ar}), 158.3 (C_{ar}), 148.5 (C_{ar}), 143.9 (C_{ar}), 141.6 (C_{ar}), 131.1 (C_{ar}), 128.8 (2 C_{ar}), 124.2 (C_{ar}), 117.3 (C_{ar}), 113.7 (2 C_{ar}), 112.7 (C_{ar}), 59.7 (CH₂), 55.0 (CH₃), 43.9 (CH₂), 14.2 (CH₃), 12.1 (CH₃).

HRMS (ESI): m/z calcd for C₁₉H₂₂N₅O₃ [M+H]⁺: 368.1717; found: 368.1721.

1-[6-(4-methoxybenzylamino)pyridazin-3-yl]-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxylic Acid 13



Chemical Formula: C₁₇H₁₇N₅O₃
Molecular Weight: 339,36 g.mol⁻¹

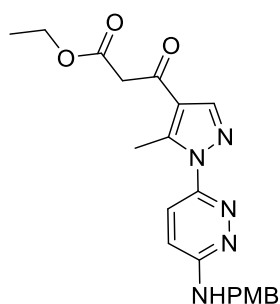
A solution of **11** (1.53 g, 4.17 mmol, 1 eq) in ethanol (30 mL) was added to a solution of potassium hydroxide (1.17 g, 20.9 mmol, 5 eq) in water (13 mL). The reaction mixture was heated at 85 °C for 2 h, concentrated to dryness and the residue was taken up in water (40 mL). A solution of 4 M hydrochloric acid was added to lower the pH to 3-4. The formed precipitate was filtered, washed with water and dried to afford **13** as a white powder (1.41 g, 99 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 9.88 (br s, 1H, NH), 8.11-8.08 (m, 2H, 2 *H*_{ar}), 7.76 (d, 1H, *J* = 9.9 Hz, *H*_{ar}), 7.40 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2 *H*_{ar}), 6.95 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2 *H*_{ar}), 4.65 (s, 2H, CH₂), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 2.76 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 164.1 (C=O), 158.8 (*C*_{ar}), 154.0 (*C*_{ar}), 147.3 (*C*_{ar}), 144.6 (*C*_{ar}), 142.8 (*C*_{ar}), 129.4 (2 *C*_{ar}), 128.5 (*C*_{ar}), 127.7 (*C*_{ar}), 114.5 (*C*_{ar}), 113.9 (3 *C*_{ar}), 55.1 (CH₃), 44.9 (CH₂), 12.2 (CH₃).

HRMS (ESI): m/z calcd for C₁₇H₁₈N₅O₃ [M+H]⁺: 340.1404 ; found 340.1404.

*3-(1-((4-methoxybenzyl)amino)pyridazin-3-yl)-5-methyl-1H-pyrazol-4-yl)-3-oxopropionic Acid Ethyl Ester **15***



Chemical Formula: C₂₁H₂₃N₅O₄
Molecular Weight: 409,45 g.mol⁻¹

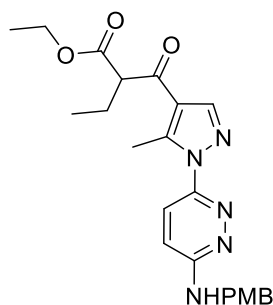
Carbonyldiimidazole (632 mg, 3.92 mmol, 1.5 eq) was added portion wise to a solution of **13** (1.0 g, 2.95 mmol, 1 eq) in THF (30 mL). The solution was stirred for 12 h at room temperature. Anhydrous magnesium chloride (565 mg, 5.9 mmol, 2 eq) and ethyl potassium malonate (1.01 g, 5.9 mmol, 2 eq) were then added. The reaction mixture was heated at 55 °C for 3 h. The mixture was then cooled down, concentrated under vacuum and a 0.1 M sodium hydroxide solution was added. The aqueous phase was extracted three times with ethyl acetate. The combined organic phases were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified on silica gel chromatography (n-heptane/EtOAc 5/5) to afford **15** as a yellow oil (769 mg, 64 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 8.30 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.72 (t, 1H, *J* = 5.9 Hz, NH), 7.62 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz, *H*_{ar}), 7.32 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz, 2 *H*_{ar}), 7.09 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz, *H*_{ar}), 6.91 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz, 2 *H*_{ar}), 4.54 (d, 2H, *J* = 5.9 Hz, CH₂), 4.12 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 4.00 (s, 2H, CH₂), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 2.67 (s, 3H, CH₃), 1.20 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz): 188.1 (C=O), 167.5 (C=O), 158.4 (C_{ar}), 158.3 (C_{ar}), 148.2 (C_{ar}), 143.7 (C_{ar}), 142.6 (C_{ar}), 131.1 (C_{ar}), 128.9 (2 C_{ar}), 124.4 (C_{ar}), 120.3 (C_{ar}), 117.3 (C_{ar}), 113.7 (2 C_{ar}), 60.5 (CH_2), 55.0 (CH_3), 47.5 (CH_2), 43.9 (CH_2), 14.0 (CH_3), 12.3 (CH_3).

HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 410.1823; found: 410.1822.

2-(1-{6-(4-methoxybenzyl)amino-pyridazin-3-yl}-5-methyl-1H-pyrazole-4-carbonyl)butyric Acid Ethyl Ester 17



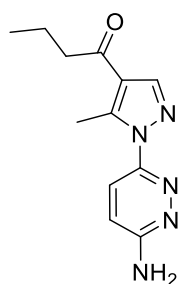
Chemical Formula: $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_4$
Molecular Weight: 437,50 g.mol $^{-1}$

Cesium carbonate (673 mg, 2.07 mmol, 1.1 eq) and ethyl iodide (0.17 mL, 2.07 mmol, 1.1 eq) were added to a solution of **15** (769 mg, 1.88 mmol, 1 eq) in DMF (17 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h under argon. It was then washed with a solution of LiCl (5 % w/w) and the aqueous phase was extracted three times with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified on silica gel chromatography (n-heptane/ EtOAc 6/4) to afford **17** as a yellow oil (717 mg, 87 %).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): 8.38 (s, 1H, H_{ar}), 7.73 (t, 1H, $J = 5.9$ Hz, NH), 7.63 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz, H_{ar}), 7.32 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz, 2 H_{ar}), 7.10 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz, H_{ar}), 6.92 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz, 2 H_{ar}), 4.55 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz, CH_2), 4.28 (t, 1H, $J = 7.0$ Hz, CH), 4.10 (q, 2H, $J = 7.0$ Hz, CH_2), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 2.67 (s, 3H, CH_3), 1.89-1.81 (m, 2H, CH_2), 1.15 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, CH_3), 0.91 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz): 190.7 (C=O), 169.6 (C=O), 158.4 (C_{ar}), 158.3 (C_{ar}), 148.1 (C_{ar}), 144.1 (C_{ar}), 142.3 (C_{ar}), 131.3 (C_{ar}), 128.9 (2 C_{ar}), 124.4 (C_{ar}), 120.3 (C_{ar}), 117.3 (C_{ar}), 113.7 (2 C_{ar}), 60.6 (CH_2), 56.7 (CH), 55.0 (OCH_3), 43.9 (CH_2), 21.9 (CH_2), 14.0 (CH_3), 12.4 (CH_3), 11.6 (CH_3).

HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 438.2136; found: 438.2138.

1-(1-(6-aminopyridazin-3-yl)-5-methyl-1H-pyrazol-4-yl)butan-1-one 19

Chemical Formula: C₁₂H₁₅N₅O

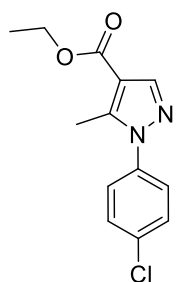
Molecular Weight: 245,29 g.mol⁻¹

A solution of **17** (809 mg, 1.85 mmol) in 37 % HCl (5 mL) was refluxed for 4 h. After cooling to room temperature, water (20 mL) was added and was washed twice with ethyl acetate (2 x 15 mL). A solution of 10 M potassium hydroxide was then added until pH ~ 12 was reached. The aqueous phase was extracted three times with ethyl acetate (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum to afford **19** as a white solid (332 mg, 79%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 8.29 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.60 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, *H*_{ar}), 7.00 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, *H*_{ar}), 6.78 (s, 2H, NH₂), 2.82 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂), 2.65 (s, 3H, CH₃), 1.63 (sext, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂), 0.93 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 195.6 (C=O), 160.5 (C_{ar}), 148.1 (C_{ar}), 142.8 (C_{ar}), 142.0 (C_{ar}), 124.9 (C_{ar}), 120.7 (C_{ar}), 116.4 (C_{ar}), 42.1 (CH₂), 17.3 (CH₂), 13.6 (CH₃), 12.2 (CH₃).

LC-MS (ESI): m/z calculated for C₁₂H₁₆N₅O [M+H]⁺: 245.13, found 246.08

Ethyl 1-(1-(6-chlorophenyl-3-yl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxylate 9

Chemical Formula: C₁₃H₁₃ClN₂O₂

Molecular Weight: 264,71 g.mol⁻¹

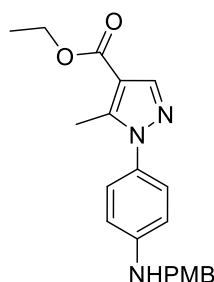
To a solution of **5** (2.6 g, 14.0 mmol, 1 eq) in EtOH (65 mL) under argon was added 4-chlorophenylhydrazine **7** (2.0 g, 14.0 mmol, 1 eq). The resulting mixture was refluxed for 3 h. The reaction mixture was then concentrated and water (10 mL) was added. The aqueous layer was extracted three times with DCM (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was then purified on silica gel chromatography (n-heptane /EtOAc 9/1) to afford **9** as a brown solid (2.76 g, 74 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 8.03 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.64-7.59 (m, 4H, 4 *H*_{ar}), 4.26 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH₂), 2.53 (s, 3H, CH₃), 1.30 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 162.8 (C=O), 143.6 (C_{ar}), 141.5 (C_{ar}), 137.3 (C_{ar}), 133.1 (C_{ar}), 129.3 (2 C_{ar}), 127.0 (2 C_{ar}), 112.4 (C_{ar}), 59.6 (CH₂), 14.2 (CH₃), 11.5 (CH₃).

HRMS (ESI): m/z calcd for C₁₃H₁₄ClN₂O₂ [M+H]⁺: 265.0738; found: 265.0740.

1-[6-(4-Methoxybenzylamino)phenyl-3-yl]-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxylic Acid Ethyl Ester 12



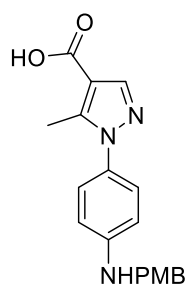
Chemical Formula: C₂₁H₂₃N₃O₃
Molecular Weight: 365,43 g.mol⁻¹

THF (12 mL) was added to **9** (482 mg, 1.82 mmol, 1 eq) in a flame dried reaction vessel under argon. Palladium diacetate (35 mg, 0.16 mmol, 0.09 eq), (±)-binap (257 mg, 0.41 mmol, 0.22 eq), cesium carbonate (2.79 g, 8.56 mmol, 4.7 eq) and *p*-methoxybenzyl amine (0.36 mL, 2.73 mmol, 1.5 eq) were added to the mixture. The reaction vessel was then sealed and heated at 100 °C during 43 h. The resulting suspension was filtered over celite and washed with ethyl acetate. Water (35 mL) was added and the aqueous phase was extracted three times with ethyl acetate (3 x 20 mL). The combined organic phases were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified on silica gel chromatography (n-heptane/EtOAc 9/1 to 7/3) to afford **12** (683 mg, 92 %) as a yellow powder.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 7.90 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.30 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, 2 *H*_{ar}), 7.15 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, 2 *H*_{ar}), 6.91 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, 2 *H*_{ar}), 6.67 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, 2 *H*_{ar}), 6.61 (t, 1H, *J* = 5.9 Hz, NH), 4.26-4.21 (m, 4H, 2 CH₂), 3.73 (s, 3H, OCH₃) 2.41 (s, 3H, CH₃), 1.28 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 163.0 (C=O), 158.2 (C_{ar}), 148.8 (C_{ar}), 143.0 (C_{ar}), 140.4 (C_{ar}), 131.5 (C_{ar}), 128.4 (2 C_{ar}), 126.9 (C_{ar}), 126.3 (2 C_{ar}), 113.7 (2 C_{ar}), 111.8 (2 C_{ar}), 111.3 (C_{ar}), 59.4 (CH₂), 55.0 (CH₃), 45.8 (NCH₂), 14.3 (CH₃), 11.5 (CH₃).

HRMS (ESI): m/z calcd for C₂₁H₂₄N₃O₃ [M+H]⁺: 366.1812; found: 366.1812.

1-[6-(4-methoxybenzylamino)phenyl-3-yl]-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxylic Acid 14

Chemical Formula: C₁₉H₁₉N₃O₃

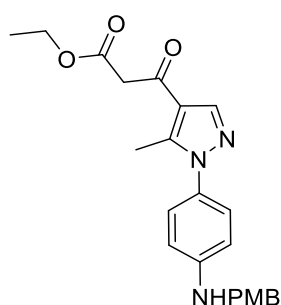
Molecular Weight: 337,38 g.mol⁻¹

A solution of **12** (630 mg, 1.72 mmol, 1 eq) in ethanol (15 mL) was added to a solution of potassium hydroxide (483 mg, 8.6 mmol, 5 eq) in water (6 mL). The reaction mixture was heated at 80 °C for 2 h, concentrated to dryness and the residue was taken up in water (10 mL). A solution of 4 M HCl was added to the mixture to lower the pH to 1. The formed precipitate was filtered, washed with water and dried to afford **14** as a white powder (587 mg, 94 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 12.29 (s, 1H, COOH), 7.85 (s, 1H, H_{ar}), 7.30 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz, 2 H_{ar}), 7.14 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz, 2 H_{ar}), 6.91 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz, 2 H_{ar}), 6.66 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz, 2 H_{ar}), 6.60 (t, 1H, *J* = 6.0 Hz, NH), 4.24 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz, CH₂), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 2.39 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 164.6 (C=O), 158.2 (C_{ar}), 148.8 (C_{ar}), 142.8 (C_{ar}), 140.7 (C_{ar}), 131.5 (C_{ar}), 128.4 (2 C_{ar}), 127.1 (C_{ar}), 126.2 (2 C_{ar}), 113.7 (2 C_{ar}), 112.0 (C_{ar}), 111.8 (2 C_{ar}), 55.0 (OCH₃), 45.8 (NCH₂), 11.4 (CH₃).

HRMS (ESI): m/z calcd for C₁₉H₂₀N₃O₃ [M+H]⁺ : 338.1499 ; found: 338.1503.

3-(1-{(4-methoxybenzyl)amino-phenyl-3-yl}-5-methyl-1H-pyrazol-4-yl)-3-oxopropionic Acid Ethyl Ester 16

Chemical Formula: C₂₃H₂₅N₃O₄

Molecular Weight: 407,47 g.mol⁻¹

Carbonyldiimidazole (414 mg, 2.55 mmol, 1.5 eq) was added portion wise to a solution of **14** (535 mg, 1.70 mmol, 1 eq) in THF (30 mL). The solution was stirred for 12 h at room temperature. Anhydrous magnesium chloride (648 mg, 6.8 mmol, 4 eq) and ethyl potassium malonate (1.16 g, 6.8 mmol, 4 eq) were then added. The reaction mixture was heated at 55 °C for 7 h, cooled down, concentrated under vacuum and a 0.1 M solution of sodium hydroxide

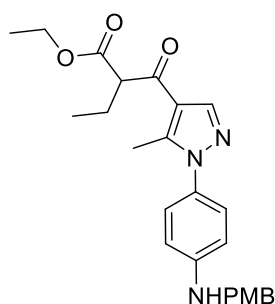
was added. The aqueous phase was extracted three times with ethyl acetate. The combined organic phases were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel chromatography (n-heptane/EtOAc 7/3 to 6/4) to afford **16** as a white solid (452 mg, 85 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 8.16 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.30 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz, 2 *H*_{ar}), 7.15 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz, 2 *H*_{ar}), 6.91 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz, 2 *H*_{ar}), 6.67 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz, 2 *H*_{ar}), 6.63 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz, *NH*), 4.24 (d, 2H, *J* = 5.8 Hz, *CH*₂), 4.12 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, *CH*₂), 3.95 (s, 2H, *CH*₂), 3.73 (s, 3H, *OCH*₃), 2.41 (s, 3H, *CH*₃), 1.20 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, *CH*₃).

¹³C-NMR: (DMSO-d₆, 100 MHz): 187.8 (*C=O*), 167.6 (*C=O*), 158.2 (*C*_{ar}), 148.9 (*C*_{ar}), 142.8 (*C*_{ar}), 141.6 (*C*_{ar}), 131.4 (*C*_{ar}), 128.4 (2 *C*_{ar}), 126.5 (*C*_{ar}), 126.2 (2 *C*_{ar}), 119.3 (*C*_{ar}), 113.7 (2 *C*_{ar}), 111.9 (2 *C*_{ar}), 60.5 (*CH*₂), 55.0 (*OCH*₃), 47.2 (*CH*₂), 45.7 (*NCH*₂), 14.0 (*CH*₃), 11.9 (*CH*₃).

HRMS: *m/z* calculated for C₂₃H₂₆N₃O₄ [*M*+*H*]⁺: 408.1918 ; found: 408.1916.

2-(1-{6-(4-methoxybenzyl)amino-phenyl-3-yl}-5-methyl-1H-pyrazole-4-carbonyl)butyric Acid Ethyl Ester 18



Chemical Formula: C₂₅H₂₉N₃O₄
Molecular Weight: 435,52 g.mol⁻¹

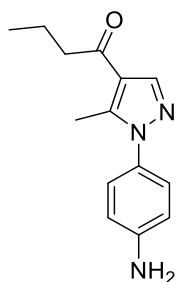
Cesium carbonate (590 mg, 1.81 mmol, 1.5 eq) and ethyl iodide (0.15 mL, 1.81 mmol, 1.5 eq) were added to a solution of **16** (440 mg, 1.21 mmol, 1 eq) in DMF (12 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h under argon. It was then concentrated under vacuum, washed with a solution of LiCl (5 % w/w) and the aqueous phase was extracted three times with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified on silica gel chromatography (n-heptane/ EtOAc 9/1 to 8/2) to afford **18** as a white solid (250 mg, 94 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 8.24 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.30 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, 2 *H*_{ar}), 7.16 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, 2 *H*_{ar}), 6.91 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, 2 *H*_{ar}), 6.67 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, 2 *H*_{ar}), 6.63 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz, *NH*), 4.24 (d, 2H, *J* = 5.8 Hz, *CH*₂), 4.21 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz, *CH*), 4.09 (qd, 2H, *J* = 7.3, *J* = 2.3 Hz, *CH*₂), 3.73 (s, 3H, *OCH*₃), 2.42 (s, 3H, *CH*₃), 1.89-1.76 (m, 2H, *CH*₂), 1.15 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, *CH*₃), 0.90 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, *CH*₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ 190.3 (C=O), 169.7 (C=O), 158.2 (C_{ar}), 148.9 (C_{ar}), 143.1 (C_{ar}), 141.3 (CH_{ar}), 131.4 (C_{ar}), 128.4 (2 CH_{ar}), 126.5 (C_{ar}), 126.2 (2 CH_{ar}), 119.3 (C_{ar}), 113.7 (2 CH_{ar}), 111.8 (2 CH_{ar}), 60.5 (CH₂), 56.6 (CH), 55.0 (OCH₃), 45.7 (NCH₂), 22.0 (CH₂), 14.0 (CH₃), 12.0 (CH₃), 11.7 (CH₃).

HRMS (ESI): m/z calcd for C₂₅H₃₀N₃O₄ [M+H]⁺ : 436.2231 ; found: 436.2228.

1-(1-(6-aminophenyl-3-yl)-5-methyl-1H-pyrazol-4-yl)butan-1-one 20



Chemical Formula: C₁₄H₁₇N₃O
Molecular Weight: 243,31 g.mol⁻¹

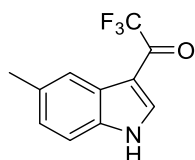
A solution of **18** (238 mg, 0.55 mmol, 1 eq) in 37 % HCl (4 mL) was heated during 4 h under reflux. After cooling to room temperature, water (10 mL) was added and the reaction mixture was washed twice with ethyl acetate (2 x 10 mL). A solution of 10 M potassium hydroxide was then added until pH ~9-10 was reached. The aqueous phase was extracted three times with ethyl acetate (3 x 15 mL). The combined organic layers were dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum to afford **20** as a white solid (134 mg, quant).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 8.14 (s, 1H, H_{ar}), 7.09 (d, 2H, J = 8.6 Hz, 2 H_{ar}), 6.65 (d, 2H, J = 8.6 Hz, 2 H_{ar}), 5.47 (s, 2H, NH₂), 2.78 (t, 2H, J = 7.4 Hz, CH₂), 2.42 (s, 3H, CH₃), 1.62 (sext, 2H, J = 7.4 Hz, CH₂), 0.93 (t, 3H, J = 7.4 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 195.3 (C=O), 149.2 (C_{ar}), 141.9 (C_{ar}), 140.9 (C_{ar}), 126.6 (C_{ar}), 126.3 (2 C_{ar}), 119.8 (C_{ar}), 113.4 (2 C_{ar}), 41.8 (CH₂), 17.4 (CH₂), 13.7 (CH₃), 11.8 (CH₃).

LC-MS (ESI): m/z calculated for C₁₄H₁₈N₃O [M+H]⁺: 244.1; found: 244.2.

1-(5-methyl-1H-indol-3-yl)-2,2,2-trifluoroethanone 24



Chemical Formula: C₁₁H₈F₃NO
Molecular Weight: 227,19 g.mol⁻¹

Trifluoroacetic anhydride (2.65 mL, 19 mmol, 2.5 eq) in diethyl ether (5 mL) was added dropwise to an ice-cold solution of 5-methylindole **21** (1.0 g, 7.62 mmol, 1 eq) in diethyl ether

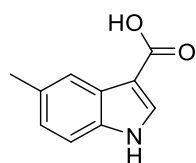
(15 mL). After 2 h at 0 °C, the precipitate was filtered, rinsed with diethyl ether and **24** was obtained as a white powder (1.40 g, 83 %).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): 12.61 (s, 1H, *NH*), 8.43 (m, 1H, *H_{ar}*), 8.00 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz, *H_{ar}*), 7.47 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, *H_{ar}*), 7.17 (dd, 1H, *J* = 8.3, 1.4 Hz, *H_{ar}*), 2.44 (s, 3H, *CH*₃).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): 173.7 (q, *J* = 33.4 Hz, *C*=O), 137.3 (q, *J* = 4.5 Hz, *C_{ar}*), 134.9 (*C_{ar}*), 132.6 (*C_{ar}*), 126.0 (*C_{ar}*), 125.7 (*C_{ar}*), 120.8 (*C_{ar}*), 116.9 (q, *J* = 292.3 Hz, *CF*₃), 112.6 (*C_{ar}*), 108.5 (*C_{ar}*), 21.2 (*CH*₃).

LC-MS (ESI): *m/z* calculated for C₁₁H₇F₃NO [M-H]⁻: 226.1; found: 226.1

5-methyl-1*H*-indole-3-carboxylic Acid **26**



Chemical Formula: C₁₀H₉NO₂
Molecular Weight: 175,19 g.mol⁻¹

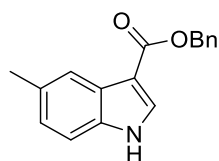
24 (1.35 g, 5.94 mmol, 1 eq) was added to a solution of potassium hydroxide (2.00 g, 35.6 mmol, 6 eq) in water (4 mL) and refluxed for 8 h. The reaction mixture was cooled, diluted with water (10 mL) and washed with diethyl ether (2 x 10 mL). The aqueous phase was neutralized with a solution of 4 M hydrochloric acid. The precipitate was filtered, washed with water and dried under vacuum. **26** was obtained as a white powder (811 mg, 78 %).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): 11.86 (s, 1H, *OH* or *NH*), 11.69 (s, 1H, *OH* or *NH*), 7.93 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz, *H_{ar}*), 7.80 (m, 1H, *H_{ar}*), 7.34 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, *H_{ar}*), 7.01 (dd, 1H, *J* = 8.3, 1.6 Hz, *H_{ar}*), 2.40 (s, 3H, *CH*₃).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): 165.9 (*C*=O), 134.7 (*C_{ar}*), 132.1 (*C_{ar}*), 129.6 (*C_{ar}*), 126.2 (*C_{ar}*), 123.6 (*C_{ar}*), 120.2 (*C_{ar}*), 111.8 (*C_{ar}*), 106.8 (*C_{ar}*), 21.3 (*CH*₃).

LC-MS (ESI): *m/z* calculated for C₁₀H₈NO₂ [M-H]⁻: 174.06; found: 174.02.

Benzyl 5-methyl-1*H* indole-3 carboxylate **26-OBn**



Chemical Formula: C₁₇H₁₅NO₂
Molecular Weight: 265,31 g.mol⁻¹

Trifluoroacetic anhydride (238 μL, 1.71 mmol, 1.5 eq) was added slowly to a solution of **26** (200 mg, 1.14 mmol, 1 eq) in DCM (5.5 mL). The solution was stirred at room temperature for

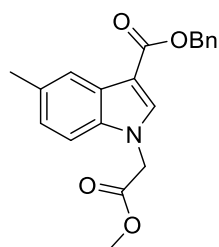
2 h. Benzyl alcohol (118 μL , 1.14 mmol, 1 eq) was added and the reaction mixture was stirred for 3 h. The reaction mixture was then diluted in DCM and washed with 2 M Na_2CO_3 . The organic layer was filtered over celite and concentrated to obtain product **26-OBn** as a greyish powder (242 mg, 83 %).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): 11.83 (s, 1H, NH), 8.05 (s, 1H, H_{ar}), 7.80 (m, 1H, H_{ar}), 7.49-7.31 (m, 6H, 6 H_{ar}), 7.03 (dd, 1H, $J = 8.3$, $J = 1.6$ Hz, H_{ar}), 5.32 (s, 2H, CH_2), 2.39 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz): 164.1 ($\text{C}=\text{O}$), 137.1 (C_{ar}), 134.7 (C_{ar}), 132.6 (C_{ar}), 130.0 (C_{ar}), 128.4 (2 C_{ar}), 127.8 (C_{ar}), 127.7 (2 C_{ar}), 125.9 (C_{ar}), 123.9 (C_{ar}), 120.0 (C_{ar}), 112.0 (C_{ar}), 105.7 (C_{ar}), 64.3 (OCH_2), 21.3 (CH_3).

HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 266.1176; found: 266.1173.

Benzyl 1-(2-methoxy-2-oxoethyl)-5-methyl-1H-indole-3-carboxylate 30



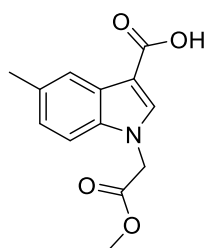
Chemical Formula: $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_4$
Molecular Weight: 337,38 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of **26-OBn** (646 mg, 2.43 mmol, 1 eq) in DMF (5 mL) was added K_2CO_3 (671 mg, 4.86 mmol, 2 eq) and methyl bromoacetate (276 μL 2.92 mmol, 1.2 eq). The reaction mixture was stirred at 80 $^\circ\text{C}$ for 2 h. The reaction mixture was filtered, diluted in EtOAc and washed with an aqueous LiCl solution (5 % w/w). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , evaporated and the crude product was purified by silica gel chromatography (n-heptane/ EtOAc 8/2 to 7/3) to afford **30** (713 mg, 87 %).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): 8.13 (s, 1H, H_{ar}), 7.82 (m, 1H, H_{ar}), 7.49-7.32 (m, 6H, 6 H_{ar}), 7.07 (dd, 1H, $J = 8.6$, $J = 1.8$ Hz, H_{ar}), 5.33 (s, 2H, CH_2), 5.22 (s, 2H, CH_2), 3.68 (s, 3H, OCH_3), 2.41 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz): 168.8 ($\text{C}=\text{O}$), 163.7 ($\text{C}=\text{O}$), 136.9 (C_{ar}), 136.5 (C_{ar}), 135.3 (C_{ar}), 130.7 (C_{ar}), 128.4 (2 C_{ar}), 127.9 (C_{ar}), 127.8 (2 C_{ar}), 126.2 (C_{ar}), 124.2 (C_{ar}), 120.2 (C_{ar}), 110.6 (C_{ar}), 105.5 (C_{ar}), 64.6 (OCH_2), 52.2 (OCH_3), 47.2 (CH_2), 21.2 (CH_3).

HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 338.1387; found: 338.1392.

5-methyl-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)-1H-indole-3-carboxylic Acid 32

Chemical Formula: C₁₃H₁₃NO₄

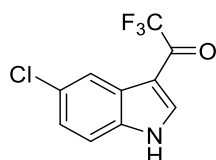
Molecular Weight: 247,25 g.mol⁻¹

30 (713 mg, 2.11 mmol, 1 eq) was dissolved in THF (20 mL) under argon. 10 % Pd/C (285 mg) was added and the mixture was stirred under H₂ atmosphere for 2 h. The reaction mixture was filtered over celite, washed with EtOAc and MeOH. The solvent was removed *in vacuo* to give the expected product **32** as a greyish powder (499 mg, 96 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 11.90 (s, 1H, COOH), 7.98 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.82 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz, *H*_{ar}), 7.36 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, *H*_{ar}), 7.05 (dd, 1H, *J* = 8.3, *J* = 1.5 Hz, *H*_{ar}), 5.20 (s, 2H, CH₂), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 168.9 (C=O), 165.6 (C=O), 136.1 (C_{ar}), 135.3 (C_{ar}), 130.3 (C_{ar}), 126.5 (C_{ar}), 123.9 (C_{ar}), 120.4 (C_{ar}), 110.3 (C_{ar}), 106.7 (C_{ar}), 52.2 (OCH₃), 47.1 (CH₂), 21.1 (CH₃).

HRMS (ESI): m/z calcd for C₁₃H₁₄NO₄ [M+H]⁺ : 248.0917; found 248.0922.

1-(5-Chloro-1H-indol-3-yl)-2,2,2-trifluoroethanone 23

Chemical Formula: C₁₀H₅ClF₃NO

Molecular Weight: 247,60 g.mol⁻¹

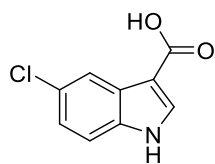
Trifluoroacetic anhydride (3.5 mL, 26.4 mmol, 2 eq) in diethyl ether (12 mL) was added dropwise to an ice-cold solution of 5-chloroindole **10** (2.0 g, 13.2 mmol, 1 eq) in diethyl ether (25 mL). The reaction mixture was stirred for 5 h at 0 °C. The formed precipitate was filtered and rinsed with diethyl ether. **23** was obtained as a white powder (2.72 g, 82 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 12.87 (s, 1H, NH), 8.56 (m, 1H, *H*_{ar}), 8.13 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, *H*_{ar}), 7.61 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, *H*_{ar}), 7.37 (dd, *J* = 8.6, *J* = 2.2 Hz, *H*_{ar}).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 173.7 (q, *J* = 33.9 Hz, C=O), 138.7 (q, *J* = 4.5 Hz, C_{ar}), 135.2 (C_{ar}), 128.1 (C_{ar}), 126.9 (C_{ar}), 124.4 (C_{ar}), 120.2 (C_{ar}), 116.6 (q, *J* = 292.3 Hz, CF₃), 114.7 (C_{ar}), 108.4 (C_{ar}).

LC-MS (ESI): m/z calculated for C₁₀H₄ClF₃NO₂ [M-H]⁻: 246.0, found: 246.1.

5-Chloro-1H-indole-3-carboxylic Acid **25**



Chemical Formula: C₉H₆ClNO₂
Molecular Weight: 195,60 g.mol⁻¹

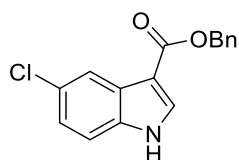
23 (2.69 g, 10.9 mmol, 1 eq) was added to a solution of potassium hydroxide (3.09 g, 54.9 mmol, 5.5 eq) in water (12 mL) and then refluxed for 2 h. The reaction mixture was cooled, diluted with water (10 mL) and washed with diethyl ether (3 x 15 mL). The aqueous phase was cooled to 5 °C and neutralized with a solution of 4 M hydrochloric acid. The precipitate was filtered, washed with water and dried under vacuum. **25** was obtained as a white powder (1.86 g, 93 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 12.13 (s, 1H, OH or NH), 12.00 (s, 1H, OH or NH), 8.07 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz, *H*_{ar}), 7.96 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, *H*_{ar}), 7.48 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, *H*_{ar}), 7.20 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.2 Hz, *H*_{ar}).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 165.5 (C=O), 134.9 (C_{ar}), 133.7 (C_{ar}), 127.1 (C_{ar}), 125.7 (C_{ar}), 122.2 (C_{ar}), 119.6 (C_{ar}), 113.9 (C_{ar}), 107.1 (C_{ar}).

LC-MS (ESI): m/z calculated for C₉H₅ClNO₂ [M-H]⁻: 194.0, 196.0; found: 194.1, 196.0.

Benzyl 5-chloro-1H-indole-3-carboxylate **25-OBn**



Chemical Formula: C₁₆H₁₂ClNO₂
Molecular Weight: 285,73 g.mol⁻¹

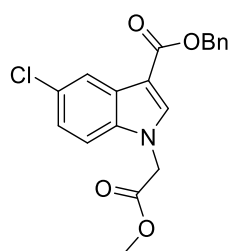
Trifluoroacetic anhydride (1.44 mL, 10.35 mmol, 1.5 eq) was added slowly to a solution of **25** (1.35 g, 6.90 mmol, 1 eq) in DCM (20 mL). The solution was stirred at room temperature for 2 h. Benzyl alcohol (1.07 mL, 10.35 mmol, 1.5 eq) was added and the reaction mixture was stirred for 3 h. Then, the reaction mixture was diluted in DCM and washed with 2 M Na₂CO₃. The organic layer was filtered over celite and concentrated to obtain **25-OBn** as a white powder without further purification (1.96 g, 99 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 12.18 (s, 1H, NH), 8.22 (d, 1H, *J* = 3.1 Hz, *H*_{ar}), 7.95 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, *H*_{ar}), 7.52-7.31 (m, 6H, 6 *H*_{ar}), 7.23 (dd, 1H, *J* = 8.7, *J* = 2.1 Hz, *H*_{ar}), 5.34 (s, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 163.8 (C=O), 136.9 (C_{ar}), 134.9 (C_{ar}), 134.3 (C_{ar}), 128.5 (2 C_{ar}), 127.9 (C_{ar}), 127.8 (2 C_{ar}), 126.8 (C_{ar}), 126.1 (C_{ar}), 122.5 (C_{ar}), 119.5 (C_{ar}), 114.1 (C_{ar}), 106.0 (C_{ar}), 64.7 (CH₂).

HRMS (ESI): m/z calcd for C₁₆H₁₃ClNO₂ [M+H]⁺: 286.0629; found: 286.0629.

Benzyl 5-chloro-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)-1H-indole-3-carboxylate 29



Chemical Formula: C₁₉H₁₆ClNO₄
Molecular Weight: 357,79 g.mol⁻¹

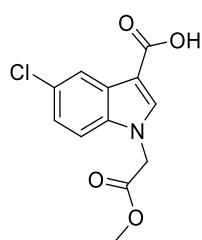
To a solution of **25-OBn** (376 mg, 1.02 mmol, 1 eq) in DMF (2.5 mL) was added K₂CO₃ (281 mg, 2.04 mmol, 2 eq) and methyl bromoacetate (114 μL, 1.22 mmol, 1.2 eq). The reaction mixture was stirred at 80 °C for 2 h. The reaction mixture was then filtered, diluted in EtOAc and washed with an aqueous LiCl solution (5 % w/w). The organic layer was dried over Na₂SO₄, evaporated and the crude product was purified by silica gel chromatography (n-heptane/EtOAc 8/2 to 2/1) to afford **29** as a white powder (253 mg, 69 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 8.27 (s, 1H, H_{ar}), 7.98 (d, 1H, J = 2.2 Hz, H_{ar}), 7.60 (d, 1H, J = 8.8 Hz, H_{ar}), 7.49-7.33 (m, 5H, 5 H_{ar}), 7.29 (dd, 1H, J = 8.8, J = 2.2 Hz, H_{ar}), 5.34 (s, 2H, OCH₂), 5.28 (s, 2H, NCH₂), 3.69 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 168.6 (C=O), 163.3 (C=O), 137.9 (C_{ar}), 136.6 (C_{ar}), 135.5 (C_{ar}), 128.5 (2 C_{ar}), 128.0 (C_{ar}), 127.9 (2 C_{ar}), 127.0 (C_{ar}), 126.7 (C_{ar}), 122.8 (C_{ar}), 119.6 (C_{ar}), 112.9 (C_{ar}), 105.7 (C_{ar}), 64.9 (CH₂), 52.3 (CH₃), 47.4(CH₂).

HRMS (ESI): m/z calcd for C₁₉H₁₇ClNO₄ [M+H]⁺: 358.0841; found: 358.0837

5-chloro-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)-1H-indole-3-carboxylic acid 31



Chemical Formula: C₁₂H₁₀ClNO₄
Molecular Weight: 267,67 g.mol⁻¹

29 (394 mg, 1.10 mmol, 1 eq) was dissolved in THF (5 mL) under argon. 10 % Pd/C (158 mg) was added and the mixture was stirred under H₂ atmosphere. The reaction was closely

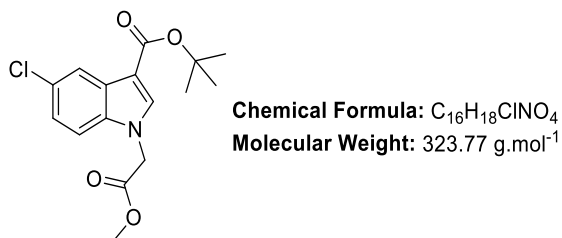
monitored by LC/MS in order to avoid the formation of the de-halogenated side-product. The reaction mixture was then filtered over celite and washed with EtOAc. The solvent was removed *in vacuo* and the crude product was purified over C-18 silica gel (H₂O/MeCN 100/0 to 45/55 + 0.01 % TFA) to give **31** (220 mg, 78%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 12.28 (s, 1H, COOH), 8.13 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.99 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, *H*_{ar}), 7.57 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, *H*_{ar}), 7.26 (dd, 1H, *J* = 8.7, *J* = 2.0 Hz, *H*_{ar}), 5.27 (s, 2H, CH₂), 3.70 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 168.7 (C=O), 165.1 (C=O), 137.5 (C_{ar}), 135.5 (C_{ar}), 127.3 (C_{ar}), 126.4 (C_{ar}), 122.4 (C_{ar}), 119.8 (C_{ar}), 112.6 (C_{ar}), 106.9 (C_{ar}), 52.3 (CH₃), 47.3 (CH₂).

HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₁₂H₁₁ClNO₄ [M+H]⁺ : 268.0371 ; found: 268.0370.

5-Chloro-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)-1H-indole-3-carboxylic Acid *tert*-Butyl Ester **27**



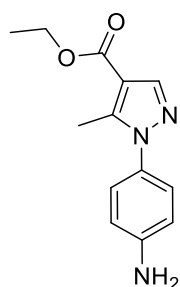
To a solution of **25** (517 mg, 2.64 mmol, 1 eq) in toluene (21 mL) was added *N,N*-dimethylformamide di-*tert*-butyl acetal (2.6 mL, 10.6 mmol, 4 eq). The reaction mixture was refluxed for 12 h. After this time, another portion of acetal (2.6 mL) was added and the mixture stirred again under reflux during 12 h. Then, the reaction mixture was concentrated, diluted with DCM and washed three times with a saturated aqueous NaHCO₃ solution. The organic layer was dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness. The crude product was solubilized in DMF (18 mL) and benzyl bromoacetate (250 μL, 2.64 mmol, 1 eq) and cesium carbonate (1.41 g, 4.26 mmol, 1.6 eq) were added. After stirring for 12 h, it was diluted with ethyl acetate and washed three times with an aqueous LiCl solution (5 % w/w). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and the crude product obtained after evaporation was purified by chromatography on silica gel (n-heptane/EtOAc 75/25) to afford **27** as a white powder (363 mg, 43 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 8.11 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.96 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz, *H*_{ar}), 7.59 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, *H*_{ar}), 7.27 (dd, 1H, *J* = 2.8 and 8.8 Hz, *H*_{ar}), 5.28 (s, 2H, CH₂), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 1.57 (s, 9H, (CH₃)₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 168.7 (C=O), 163.1 (C=O), 137.4 (Car), 135.4 (Car), 126.9 (Car), 126.4 (Car), 122.5 (Car), 119.7 (Car), 112.7 (Car), 107.6 (Car), 52.3 (CH₃), 47.3 (CH₂), 28.1 (3 CH₃).

LC-MS (ESI): m/z calculated for C₁₆H₁₉ClNO₄ [M+H]⁺: 268.0, 270.0; found: 268.0, 270.0

Ethyl 1-(4-aminophenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxylate 33



Chemical Formula: C₁₃H₁₅N₃O₂
Molecular Weight: 245,28 g.mol⁻¹

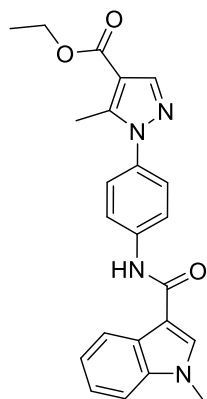
TFA (1 mL) was added to a solution of **12** (200 mg, 0.55 mmol, 1 eq) in DCM (5 mL) and the mixture was stirred overnight at RT. The reaction mixture was concentrated. The crude product was purified by silica gel chromatography (DCM/MeOH 99/1) to yield **33** as a yellow oil (136 mg, quant.).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): 7.93 (s, 1H, H_{ar}), 7.24 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, 2 H_{ar}), 6.86 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, 2 H_{ar}), 4.23 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz, OCH₂), 2.44 (s, 3H, CH₃), 1.28 (t, 3H, $J = 7.1$, CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100MHz): 162.9 (C=O), 145.2 (C_{ar}), 143.1 (C_{ar}), 140.6 (CH_{ar}), 129.4 (C_{ar}), 126.4 (2 CH_{ar}), 115.9 (2 CH_{ar}), 111.6 (C_{ar}), 59.4 (CH₂), 14.3 (CH₃), 11.5 (CH₃).

HRMS (ESI): m/z calcd for C₁₃H₁₆N₃O₂ [M+H]⁺ : 246.1237 ; found: 246.1239.

Ethyl 5-methyl-1-(4-(1-methyl-1H-indole-3-carboxamido)phenyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate 36



Chemical Formula: C₂₃H₂₂N₄O₃
Molecular Weight: 402,45 g.mol⁻¹

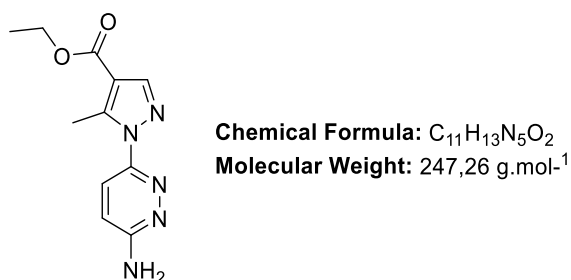
1-methyl-1H-indole-3-carboxylic acid (9.0 mg, 0.053 mmol, 1 eq), EDC/HCl (11.0 mg, 0.058 mmol, 1.1 eq) and DMAP (10.0 mg, 0.60 mmol, 1.5 eq) were added to **33** (13.0 mg, 0.053 mmol, 1 eq) in DCM (0.5 mL). The reaction mixture was stirred for 5 h at 70 °C. The mixture was then washed with a solution of 1 M HCl, brine, dried over sodium sulfate and concentrated. The crude product was purified by silica gel chromatography (*n*-heptane/EtOAc 1/1) to obtain **36** as a white solid (6.0 mg, 28 %).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10.00 (s, 1H, NH), 8.30 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.22 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, *H*_{ar}), 7.99 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.96 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, 2 *H*_{ar}), 7.55 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, *H*_{ar}), 7.49 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, 2 *H*_{ar}), 7.28 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz, *H*_{ar}), 7.21 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz, *H*_{ar}), 4.26 (q, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₂), 3.90 (s, 3H, CH₃), 2.52 (s, 3H, CH₃), 1.30 (t, 3 H, *J* = 7.0 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100MHz): 163.0 (C=O), 162.9 (C=O), 143.2 (C_{ar}), 141.0 (CH_{ar}), 140.1 (C_{ar}), 136.8 (C_{ar}), 132.8 (C_{ar}), 132.7 (CH_{ar}), 126.7 (C_{ar}), 125.7 (2 CH_{ar}), 122.3 (CH_{ar}), 121.2 (CH_{ar}), 121.1 (CH_{ar}), 119.7 (2 CH_{ar}), 111.9 (C_{ar}), 110.4 (CH_{ar}), 109.2 (C_{ar}), 59.5 (CH₂), 33.1 (NCH₃), 14.3 (CH₃), 11.5. (CH₃).

HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₃H₂₃N₄O₃ [M+H]⁺ : 403.1765; found 403.1766.

Ethyl 1-(6-aminopyridazin-3-yl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxylate 34



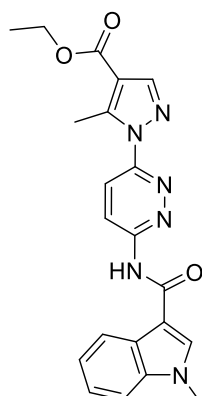
11 (150 mg, 0.41 mmol, 1 eq) was added to TFA (5 mL) and was stirred at 75 °C for 24 h in a sealed tube. Water was added to the reaction mixture and the product was extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The organic layers were combined, dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The solid was taken up in diethyl ether and then concentrated to afford **34** (53 mg, 53 %).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): 8.09 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.88 (d, 1H, *J* = 9.7 Hz, *H*_{ar}), 7.28 (d, 1H, *J* = 9.7 Hz, *H*_{ar}), 4.26 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 2.71 (s, 3H, CH₃), 1.30 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): 162.6 (C=O), 157.3 (C_{ar}), 147.4 (C_{ar}), 144.5 (C_{ar}), 142.1 (C_{ar}), 127.7 (C_{ar}), 121.3 (C_{ar}), 113.3 (C_{ar}), 59.8 (CH₂), 14.2 (CH₃), 12.1 (CH₃).

HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₁₁H₁₄N₅O₂ [M+H]⁺ : 248.1142; found: 248.1143.

Ethyl 5-methyl-1-(6-(1-methyl-1H-indole-3-carboxamido)pyridazin-3-yl)-1H-pyrazole-4-carboxylate 37

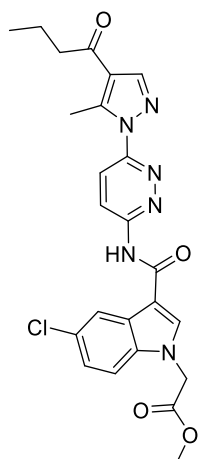


Chemical Formula: C₂₁H₂₀N₆O₃
Molecular Weight: 404,43 g.mol⁻¹

NMI (38 μ L, 0.48 mmol, 2.2 eq) and mesyl chloride (17 μ L, 0.22 mmol, 1 eq) were added to a solution of 1-methyl-1H-indole-3-carboxylic acid (39 mg, 0.22 mmol, 1 eq) in DCM (5 mL) at 0 °C. After stirring for 1 hour at 0 °C, **34** was added (53 mg, 0.22 mmol, 1 eq) and the mixture was stirred at 50 °C for 20 h. After concentration under vacuum, a solution of 0.1 M NaOH was added. The product was extracted with DCM (2 x 10 mL), and the organic layers were combined, dried over sodium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. Compound **37** was obtained as a non-separable mixture with a by-product (indole anhydride).

HRMS (ESI): m/z calcd for C₂₁H₂₁N₆O₃ [M+H]⁺ : 405.1670 ; found: 405.1670.

Methyl 2-(3-((6-(4-butyryl-5-methyl-1H-pyrazol-1-yl)pyridazin-3-yl)carbamoyl)-5-chloro-1H-indol-1-yl)acetate 39



Chemical Formula: C₂₄H₂₃ClN₆O₄
Molecular Weight: 494,94 g.mol⁻¹

N-Methyl-imidazole (113 μ L, 1.41 mmol, 2.2 eq) and mesyl chloride (50 μ L, 0.64 mmol, 1 eq) were added to a solution of **31** (171 mg, 0.64 mmol, 1 eq) in DCM (16 mL) at 0 °C under argon. After 1 hour, **37** (157 mg, 0.64 mmol, 1 eq) was added and the reaction mixture was stirred at 50 °C for 98 h. The reaction mixture was then concentrated under vacuum and the residue was

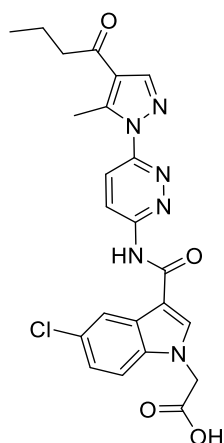
purified on silica gel chromatography (n-heptane/ EtOAc 6/4 to 5/5) to afford **39** as a white powder (135 mg, 54 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 11.43 (s, 1H, NH), 8.71 (d, 1H, *J* = 9.7 Hz, *H*_{ar}), 8.66 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.41 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.23 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, *H*_{ar}), 8.14 (d, 1H, *J* = 9.7 Hz, *H*_{ar}), 7.62 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, *H*_{ar}), 7.32 (dd, 1H, *J* = 8.9 and 2.2 Hz, *H*_{ar}), 5.34 (s, 2H, NCH₂), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 2.87 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂), 2.82 (s, 3H, CH₃), 1.65 (sext, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂), 0.95 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ 195.7 (C=O), 168.7 (C=O), 163.2 (C=O), 155.8 (C_{ar}), 152.5 (C_{ar}), 143.5 (CH_{ar}), 142.9 (C_{ar}), 135.9 (CH_{ar}), 135.4 (C_{ar}), 127.8 (C_{ar}), 126.6 (C_{ar}), 124.7 (CH_{ar}), 122.8 (CH_{ar}), 122.0 (CH_{ar}), 121.3 (CH_{ar}), 120.3 (C_{ar}), 112.6 (CH_{ar}), 108.8 (C_{ar}), 52.4 (OCH₃), 47.7 (NCH₂), 42.3 (CH₂), 17.3 (CH₂), 13.6 (CH₃), 12.5 (CH₃).

LC-MS (ESI): m/z calculated for C₂₄H₂₂ClN₆O₄ [M-H]⁻: 493.1, 495.1; found: 493.2, 495.2

*{3-[6-(4-Butyryl-5-methylpyrazol-1-yl)pyridazin-3-ylcarbamoyl]-5-chloroindol-1-yl}acetic Acid **43***



Chemical Formula: C₂₃H₂₁ClN₆O₄
Molecular Weight: 480,91 g.mol⁻¹

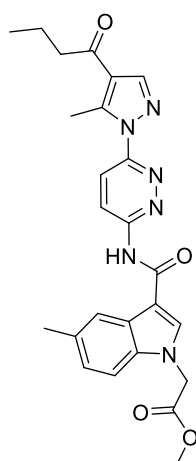
A solution of 2 M NaOH (746 μL, 1.46 mmol, 5.8 eq) was added to a solution of **39** in MeOH (5 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 6 h and was then concentrated under vacuum. 1 M HCl was added and the precipitate was filtrated, washed with water and dried under high vacuum. **43** was obtained as a white powder (107 mg, 89 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 13.31 (br s, 1H, COOH), 11.40 (s, 1H, NH), 8.71 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz, *H*_{ar}), 8.67 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.41 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.23 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, *H*_{ar}), 8.13 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz, *H*_{ar}), 7.62 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, *H*_{ar}), 7.31 (dd, 1H, *J* = 8.5, *J* = 2.0 Hz, *H*_{ar}), 5.20 (s, 2H, NCH₂), 2.86 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 2.82 (s, 3H, CH₃), 1.65 (sext, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 0.95 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₃).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 195.7 (C=O), 169.6 (C=O), 163.2 (C=O), 155.8 (C_{ar}), 152.4 (C_{ar}), 143.5 (CH_{ar}), 142.8 (C_{ar}), 136.0 (CH_{ar}), 135.5 (C_{ar}), 127.8 (C_{ar}), 126.4 (C_{ar}), 124.7 (CH_{ar}), 122.7 (CH_{ar}), 122.0 (CH_{ar}), 121.3 (CH_{ar}), 120.3 (C_{ar}), 112.6 (CH_{ar}), 108.5 (C_{ar}), 47.9 (NCH_2), 42.3 (CH_2), 17.3 (CH_2), 13.6 (CH_3), 12.5 (CH_3).

LC-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{ClN}_6\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 481.1, 483.1; found: 481.3, 483.3.

*{3-[6-(4-Butyryl-5-methylpyrazol-1-yl)pyridazin-3-ylcarbamoyl]-5-methylindol-1-yl}acetic Acid Methyl Ester **40***

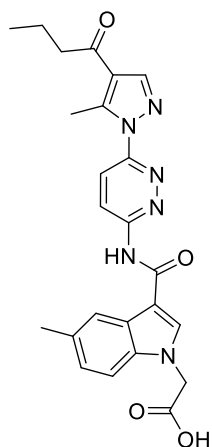


Chemical Formula: $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_4$
Molecular Weight: 474,52 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

N-Methyl-imidazole (72 μL , 0.91 mmol, 2.2 eq) and mesyl chloride (32 μL , 0.41 mmol, 1 eq) were added to a solution of **32** (100 mg, 0.41 mmol, 1 eq) in DCM (10 mL) at 0 °C under argon. After 1 hour, **19** was added and the reaction mixture was stirred at 50 °C for 5 days. Then, the reaction mixture was concentrated under vacuum and the residue was purified on silica gel chromatography (n-heptane/EtOAc 6/4) to afford **40** as a non-separable mixture with a by-product (indole anhydride).

^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 11.27 (s, 1H, NH), 8.72 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz, H_{ar}), 8.55 (s, 1H, H_{ar}), 8.42 (s, 1H, H_{ar}), 8.12 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz, H_{ar}), 8.06 (m, 1H, H_{ar}), 7.43 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, H_{ar}), 7.11 (dd, 1H, $J = 8.7$ and 1.7 Hz, H_{ar}), 5.27 (s, 2H, NCH_2), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 2.87 (t, 2H, $J = 7.8$ Hz, CH_2), 2.82 (s, 3H, CH_3), 2.45 (s, 3H, CH_3), 1.65 (sext, 2H, $J = 7.8$ Hz, CH_2), 0.96 (t, 3H, $J = 7.8$ Hz, CH_3).

LC-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 475.20, found 475.04.

*{3-[6-(4-Butyryl-5-methylpyrazol-1-yl)pyridazin-3-ylcarbamoyl]-5-methylindol-1-yl}acetic acid **44***

Chemical Formula: C₂₄H₂₄N₆O₄
Molecular Weight: 460,49 g.mol⁻¹

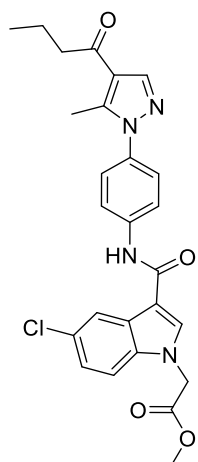
A solution of 2 M NaOH (265 μ L, 0.59 mmol, 2.9 eq) was added to a solution of **40** (85 mg, 0.18 mmol, 1 eq) in MeOH (3 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature during 5 h and then concentrated. 1 M HCl solution was added, and the precipitate was filtered, washed with water and dried under high vacuum. **44** was obtained as a yellow powder (67 mg, 81 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 11.23 (s, 1H, NH), 8.72 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz, *H*_{ar}), 8.55 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.41 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.12 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz, *H*_{ar}), 8.06 (m, 1H, *H*_{ar}), 7.41 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, *H*_{ar}), 7.10 (dd, 1H, *J* = 8.3, *J* = 1.5 Hz, *H*_{ar}), 5.07 (s, 2H, CH₂), 2.87 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₂), 2.82 (s, 3H, CH₃), 2.44 (s, 3H, CH₃), 1.65 (sext, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₂), 0.95 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 195.7 (C=O), 169.7 (C=O), 163.6 (C=O), 156.0 (C_{ar}), 152.3 (C_{ar}), 143.5 (CH_{ar}), 142.8 (C_{ar}), 135.3 (CH_{ar}), 134.7 (C_{ar}), 130.3 (C_{ar}), 127.0 (C_{ar}), 124.6 (CH_{ar}), 124.1 (CH_{ar}), 121.8 (CH_{ar}), 121.3 (CH_{ar}), 120.8 (C_{ar}), 110.4 (CH_{ar}), 108.2 (C_{ar}), 48.1 (NCH₂), 42.3 (CH₂), 21.2 (CH₃), 17.3 (CH₂), 13.6 (CH₃), 12.5 (CH₃).

LC-MS (ESI): m/z calculated for C₂₄H₂₅N₆O₄ [M+H]⁺: 461.18, found 461.25.

*{3-[6-(4-Butyryl-5-methylpyrazol-1-yl)phenyl-3-ylcarbamoyl]-5-chloroindol-1-yl}acetic Acid Methyl Ester **41***



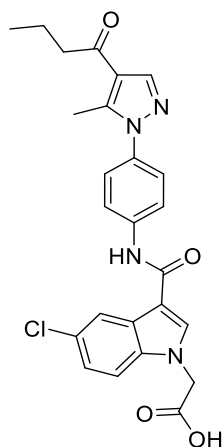
Chemical Formula: C₂₆H₂₅ClN₄O₄
Molecular Weight: 492,96 g.mol⁻¹

31 (120 mg, 0.45 mmol, 1 eq) was diluted in DCM (3 mL). EDC (96 mg, 0.50 mmol, 1.1 eq), DMAP (83 mg, 0.68 mmol, 1.5 eq) and **20** (109 mg, 0.45 mmol, 1 eq) were added and the solution was heated at 50 °C for 4 h. The reaction mixture was washed with H₂O, dried over sodium sulfate and concentrated. The crude product was purified on silica gel chromatography (n-heptane/EtOAc 1/1 to 1/2) to afford **41** as a white solid (114 mg, 61 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 10.17 (s, 1H, NH), 8.35 (s, 1H, H_{ar}), 8.24 (s, 1H, H_{ar}), 8.21 (d, 1H, J = 2.0 Hz, H_{ar}), 7.95 (d, 2H, J = 8.9 Hz, 2 H_{ar}), 7.60 (d, 1H, J = 8.9 Hz, H_{ar}), 7.50 (d, 2H, J = 8.9 Hz, 2 H_{ar}), 7.29 (dd, 1H, J = 8.9, J = 2.0 Hz, H_{ar}), 5.34 (s, 2H, NCH₂), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 2.81 (t, 2H, J = 7.1 Hz, CH₂), 2.52 (s, 3H, CH₃), 1.64 (sext, 2H, J = 7.1 Hz, CH₂), 0.94 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ 195.5 (C=O), 168.8 (C=O), 162.5 (C=O), 142.1 (C_{ar}), 141.5 (C_{ar}), 139.8 (C_{ar}), 135.4 (C_{ar}), 134.1 (C_{ar}), 133.0 (C_{ar}), 127.7 (C_{ar}), 126.2 (C_{ar}), 125.7 (2 C_{ar}), 122.6 (C_{ar}), 120.4 (C_{ar}), 120.3 (C_{ar}), 119.9 (2 C_{ar}), 112.4 (C_{ar}), 110.0 (C_{ar}), 52.4 (OCH₃), 47.5 (NCH₂), 42.0 (CH₂), 17.4 (CH₂), 13.7 (CH₃), 11.9 (CH₃).

LC-MS (ESI): m/z calculated for C₂₆H₂₆ClN₄O₄ [M-H]⁺: 493.16, found 493.18.

2-(3-((4-(4-butyryl-5-methyl-1H-pyrazol-1-yl)phenyl)carbamoyl)-5-chloro-1H-indol-1-yl)acetic acid **45**

Chemical Formula: C₂₅H₂₃ClN₄O₄
Molecular Weight: 478,93 g.mol⁻¹

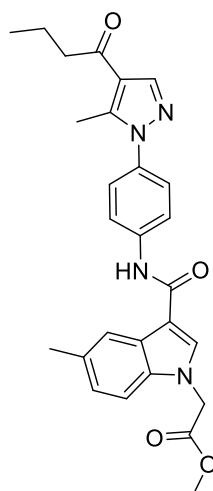
A solution of 2 M NaOH (355 μ L, 0.58 mmol, 2.9 eq) was added to a solution of **41** (95.0 mg, 0.20 mmol, 1 eq) in MeOH (5.0 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 6 h and was concentrated under vacuum. 4 M HCl was added and the precipitate was filtered, washed with water and dried under high vacuum. **45** was obtained as a white powder (94 mg, quant.).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 10.17 (s, 1H, NH), 8.39 (s, 1H, H_{ar}), 8.24 (s, 1H, H_{ar}), 8.21 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H_{ar}), 7.96 (d, 2H, $J = 9.4$ Hz, 2 H_{ar}), 7.58 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H_{ar}), 7.49 (d, 2H, $J = 9.4$ Hz, 2 H_{ar}), 7.28 (dd, 1H, $J = 8.5$, $J = 2.1$ Hz, H_{ar}), 5.19 (s, 2H, NCH₂), 2.81 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, CH₂), 2.52 (s, 3H, CH₃), 1.64 (sext, 2H, $J = 7.1$ Hz, CH₂), 0.94 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ 195.5 (C=O), 169.7 (C=O), 162.6 (C=O), 142.1 (C_{ar}), 141.5 (C_{ar}), 139.8 (C_{ar}), 135.4 (C_{ar}), 134.3 (C_{ar}), 132.9 (C_{ar}), 127.7 (C_{ar}), 126.0 (C_{ar}), 125.7 (2 C_{ar}), 122.5 (C_{ar}), 120.3 (C_{ar}), 120.2 (C_{ar}), 119.9 (2 C_{ar}), 112.4 (C_{ar}), 109.7 (C_{ar}), 47.8 (NCH₂), 42.0 (CH₂), 17.4 (CH₂), 13.7 (CH₃), 11.9 (CH₃).

LC-MS (ESI): m/z calculated for C₂₅H₂₄ClN₄O₄ [M-H]⁺: 479.14, found 479.21.

Methyl 2-(3-((4-(4-butyryl-5-methyl-1H-pyrazol-1-yl)phenyl)carbamoyl)-5-methyl-1H-indol-1-yl)acetate **42**



Chemical Formula: C₂₇H₂₈N₄O₄
Molecular Weight: 472,55 g.mol⁻¹

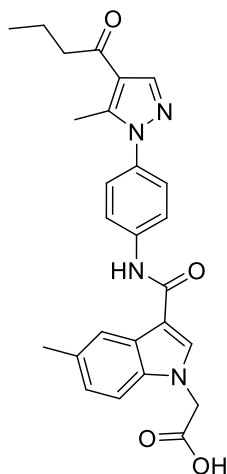
32 (101 mg, 0.410 mmol, 1 eq) was diluted in DCM (3.5 mL). EDC (86 mg, 0.450 mmol, 1.1 eq), DMAP (76 mg, 0.620 mmol, 1.5 eq) and **20** (100 mg, 0.410 mmol, 1 eq) were added and the solution was heated at 50 °C for 3 h. The reaction mixture was washed with 1M HCl, H₂O, dried over sodium sulfate and concentrated. The crude product was purified on silica gel chromatography (n-heptane/EtOAc 1/1 to 4/6) to afford **42** a white powder (116 mg, 63 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 10.06 (s, 1H, NH), 8.24 (s 1H, H_{ar}), 8.22 (s 1H, H_{ar}), 8.02 (s, 1H, H_{ar}), 7.96 (d, 2H, J = 8.8 Hz, 2 H_{ar}), 7.48 (d, 2H, J = 8.8 Hz, 2 H_{ar}), 7.40 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H_{ar}), 7.08 (dd, 1 H, J = 8.4, J = 1.6, H_{ar}), 5.27 (s, 2H, NCH₂), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 2.81 (t, 2H, J = 7.4 Hz, CH₂), 2.52 (s, 3H, CH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃), 1.63 (sext, 2H, J = 7.4 Hz, CH₂), 0.94 (t, 3H, J = 7.4 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ 195.5 (C=O), 169.1 (C=O), 163.0 (C=O), 142.1 (C_{ar}), 141.5 (C_{ar}), 140.1 (C_{ar}), 135.2 (C_{ar}), 132.8 (C_{ar}), 132.7 (C_{ar}), 130.1 (C_{ar}), 126.8 (C_{ar}), 125.7 (2 C_{ar}), 124.1 (C_{ar}), 121.0 (C_{ar}), 120.2 (C_{ar}), 119.8 (2 C_{ar}), 110.2 (C_{ar}), 109.9 (C_{ar}), 52.3 (OCH₃), 47.4 (NCH₂), 42.0 (CH₂), 21.3 (CH₃), 17.4 (CH₂), 13.7 (CH₃), 11.9 (CH₃).

LC-MS (ESI): m/z calculated for C₂₇H₂₉N₄O₄ [M+H]⁺: 473.21, found 473.22.

2-(3-((4-(4-butyl-5-methyl-1H-pyrazol-1-yl)phenyl)carbamoyl)-5-methyl-1H-indol-1-yl)acetic acid **46**



Chemical Formula: C₂₆H₂₆N₄O₄
Molecular Weight: 458,52 g.mol⁻¹

A solution of 2 M NaOH (315 μ L, 0.63 mmol, 3 eq) was added to a solution of **42** in MeOH (4 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h and was then concentrated under vacuum. 4 M HCl was added and the precipitate was filtrated, washed with water and dried under high vacuum. **46** was obtained as a white powder (93 mg, 97 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 10.03 (s, 1H, NH), 8.24 (s, 1H, H_{ar}), 8.23 (s, 1H, H_{ar}), 8.02 (m, 1H, H_{ar}), 7.96 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, 2 H_{ar}), 7.47 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, 2 H_{ar}), 7.38 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_{ar}), 7.06 (dd, 1 H, $J = 8.4$, $J = 1.6$ Hz, H_{ar}), 5.08 (s, 2H, NCH₂), 2.81 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, CH₂), 2.52 (s, 3H, CH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃), 1.63 (sext, 2H, $J = 7.4$ Hz, CH₂), 0.94 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, CH₃).

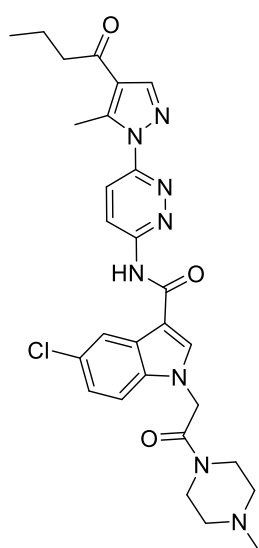
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ 195.5 (C=O), 170.0 (C=O), 163.1 (C=O), 142.1 (C_{ar}), 141.5 (C_{ar}), 140.2 (C_{ar}), 135.3 (C_{ar}), 133.0 (C_{ar}), 132.6 (C_{ar}), 129.8 (C_{ar}), 126.9 (C_{ar}), 125.7 (2 C_{ar}), 123.9 (C_{ar}), 120.9 (C_{ar}), 120.2 (C_{ar}), 119.7 (2 C_{ar}), 110.2 (C_{ar}), 109.4 (C_{ar}), 47.9 (NCH₂), 42.0 (CH₂), 21.2 (CH₃), 17.4 (CH₂), 13.7 (CH₃), 11.9 (CH₃).

LC-MS (ESI): m/z calculated for C₂₆H₂₇N₄O₄ [M-H]⁺: 459.19, found 459.21.

General protocol A: coupling of intermediate carboxylic acids 43-46 with amines

HATU (0.16 mmol, 1.6 eq), DIPEA (0.16 mmol, 1.6 eq) and appropriate amine (1.6 mmol, 1.6 eq) were added to a solution of carboxylic acid (0.10 mmol 1 eq) in DMF (1 mL) and the solution was stirred for 1 h at room temperature. The reaction mixture was then diluted with EtOAc and washed with a 5% LiCl aqueous solution (3 x). The organic layer was dried over sodium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel chromatography.

N-[6-(4-Butanoyl-5-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl)pyridazin-3-yl]-5-chloro-1-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoethyl]-1*H*-indole-3-carboxamide **47**



Chemical Formula: C₂₈H₃₁ClN₈O₃
Molecular Weight: 563,06 g.mol⁻¹

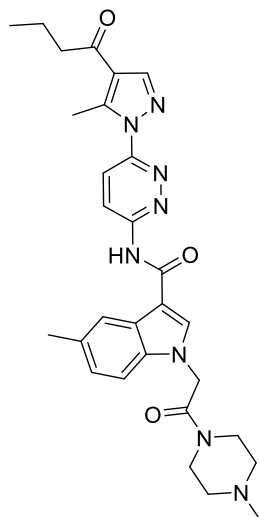
Prepared following general procedure A starting from **43** and *N*-methylpiperazine. Expected product **47** was obtained as a white solid in 48 % yield (purification: silica gel, DCM/MeOH 95/5 to 90/10).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 11.36 (s, 1H, NH), 8.72 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, *H*_{ar}), 8.62 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.42 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.23 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, *H*_{ar}), 8.13 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, *H*_{ar}), 7.56 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, *H*_{ar}), 7.30 (dd, 1H, *J* = 8.2 Hz and 2.1 Hz, *H*_{ar}), 5.37 (s, 2H, CH₂), 3.62-3.58 (m, 2H, CH₂ piperazine), 3.51-3.46 (m, 2H, CH₂ piperazine), 2.87 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, CH₂), 2.82 (s, 3H, CH₃), 2.46-2.42 (m, 2H, CH₂ piperazine), 2.34-2.30 (m, 2H, CH₂ piperazine), 2.24 (s, 3H, NCH₃), 1.65 (sext, 2H, *J* = 7.6 Hz, CH₂), 0.95 (t, 3H, *J* = 7.6 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 195.7 (C=O), 165.0 (C=O), 163.2 (C=O), 155.8 (C_{ar}), 152.4 (C_{ar}), 143.5 (CH_{ar}), 142.8 (C_{ar}), 136.4 (CH_{ar}), 135.8 (C_{ar}), 127.8 (C_{ar}), 126.2 (C_{ar}), 124.7 (CH_{ar}), 122.5 (CH_{ar}), 122.0 (CH_{ar}), 121.3 (CH_{ar}), 120.2 (C_{ar}), 112.7 (CH_{ar}), 108.2 (C_{ar}), 54.6 (CH₂ piperazine), 54.2 (CH₂ piperazine), 47.8 (NCH₂), 45.6 (CH₃), 44.2 (CH₂ piperazine), 42.3 (CH₂), 41.5 (CH₂ piperazine), 17.2 (CH₂), 13.6 (CH₃), 12.5 (CH₃).

LC-MS (ESI): m/z calculated for C₂₈H₃₂ClN₈O₃ [M+H]⁺: 563.2, 565.2; found: 563.2, 565.2.

N-[6-(4-Butanoyl-5-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl)pyridazin-3-yl]-5-methyl-1-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoethyl]-1*H*-indole-3-carboxamide **48**



Chemical Formula: C₂₉H₃₄N₈O₃
Molecular Weight: 542,64 g.mol⁻¹

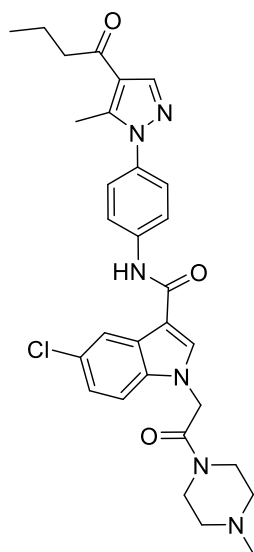
Prepared following general procedure A starting from **44** and *N*-methylpiperazine. Expected product **48** was obtained as a white solid in 43 % yield (purification: silica gel, DCM/MeOH 95/5 to 90/10).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 11.19 (s, 1H, NH), 8.72 (d, 1H, *J* = 9.8 Hz, *H*_{ar}), 8.51 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.41 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.11 (d, 1H, *J* = 9.8 Hz, *H*_{ar}), 8.05 (m, 1H, *H*_{ar}), 7.37 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, *H*_{ar}), 7.08 (dd, 1H, *J* = 8.2, *J* = 1.5 Hz, *H*_{ar}), 5.28 (s, 2H, CH₂), 3.62-3.59 (t, 2H, *J* = 4.8 Hz, CH₂ piperazine), 3.50-3.47 (t, 2H, *J* = 4.8 Hz, CH₂ piperazine), 2.87 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 2.82 (s, 3H, CH₃), 2.45-2.41 (m, 5H, CH₂ piperazine and CH₃), 2.33-2.29 (m, 2H, CH₂ piperazine), 2.23 (s, 3H, NCH₃), 1.65 (sext, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 0.95 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 195.7 (C=O), 165.2 (C=O), 163.6 (C=O), 156.0 (C_{ar}), 152.3 (C_{ar}), 143.5 (CH_{ar}), 142.8 (C_{ar}), 135.6 (CH_{ar}), 135.1 (C_{ar}), 130.2 (C_{ar}), 127.0 (C_{ar}), 124.6 (CH_{ar}), 123.9 (CH_{ar}), 121.8 (CH_{ar}), 121.3 (C_{ar}), 120.8 (CH_{ar}), 110.5 (CH_{ar}), 108.1 (C_{ar}), 54.6 (CH₂ piperazine), 54.2 (CH₂ piperazine), 47.6 (CH₂), 45.6 (CH₃), 44.2 (CH₂ piperazine), 42.3 (CH₂), 41.5 (CH₂ piperazine), 21.3 (CH₃), 17.3 (CH₂), 13.6 (CH₃), 12.5 (CH₃).

LC-MS (ESI): m/z calculated for C₂₉H₃₅N₈O₃ [M+H]⁺: 543.28, found 543.25.

N-(4-(4-butyryl-5-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)-5-chloro-1-(2-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoethyl)-1*H*-indole-3-carboxamide **49**



Chemical Formula: C₃₀H₃₃ClN₆O₃
Molecular Weight: 561,08 g.mol⁻¹

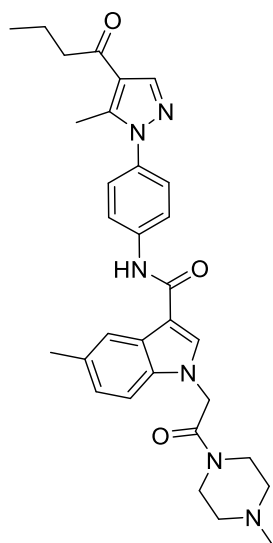
Prepared following general procedure A starting from **45** and *N*-methylpiperazine. Expected product **49** was obtained as a pale yellow powder in 84 % yield (purification: silica gel, DCM/MeOH 95/5 to 90/10).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 10.11 (s, 1H, NH), 8.31 (s, 1H, H_{ar}), 8.24 (s, 1H, H_{ar}), 8.21 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, H_{ar}), 7.95 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2 H_{ar}), 7.54 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H_{ar}), 7.49 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, H_{ar}), 7.26 (dd, 1H, *J* = 8.7, *J* = 2.1 Hz, H_{ar}), 5.37 (s, 2H, NCH₂), 3.60-3.57 (m, 2H, CH₂ piperazine), 3.48-3.46 (m, 2H, CH₂ piperazine), 2.81 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH₂), 2.52 (s, 3H, CH₃), 2.45-2.42 (m, 2H, CH₂ piperazine), 2.31-2.28 (m, 2H, CH₂ piperazine), 2.23 (s, 3H, NCH₃), 1.63 (sext, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 0.94 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 195.5 (C=O), 165.2 (C=O), 162.6 (C=O), 142.1 (C_{ar}), 141.4 (C_{ar}), 139.9 (C_{ar}), 135.8 (C_{ar}), 134.7 (C_{ar}), 132.9 (C_{ar}), 127.7 (C_{ar}), 125.8 (C_{ar}), 125.7 (2 C_{ar}), 124.0 (C_{ar}), 122.2 (C_{ar}), 120.3 (C_{ar}), 119.8 (2 C_{ar}), 112.4 (C_{ar}), 109.8 (C_{ar}), 54.5 (CH₂), 54.1 (CH₂), 47.6 (NCH₂), 45.5 (CH₃), 44.0 (CH₂), 42.0 (CH₂), 41.4 (CH₂), 17.4 (CH₂), 13.7 (CH₃), 11.9 (CH₃).

HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₀H₃₄ClN₆O₃ [M+H]⁺: 561.2375; found: 561.2366.

N-(4-(4-butyryl-5-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)-5-methyl-1-(2-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoethyl)-1*H*-indole-3-carboxamide **50**



Chemical Formula: C₃₁H₃₆N₆O₃
Molecular Weight: 540,67 g.mol⁻¹

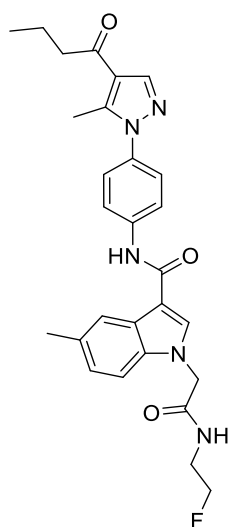
Prepared following general procedure A starting from **46** and *N*-methylpiperazine. Expected product **50** was obtained as a white solid in 69 % yield (purification: silica gel, DCM/MeOH 95/5 to 80/20).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 10.00 (s, 1H, NH), 8.24 (s, 1H, H_{ar}), 8.19 (s, 1H, H_{ar}), 8.02 (m, 1H, H_{ar}), 7.96 (d, 2H, *J* = 9.1 Hz, 2 H_{ar}), 7.47 (d, 2H, *J* = 9.1 Hz, 2 H_{ar}), 7.35 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H_{ar}), 7.05 (dd, 1H, *J* = 8.5, *J* = 1.6 Hz, H_{ar}), 5.30 (s, 2H, NCH₂), 3.61-3.57 (m, 2H, CH₂ piperazine), 3.49-3.46 (m, 2H, CH₂ piperazine), 2.81 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 2.52 (s, 3H, CH₃), 2.44-2.40 (m, 5H, CH₂ piperazine and CH₃), 2.31-2.27 (m, 2H, CH₂ piperazine), 2.22 (s, 3H, CH₃), 1.64 (sext, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 0.94 (t, 3H, *J* = 7.2, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 195.5 (C=O), 165.4 (C=O), 163.1 (C=O), 142.1 (C_{ar}), 141.5 (C_{ar}), 140.2 (C_{ar}), 135.6 (C_{ar}), 133.4 (C_{ar}), 132.6 (C_{ar}), 129.7 (C_{ar}), 126.8 (C_{ar}), 125.7 (2 C_{ar}), 123.7 (C_{ar}), 120.8 (C_{ar}), 120.2 (C_{ar}), 119.6 (2 C_{ar}), 110.3 (C_{ar}), 109.2 (C_{ar}), 54.6 (CH₂), 54.2 (CH₂), 47.3 (CH₂), 45.7 (CH₃), 44.2 (CH₂), 41.9 (CH₂), 41.5 (CH₂), 21.3 (CH₃), 17.4 (CH₂), 13.7 (CH₃), 11.9 (CH₃).

HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₁H₃₇N₆O₃ [M+H]⁺: 541.2922 ; found: 541.2922.

N-(4-(4-butyryl-5-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)-1-(2-((2-fluoroethyl)amino)-2-oxoethyl)-5-methyl-1*H*-indole-3-carboxamide **51**



Chemical Formula: C₂₈H₃₀FN₅O₃
Molecular Weight: 503,58 g.mol⁻¹

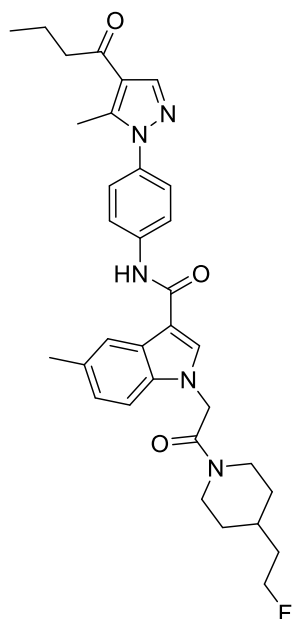
Prepared following general procedure A starting from **46** and 2-fluoroethylamine. Expected product **51** was obtained as a white solid in 63 % yield (purification: silica gel, DCM/MeOH 95/5).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 10.02 (s, 1H, NH), 8.62 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz, NH), 8.26 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.24 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.04 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.97 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2 *H*_{ar}), 7.48 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2 *H*_{ar}), 7.35 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, *H*_{ar}), 7.08 (dd, 1H, *J* = 8.3, *J* = 1.3 Hz, *H*_{ar}), 4.95 (s, 2H, CH₂), 4.47 (dt, 2H, *J* = 47.9 Hz, *J* = 5.1 Hz, F-CH₂), 3.44 (dq, 2H, *J* = 26.7 Hz, *J* = 5.1 Hz, F-CH₂CH₂), 2.81 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂), 2.52 (s, 3H, CH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃), 1.64 (sext, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂), 0.94 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100MHz): 195.5 (C=O), 167.2 (C=O), 163.1 (C=O), 142.1 (C_{ar}), 141.4 (C_{ar}), 140.2 (C_{ar}), 135.2 (C_{ar}), 133.1 (C_{ar}), 132.7 (C_{ar}), 129.9 (C_{ar}), 127.0 (C_{ar}), 125.7 (2 C_{ar}), 123.9 (C_{ar}), 121.0 (C_{ar}), 120.2 (C_{ar}), 119.7 (2 C_{ar}), 110.0 (C_{ar}), 109.3 (C_{ar}), 82.2 (d, *J* = 166 Hz, FCH₂), 48.9 (CH₂), 42.0 (CH₂), 21.2 (CH₃), 17.4 (CH₂), 13.7 (CH₃), 11.9 (CH₃), (CH₂CH₂F under DMSO-d₆ peak).

HRMS (ESI): m/z calcd for C₂₈H₃₁FN₅O₃ [M+H]⁺: 504.2405 ; found: 504.2404.

N-(4-(4-butyryl-5-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)-1-(2-(4-(2-fluoroethyl)piperidin-1-yl)-2-oxoethyl)-5-methyl-1*H*-indole-3-carboxamide **52**



Chemical Formula: C₃₃H₃₈FN₅O₃
Molecular Weight: 571,70 g.mol⁻¹

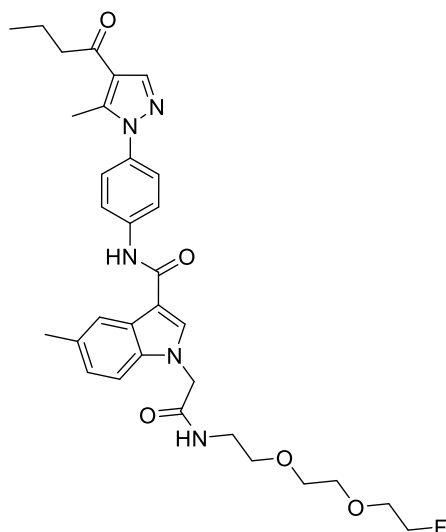
Prepared following general procedure A starting from **46** and 4-(2-fluoroethyl)-piperidine. Expected product **52** was obtained as a white solid in 43 % yield (purification: silica gel, DCM/MeOH 98/2 to 90/10).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 9.98 (s, 1H, *NH*), 8.23 (s, 1H, *H_{ar}*), 8.18 (s, 1H, *H_{ar}*), 8.03 (s, 1H, *H_{ar}*), 7.96 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2 *H_{ar}*), 7.47 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2 *H_{ar}*), 7.35 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, *H_{ar}*), 7.05 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, *H_{ar}*), 5.30 (d, 1H, *J* = 17.0 Hz, *CHH-N*), 5.24 (d, 1H, *J* = 17.0 Hz, *CHH-N*), 4.54 (dt, 2H, *J* = 47.1 Hz, *J* = 5.6 Hz, *CH₂F*), 4.32 (m, 1H, *CH* piperidine), 4.01 (m, 1H, *CH* piperidine), 3.13 (t, 1H, *J* = 12.8 Hz, *CH* piperidine), 2.81 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, *CH₂*), 2.64 (t, 1H, *J* = 12.2 Hz, *CH* piperidine), 2.52 (s, 3H, *CH₃*), 2.43 (s, 3H, *CH₃*), 1.82-1.60 (m, 6H, 3 *CH₂*), 1.31-1.22 (m, 2H, 2 *CH* piperidine), 1.05 (m, 1H, *CH* piperidine), 0.94 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, *CH₃*).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100MHz): 195.5 (*C=O*), 165.0 (*C=O*), 163.1 (*C=O*), 142.1 (*C_{ar}*), 141.4 (*C_{ar}*), 140.2 (*C_{ar}*), 135.6 (*C_{ar}*), 133.3 (*C_{ar}*), 132.6 (*C_{ar}*), 129.7 (*C_{ar}*), 126.8 (*C_{ar}*), 125.7 (2 *C_{ar}*), 123.7 (*C_{ar}*), 120.8 (*C_{ar}*), 120.2 (*C_{ar}*), 119.7 (2 *C_{ar}*), 110.3 (*C_{ar}*), 109.2 (*C_{ar}*), 81.8 (d, *J* = 161.5 Hz, *CH₂F*), 47.4 (*CH₂*), 44.4 (*CH₂*), 42.0 (*CH₂*), 41.7 (*CH₂*), 36.2 (d, *J* = 19.0 Hz, *CH₂*), 32.0 (*CH₂*), 31.9 (*CH*), 31.3 (*CH₂*), 21.2 (*CH₃*), 17.4 (*CH₂*), 13.7 (*CH₃*), 11.9 (*CH₃*).

HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₃H₃₉FN₅O₃ [*M+H*]⁺: 572.3031 ; found: 572.3029.

N-(4-(4-butyryl-5-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)-1-(2-((2-(2-(2-fluoropropoxy)ethoxy)ethyl)amino)-2-oxoethyl)-5-methyl-1*H*-indole-3-carboxamide **53**



Chemical Formula: C₃₂H₃₈FN₅O₅
Molecular Weight: 591,68 g.mol⁻¹

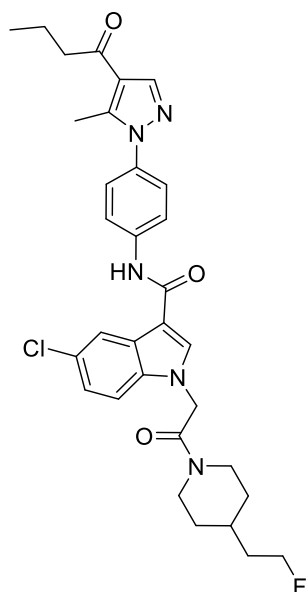
Prepared following general procedure A starting from **46** and 2-(2-(2-fluoroethoxy)ethoxy)ethan-1-amine. Expected product **53** was obtained as a white solid in 35 % yield (purification: silica gel, DCM/MeOH 98/2 to 93/7).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 10.05 (s, 1H, NH), 8.47 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz, NH), 8.28 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.24 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.04 (m, 1H, *H*_{ar}), 7.97 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2 *H*_{ar}), 7.48 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2 *H*_{ar}), 7.35 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, *H*_{ar}), 7.07 (dd, 1H, *J* = 8.5, *J* = 1.5 Hz, *H*_{ar}), 4.92 (s, 2H, CH₂), 4.52 (dt, 2H, *J* = 47.9 Hz, *J* = 4.1 Hz, CH₂F), 3.65 (dt, 2H, *J* = 31.3 Hz, *J* = 4.1 Hz, CH₂CH₂F), 3.58-3.53 (m, 4H, 2 CH₂), 3.46 (t, 2H, *J* = 5.5 Hz, CH₂), 3.28 (q, 2H, *J* = 5.5 Hz, CH₂NH), 2.81 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂), 2.52 (s, 3H, CH₃), 2.42 (s, 3H, CH₃), 1.63 (sext, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂), 0.93 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 195.5 (C=O), 166.8 (C=O), 163.1 (C=O), 142.1 (C_{ar}), 141.5 (C_{ar}), 140.2 (C_{ar}), 135.2 (C_{ar}), 133.1 (C_{ar}), 132.6 (C_{ar}), 129.9 (C_{ar}), 127.0 (C_{ar}), 125.7 (2 C_{ar}), 123.9 (C_{ar}), 121.0 (C_{ar}), 120.2 (C_{ar}), 119.7 (2 C_{ar}), 110.0 (C_{ar}), 109.2 (C_{ar}), 83.0 (d, *J* = 166.0 Hz, CH₂F), 69.7 (CH₂), 69.7 (d, *J* = 18.5 Hz, CH₂), 69.6 (CH₂), 68.9 (CH₂), 49.0 (CH₂), 41.9 (CH₂), 21.2 (CH₃), 17.4 (CH₂), 13.7 (CH₃), 11.9 (CH₃), (CH₂ under DMSO-d₆ peak).

HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₂H₃₉FN₅O₅ [M+H]⁺: 592.2930 ; found: 592.2926.

N-(4-(4-butyryl-5-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)-5-chloro-1-(2-(4-(2-fluoroethyl)piperidin-1-yl)-2-oxoethyl)-1*H*-indole-3-carboxamide **54**



Chemical Formula: C₃₂H₃₅ClFN₅O₃

Molecular Weight: 592,11 g.mol⁻¹

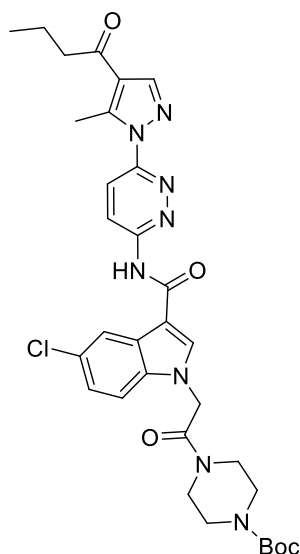
Prepared following general procedure A starting from **41** and 4-(2-fluoroethyl)-piperidine. Expected product **54** was obtained as a white solid in 75 % yield (purification: silica gel, DCM/MeOH 99/1 to 93/7).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 10.12 (s, 1H, NH), 8.31 (s, 1H, H_{ar}), 8.25 (s, 1H, H_{ar}), 8.21 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H_{ar}), 7.95 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, 2 H_{ar}), 7.53 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H_{ar}), 7.49 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, 2 H_{ar}), 7.26 (dd, 1H, *J* = 8.8, *J* = 2.0 Hz, H_{ar}), 5.40 (d, 1H, *J* = 17.4 Hz, CHH-N), 5.33 (d, 1H, *J* = 17.4 Hz, CHH-N), 4.54 (dt, 2H, *J* = 47.5 Hz, *J* = 5.9 Hz, CH₂F), 4.31 (m, 1H, CH piperidine), 3.98 (m, 1H, CH piperidine), 3.14 (t, 1H, *J* = 13.9 Hz, CH piperidine), 2.81 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 2.63 (m, 1H, CH piperidine), 2.52 (s, 3H, CH₃), 1.82 (m, 1H, CH piperidine), 1.75-1.59 (m, 5H, 2 CH₂, CH piperidine), 1.33-1.23 (m, 2H, 2 CH piperidine), 1.04 (m, 1H, CH piperidine), 0.94 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 195.5 (C=O), 164.8 (C=O), 162.6 (C=O), 142.1 (C_{ar}), 141.5 (C_{ar}), 139.9 (C_{ar}), 135.8 (C_{ar}), 134.7 (C_{ar}), 132.8 (C_{ar}), 127.7 (C_{ar}), 125.8 (C_{ar}), 125.7 (2 C_{ar}), 122.2 (C_{ar}), 120.2 (2 C_{ar}), 119.8 (2 C_{ar}), 112.5 (C_{ar}), 109.3 (C_{ar}), 81.9 (d, *J* = 161.3 Hz, CH₂F), 47.6 (CH₂), 44.4 (C piperidine), 41.9 (CH₂), 41.8 (C piperidine), 36.2 (d, *J* = 18.5 Hz, CH₂CH₂F), 32.0 (C piperidine), 31.9 (C piperidine), 31.3 (C piperidine), 17.4 (CH₂), 13.7 (CH₃), 11.9 (CH₃).

HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₂H₃₆ClFN₅O₃ [M+H]⁺:.592.2485; found 592.2481.

N-[6-(4-Butanoyl-5-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl)pyridazin-3-yl]-5-chloro-1-[2-(4-(*tert*-butylcarboxy)-piperazin-1-yl)-2-oxoethyl]-1*H*-indole-3-carboxamide **55**



Chemical Formula: C₃₂H₃₇ClN₈O₅
Molecular Weight: 649,15 g.mol⁻¹

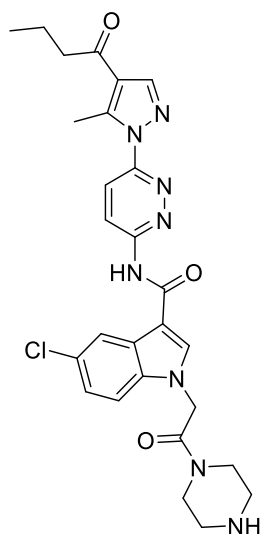
Prepared following general procedure A starting from **43** and 1-Boc-piperazin. Expected product **55** was obtained as a white solid in 55 % yield (purification: silica gel, DCM/MeOH 99/1 to 98/2).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 11.36 (s, 1H, NH), 8.71 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz, *H*_{ar}), 8.60 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.41 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.23 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, *H*_{ar}), 8.13 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz, *H*_{ar}), 7.57 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz, *H*_{ar}), 7.29 (dd, 1H, *J* = 9.1, *J* = 2.5 Hz, *H*_{ar}), 5.37 (s, 2H, NCH₂), 3.62-3.58 (m, 2H, CH₂ piperazine), 3.51-3.46 (m, 4H, CH₂ piperazine), 3.37-3.33 (m, 2H, CH₂ piperazine), 2.86 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂), 2.81 (s, 3H, CH₃), 1.64 (sext, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂), 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.94 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ 195.7 (C=O), 165.2 (C=O), 163.2 (C=O), 155.8 (C_{ar}), 153.8 (C_{ar}), 152.4 (C=O), 143.5 (C_{ar}), 142.8 (C_{ar}), 136.3 (C_{ar}), 135.8 (C_{ar}), 127.8 (C_{ar}), 126.3 (C_{ar}), 124.7 (C_{ar}), 122.5 (C_{ar}), 122.0 (C_{ar}), 121.3 (C_{ar}), 120.2 (C_{ar}), 112.8 (C_{ar}), 108.3 (C_{ar}), 79.2 (CMe₃), 47.9 (CH₂), 44.1 (CH₂ piperazine), 42.3 (CH₂), 41.4 (2 CH₂ piperazine), 39.5 (CH₂ piperazine - under solvent residual peak), 28.0 (3 CH₃), 17.3 (CH₂), 13.6 (CH₃), 12.5 (CH₃).

HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₂H₃₈ClN₈O₅ [M+H]⁺ : 649.2648; found: 649.2657.

N-[6-(4-Butanoyl-5-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl)pyridazin-3-yl]-5-chloro-1-[2-(piperazin-1-yl)-2-oxoethyl]-1*H*-indole-3-carboxamide **56**



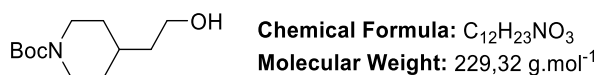
Chemical Formula: C₂₇H₂₉ClN₈O₃
Molecular Weight: 549,03 g.mol⁻¹

TFA (100 μ L) was added to a solution of **55** (15 mg, 0.024 mmol, 1 eq) in DCM (1 mL). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The reaction mixture was then concentrated under vacuum and product **56** was used without further purification (yellow solid, 13 mg, quant.).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 11.40 (s, 1H, NH), 9.02 (s, 1H, NH piperazine), 8.71 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz, H_{ar}), 8.57 (s, 1H, H_{ar}), 8.41 (s, 1H, H_{ar}), 8.23 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H_{ar}), 8.13 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz, H_{ar}), 7.59 (d, 1H, $J = 9.8$ Hz, H_{ar}), 7.30 (dd, 1H, $J = 9.8$ Hz and 2.1 Hz, H_{ar}), 5.40 (s, 2H, NCH₂), 3.83-3.79 (m, 2H, CH₂ piperazine), 3.70-3.66 (m, 2H, CH₂ piperazine), 3.31-3.24 (m, 2H, CH₂ piperazine), 3.16-3.12 (m, 2H, CH₂ piperazine), 2.86 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, CH₂), 2.81 (s, 3H, CH₃), 1.64 (sext, 2H, $J = 7.3$ Hz, CH₂), 0.94 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 195.7 (C=O), 165.3 (C=O), 163.2 (C=O), 158.4 (C_{ar}), 155.8 (C_{ar}), 152.5 (C_{ar}), 143.5 (CH_{ar}), 142.9 (C_{ar}), 136.2 (CH_{ar}), 135.8 (C_{ar}), 127.8 (C_{ar}), 126.3 (C_{ar}), 124.7 (CH_{ar}), 122.5 (CH_{ar}), 122.0 (CH_{ar}), 121.3 (C_{ar}), 120.2 (CH_{ar}), 108.4 (C_{ar}), 47.8 (CH₂), 42.7 (CH₂ piperazine), 42.6 (CH₂ piperazine), 42.3 (CH₂), 41.4 (CH₂ piperazine), 38.5 (CH₂ piperazine), 17.3 (CH₂), 13.6 (CH₃), 12.5 (CH₃).

HRMS (ESI): m/z calcd for C₂₇H₃₀ClN₈O₃ [M+H]⁺: 549.2124 ; found: 549.2127.

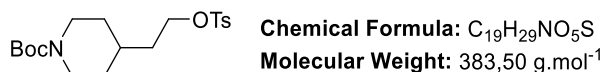
N-Boc-4(2-hydroxyethyl)piperidine 58

Di-*tert*-butyl dicarbonate (480 mg, 2.2 mmol, 1.1 eq) and triethylamine (422 μ L, 3.0 mmol, 1.5 eq) were added to a solution of 4(2-hydroxyethyl)piperidine (260 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq) in MeOH (5 mL). The mixture was stirred for 1 h at room temperature. The solvent was then evaporated and the crude was diluted with ethyl acetate (20 mL), washed with 1 N HCl (10 mL), saturated NaHCO₃ (10 mL) and brine (10 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. Product **58** was obtained as a colorless oil and used in the next step without further purification (450 mg, 98 %).

¹H (CDCl₃, 400 MHz): 4.05 (t, 2H, *J* = 11.5 Hz, CH₂), 3.68 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz, CH₂), 2.67 (t, 2H, *J* = 12.3 Hz, CH₂), 1.67-1.53 (m, 3H, CH₂, CH), 1.50 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz, CH₂), 1.43 (s, 9H, 3 CH₃), 1.15-1.05 (m, 2H, CH₂).

¹³C (CDCl₃, 100 MHz): 154.9 (C=O), 79.3 (C(CH₃)₃), 60.2 (CH₂), 44.0 (2 CH₂), 39.3 (CH₂), 32.5 (CH), 32.1 (2 CH₂), 28.5 (3 CH₃).

HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₁₂H₂₄NO₃ [M+H]⁺ : 230.1751; found: 230.1751.

N-Boc-4(2-tosylethyl)piperidine 59

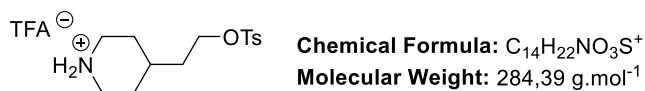
Tosyl chloride (230 mg, 1.2 mmol, 1.2 eq), triethylamine (210 μ L, 1.5 mmol, 1.5 eq) and DMAP (12 mg, 0.1 mmol, 0.1 eq) were added to a solution of **58** (230 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq) in CH₂Cl₂ (5 mL). The mixture was stirred for 18 h at room temperature. The crude was then diluted with CH₂Cl₂ (20 mL), washed with 1 N HCl (10 mL), saturated NaHCO₃ (10 mL) and brine (10 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified on silica gel chromatography (n-heptane/EtOAc 75/25 to 50/50) to afford **59** as a colorless oil (307 mg, 80 %).

¹H (CDCl₃, 400 MHz): 7.78 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, 2 *H*-Ar), 7.34 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, 2 *H*-Ar), 4.07-3.99 (m, 4H, 2 CH₂), 2.60 (t, 2H, *J* = 13.1 Hz, CH₂), 2.44 (s, 3H, CH₃), 1.62-1.48 (m, 5H, 2 CH₂, CH), 1.43 (s, 9H, 3 CH₃), 1.07-0.96 (m, 2H, CH₂).

¹³C (CDCl₃, 100 MHz): 154.8 (C=O), 144.9 (C-Ar), 132.9 (C-Ar), 129.9 (2 CH-Ar), 127.9 (2 CH-Ar), 79.4 (CMe₃), 68.0 (CH₂), 43.7 (2 CH₂), 35.2 (CH₂), 32.1 (CH), 31.6 (2 CH₂), 28.4 (3 CH₃), 21.7 (CH₃).

HRMS (ESI): m/z calcd for C₁₉H₃₀NO₅S [M+H]⁺ : 384.1839; found: 384.1843.

4-(2-tosylethyl)-piperidine 60



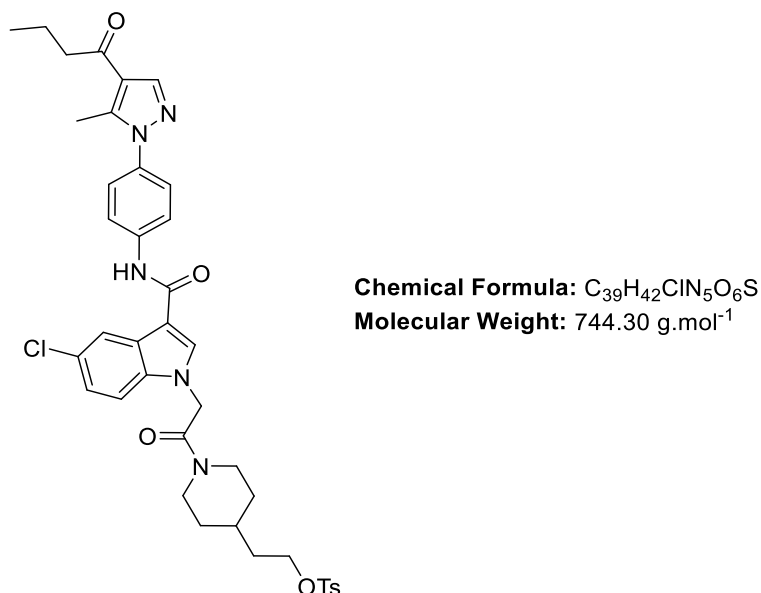
TFA (100 μL) was added to a solution of **59** (76 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq) in CH₂Cl₂ (1 mL) at 0 °C. The mixture was stirred for 1 h and the solvent was then evaporated under reduced pressure. After drying on high vacuum, product **60** was obtained as a salt and used without further purification (78 mg, quant., white gum).

¹H (CDCl₃, 400 MHz): 8.92 (br s, 1H, NH), 8.48 (br s, 1H, NH), 7.71 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, 2 *H*-Ar), 7.29 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, 2 *H*-Ar), 3.99 (t, 2H, *J* = 6.1 Hz, CH₂), 3.31 (d, 2H, *J* = 12.5 Hz, CH₂), 2.76 (q, 2H, *J* = 11.8 Hz, CH₂), 2.38 (s, 3H, CH₃), 1.73 (d, 2H, *J* = 14.1 Hz, CH₂), 1.63 (m, 1H, CH), 1.56 (q, 2H, *J* = 6.1 Hz, CH₂), 1.43-1.33 (m, 2H, CH₂).

¹³C (CDCl₃, 100 MHz): 145.2 (C-Ar), 132.6 (C-Ar), 130.0 (2 CH-Ar), 127.9 (2 CH-Ar), 67.2 (CH₂), 44.1 (2 CH₂), 34.6 (CH₂), 30.2 (CH), 28.2 (2 CH₂), 21.6 (CH₃).

HRMS (ESI): m/z calcd for C₁₄H₂₂NO₃S [M+H]⁺ : 284.1315; found: 284.1316.

2-(1-(2-(3-((4-(4-butyryl-5-methyl-1H-pyrazol-1-yl)phenyl)carbamoyl)-5-chloro-1H-indol-1-yl)acetyl)piperidin-4-yl)ethyl 4-methylbenzenesulfonate 61



Prepared following general procedure A starting from **41** and 4-(2-tosylethyl)-piperidine. Expected product **61** was obtained as a white solid in 61 % yield (purification: silica gel, DCM/MeOH 99/1 to 93/7).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 10.10 (s, 1H, NH), 8.28 (s, 1H, H_{ar}), 8.24 (s, 1H, H_{ar}), 8.20 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H_{ar}), 7.95 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, 2 H_{ar}), 7.82 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, 2 H_{ar}), 7.52-7.47 (m, 5H, 5 H_{ar}), 7.25 (dd, 1H, *J* = 8.8, *J* = 2.0 Hz, H_{ar}), 5.36 (d, 1H, *J* = 17.4 Hz, CHH-N), 5.30 (d, 1H, *J* = 17.4 Hz, CHH-N), 4.24 (m, 1H, CH piperidine), 4.09 (t, 2H, *J* = 5.8 Hz, CH₂), 3.92 (m, 1H, CH piperidine), 3.05 (t, 1H, *J* = 13.9 Hz, CH piperidine), 2.81 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 2.54 (m, 1H, CH piperidine), 2.52 (s, 3H, CH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃), 1.63 (sext, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂), 1.61-1.50 (m, 5H, CH₂, 3 CH piperidine), 1.26-1.16 (m, 2H, 2 CH piperidine), 0.94 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 195.5 (C=O), 164.8 (C=O), 162.6 (C=O), 144.9 (C_{ar}), 142.1 (C_{ar}), 141.5 (C_{ar}), 139.9 (C_{ar}), 135.8 (C_{ar}), 134.7 (C_{ar}), 132.8 (C_{ar}), 132.4 (C_{ar}), 130.2 (2 C_{ar}), 127.7 (C_{ar}), 127.6 (2 C_{ar}), 125.8 (C_{ar}), 125.7 (2 C_{ar}), 122.2 (C_{ar}), 120.2 (2 C_{ar}), 119.8 (2 C_{ar}), 112.6 (C_{ar}), 109.3 (C_{ar}), 68.6 (CH₂-OTs), 47.6 (CH₂), 44.3 (C piperidine), 41.9 (CH₂), 41.6 (C piperidine), 34.5 (CH₂), 31.7 (C piperidine), 31.5 (C piperidine), 30.9 (C piperidine), 21.1 (CH₃), 17.4 (CH₂), 13.7 (CH₃), 11.9 (CH₃).

HRMS (ESI): m/z calcd for C₃₉H₄₃ClN₅O₆S [M+H]⁺: 744.2617; found 744.2607.

I.2.2. ABT-702 compounds

General procedure B:

A solution of malononitrile (5.40 mmol, 1 eq), benzaldehyde (5.40 mmol, 1 eq) and piperidine (0.54 mmol, 0.1 eq) in toluene (8 mL) was stirred for 4 h at room temperature. EtOAc was added and the reaction mixture was washed with water, dried over sodium sulfate and concentrated. The crude product was purified by silica gel chromatography (n-heptane /EtOAc 9/1 to 8/2).

General procedure C:

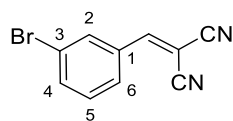
To a solution of dicyano compound (2.18 mmol, 1 eq) in dichloroethane (5 mL) were added **67** (2.40 mmol, 1.1 eq) and ammonium acetate (10.9 mmol, 5 eq) in a sealed tube. The reaction mixture was heated at 80 °C for 5 h. DCM was added and the mixture was washed with water and brine, dried over sodium sulfate and then concentrated. The crude product was used without further purification.

General procedure D:

The amino-nicotinonitrile compound (1.83 mmol, 1eq) and formamide (10 mL) were mixed in a sealed tube and the mixture was stirred at 180 °C for 2 h. The reaction was then cooled and water was added. The obtained precipitate was filtered and washed with water. The solid was further purified by silica gel chromatography (DCM/MeOH 97/3 to 95/5) and by reverse phase flash chromatography (H₂O/ACN/0.1 % formic acid 5/95) to afford the product.

General procedure E:

ABT-702 derivative (0.09 mmol, 1 eq), Boc₂O (0.22 mmol, 2.4 eq), trimethylamine (0.27 mmol, 3 eq) and DMAP (0.02 mmol, 0.2 eq) were added in DCM (1 mL) in a vial and heated at 40 °C. The heating was stopped after 2 hours and the mixture was stirred at 25 °C for an additional 4 days. DCM was added and the organic phase was washed with water, dried over sodium sulfate and then concentrated. The crude product was purified by silica gel chromatography (DCM/MeOH 98/2).

2-(3-bromobenzylidene)malononitrile 67

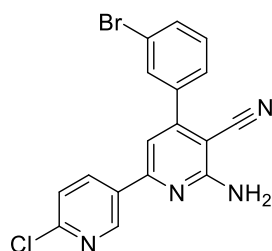
Chemical Formula: C₁₀H₅BrN₂
Molecular Weight: 233,07 g.mol⁻¹

Prepared following general procedure B starting from 3-fluorobenzaldehyde. Expected product **67** was obtained as a white powder in 74 % yield.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 8.53 (s, 1H, CH), 8.10 (t, 1H, *J* = 1.9 Hz, *H*_{ar-2}), 7.95 (dt, 1H, *J* = 7.9, *J* = 0.7 Hz, *H*_{ar-4}), 7.89 (ddd, 1H, *J* = 7.9, *J* = 1.9, *J* = 0.7 Hz, *H*_{ar-6}), 7.59 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz, *H*_{ar-5}).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ 159.8 (CH=C), 136.5 (CH_{ar-6}), 133.3 (C_{ar}), 132.8 (CH_{ar-2}), 131.6 (CH_{ar-2}), 128.9 (CH_{ar-4}), 122.3 (CBr), 113.8 (CN), 112.8 (CN), 83.5 (C(CN)₂).

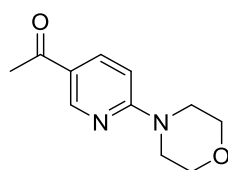
HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₁₀H₅BrN₂ [M+H]⁺: 232.9709 ; found: 232.9708.

6-amino-4-(3-bromophenyl)-6'-chloro-[2,3'-bipyridine]-5-carbonitrile 69

Chemical Formula: C₁₇H₁₀BrClN₄
Molecular Weight: 385,65 g.mol⁻¹

6-Chloro-3-acetylpyridine (60 mg, 0.39 mmol, 1 eq) and ammonium acetate (150 mg, 1.95 mmol, 5 eq) were added to a solution of **67** (100 mg, 0.43 mmol, 1.1 eq) in DCE (4 mL). The tube was sealed and the mixture was heated to 80 °C for 3 h. The mixture was cooled and washed with water and brine, then dried over sodium sulfate and concentrated. The crude product **69** (yellow solid) was used without further purification.

LC-MS (ESI): *m/z* calculated for C₁₇H₁₁BrClN₄ [M+H]⁺: 384.98; found: 384.95.

6-morpholinyl-3-acetylpyridine 71

Chemical Formula: C₁₁H₁₄N₂O₂
Molecular Weight: 206,25 g.mol⁻¹

6-chloro-3-acetylpyridine (2.0 g, 12.9 mmol, 1 eq) and morpholine (1.1 mL, 12.9 mmol, 1 eq) were dissolved in EtOH (15 mL) and the reaction mixture was refluxed at 80 °C. After 3 h, 1

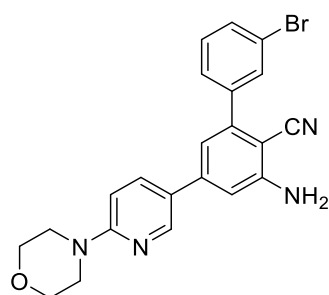
eq of morpholine was added to the reaction mixture and the reaction was continued for 2 hours. The mixture was concentrated *in vacuo* to remove the solvent and water (50 mL) was added. The product was extracted with EtOAc (2 x 150 mL) and the combined organic layers were washed with water then brine, dried over sodium sulfate and concentrated. The crude product was purified by silica gel chromatography (n-heptane/EtOAc 9/1 to 7/3) to afford **71** (2.1 g, 77 %) as a yellow solid.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 8.73 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, *H*_{ar}), 7.99 (dd, 1H, *J* = 9.0, *J* = 2.5 Hz, *H*_{ar}), 6.89 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, *H*_{ar}), 3.70-3.67 (m, 4H, 2 CH₂-morpholine), 3.64-3.62 (m, 4H, 2 CH₂-morpholine), 2.46 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ 194.9 (C=O), 160.2 (C_{ar}), 150.3 (CH_{ar}), 136.9 (CH_{ar}), 122.3 (C_{ar}), 105.7 (CH_{ar}), 65.8 (2 CH₂-morpholine), 44.5 (2 CH₂-morpholine), 26.1 (CH₃).

HRMS (ESI): m/z calcd for C₁₁H₁₅N₂O₂ [M+H]⁺: 207.1128 ; found: 207.1128.

2-Amino-4-(3-bromophenyl)-6-[2-(4-morpholinyl)5-pyridyl]nicotinonitrile **72**

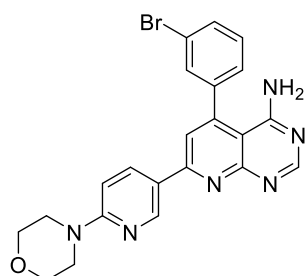


Chemical Formula: C₂₂H₁₉BrN₄O
Molecular Weight: 435,33 g.mol⁻¹

Prepared following general procedure C starting from **71**. Crude product **72** was obtained as a brown solid.

LC-MS (ESI): m/z calculated for C₂₂H₂₀BrN₄O [M+H]⁺: 435.07; found: 436.22.

5-(3-bromophenyl)-7-(6-morpholinopyridin-3-yl)pyrido[2,3-d]pyrimidin-4-amine **ABT 702**



Chemical Formula: C₂₂H₁₉BrN₆O
Molecular Weight: 463,34 g.mol⁻¹

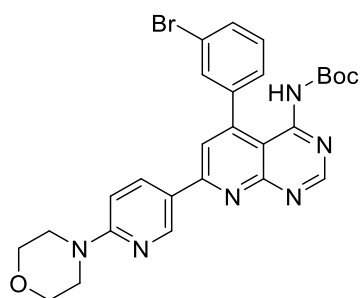
Prepared following general procedure D starting from **72**. Expected product **ABT-702** was obtained as a yellow/brown fluorescent solid in 39 % yield.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 9.08 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, *H*_{ar}), 8.53 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.48 (dd, 1H, *J* = 9.1 Hz, *J* = 2.4 Hz, *H*_{ar}), 7.86 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.85 (t, 1H, *J* = 1.2 Hz, *H*_{ar}), 7.78 (td, 1H, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.7, *H*_{ar}), 7.58-7.53 (m, 2H, *H*_{ar}), 6.98 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz, *H*_{ar}), 3.73-3.70 (m, 4H, 2 *CH*₂-morpholine), 3.62-3.60 (m, 4H, 2 *CH*₂-morpholine).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 161.9 (*C*_{ar}), 159.7 (*C*_{ar}), 159.6 (*C*_{ar}), 158.8 (*C*_{ar}), 158.1 (*C*_{ar}), 148.0 (*C*_{ar}), 147.7 (*CH*_{ar}), 140.4 (*C*_{ar}), 136.5 (*CH*_{ar}), 132.1 (*CH*_{ar}), 131.3 (*CH*_{ar}), 130.9 (*CH*_{ar}), 127.9 (*CH*_{ar}), 122.2 (2 *C*_{ar}), 119.2 (*CH*_{ar}), 106.4 (*CH*_{ar}), 104.5 (*C*_{ar}), 65.9 (2 *CH*₂-morpholine), 44.7 (2 *CH*₂-morpholine).

LC-MS (ESI): *m/z* calculated for C₂₂H₂₀BrN₆O [M+H]⁺: 463.08; found 463.10.

Tert-butyl (5-(3-bromophenyl)-7-(6-morpholinopyridin-3-yl)pyrido[2,3-d]pyrimidin-4-yl)carbamate 87



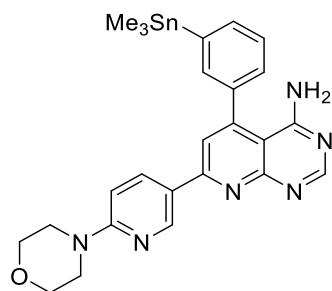
Chemical Formula: C₂₇H₂₇BrN₆O₃
Molecular Weight: 563,46 g.mol⁻¹

ABT 702 (300 mg, 0.65 mmol, 1 eq), Boc₂O (179 μL, 0.78 mmol, 1.2 eq), trimethylamine (136 μL, 0.98 mmol, 1.5 eq) and DMAP (8 mg, 0.07 mmol, 0.1 eq) were added to DCM (7 mL) into a sealed vial and refluxed for 3 days. The mixture was cooled down and DCM (20 mL) was added. The mixture was washed with water and the organic phase was dried over sodium sulfate then concentrated. The solid was purified by reverse flash chromatography (95 % to 35 % H₂O/MeCN + 0.01 TFA) to afford **87** as a yellow brown solid (127 mg, 35 %).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 9.90 (br s, 1H, NH), 9.23 (s, 1H, *H*_{ar}), 9.04 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.57 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, *H*_{ar}), 8.06 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.85 (t, 1H, *J* = 1.2 Hz, *H*_{ar}), 7.69 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, *H*_{ar}), 7.45-7.38 (massif, 2H, *H*_{ar}), 7.02 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, *H*_{ar}), 3.74-3.72 (m, 4H, 2 *CH*₂-morpholine), 3.66-3.64 (m, 4H, 2 *CH*₂-morpholine), 1.21 (s, 9H, *CMe*₃).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 159.8 (*C*_{ar}), 154.1 (*C*_{ar}), 151.5 (*C*_{ar}), 148.9 (C=O), 148.7 (*CH*_{ar}), 140.0 (*C*_{ar}), 136.8 (*CH*_{ar}), 131.8 (*CH*_{ar}), 131.1 (*CH*_{ar}), 130.9 (*C*_{ar}), 129.6 (*CH*_{ar}), 128.7 (*CH*_{ar}), 124.2 (*C*_{ar}), 122.2 (*C*_{ar}), 121.9 (*C*_{ar}), 121.4 (*C*_{ar}), 120.6 (*CH*_{ar}), 106.4 (*CH*_{ar}), 101.2 (*C*_{ar}), 80.0 (C(CH₃)₃), 65.9 (2 *CH*₂-morpholine), 44.6 (2 *CH*₂-morpholine), 27.7 (3 *CH*₃).

HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₇H₂₈BrN₆O₃ [M+H]⁺: 563.1401; found: 563.1400.

7-(6-morpholinopyridin-3-yl)-5-(3-(trimethylstannyl)phenyl)pyrido[2,3-d]pyrimidin-4-amine
90

Chemical Formula: C₂₅H₂₈N₆OSn
Molecular Weight: 547,25 g.mol⁻¹

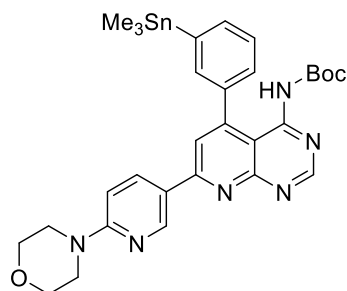
87 (25.0 mg, 0.044 mmol, 1 eq), tetrakis(triphenylphosphine)palladium (5.0 mg, 0.004 mmol, 0.1 eq) and 1,4-dioxane (500 µL) were added in a sealed tube. Argon was bubbled through the solution for 10 min prior to hexamethylditin (17 µL, 0.081 mmol, 1.85 eq) addition. Argon was bubbled through the solution for another 10 minutes and the mixture was stirred at 100 °C for 2 hours. The solution was concentrated *in vacuo* and purified by silica gel chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 95/5) to obtain **90** as a yellow product (10 mg, 42 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 9.07 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, NH₂), 8.52 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.47 (dd, 1H, *J* = 9.2 Hz, 2.4 Hz, *H*_{ar}), 7.83 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.70 (dt, 1H, *J* = 7.1 Hz, 1.0 Hz, *H*_{ar}), 7.64-4.49 (m, 5H, *H*_{ar}), 6.98 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, *H*_{ar}), 3.71-3.60 (m, 8H, CH₂-morpholine), 0.31 (s, 9H, Sn(CH₃)₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ 162.1 (*C*_{ar}), 159.7 (*C*_{ar}), 159.6 (*C*_{ar}), 158.7 (*C*_{ar}), 158.2 (*C*_{ar}), 149.7 (*C*_{ar}), 147.9 (CH_{ar}), 143.7 (*C*_{ar}), 138.1 (CH_{ar}), 138.1 (CH_{ar}), 136.5 (CH_{ar}), 135.2 (CH_{ar}), 128.4 (CH_{ar}), 128.2 (CH_{ar}), 122.3 (*C*_{ar}), 118.9 (CH_{ar}), 106.4 (CH_{ar}), 104.9 (*C*_{ar}), 65.9 (2 CH₂), 44.7 (2 CH₂), -9.1 (Sn(CH₃)₃).

HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₅H₂₉N₆O₃Sn [M+H]⁺: 549.1419; found: 549.1417.

tert-butyl (7-(6-morpholinopyridin-3-yl)-5-(3-(trimethylstannyl)phenyl)pyrido[2,3-d]pyrimidin-4-yl)carbamate **91**



Chemical Formula: C₃₀H₃₆N₆O₃Sn
Molecular Weight: 647,37 g.mol⁻¹

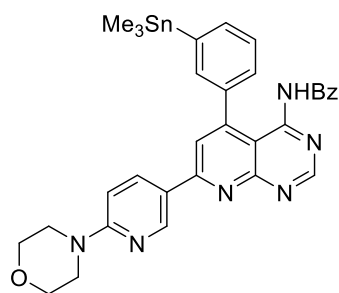
Prepared following general procedure E starting from **90**. Expected product **91** was obtained as a yellow powder in 45 % yield.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 9.44 (s, 1H, NH), 9.19 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, *H*_{ar}), 9.02 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.55 (dd, 1H, *J* = 8.9 Hz, 2.5 Hz, *H*_{ar}), 8.03 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.70 (m, 1H, *H*_{ar}), 7.59 (m, 1H, *H*_{ar}), 7.43-7.42 (m, 2H, 2 *H*_{ar}), 7.01 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, *H*_{ar}), 3.74-3.72 (m, 4H, 2 CH₂-morpholine), 3.66-3.63 (m, 4H, 2 CH₂-morpholine), 1.13 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.31 (s, 9H, Sn(CH₃)₃)

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ 160.5 (*C*_{ar}), 160.1 (*C*_{ar}), 159.7 (*C*_{ar}), 157.6 (*C*_{ar}), 156.5 (*CH*_{ar}), 150.7 & 150.6 (C=O & *C*_{ar}), 148.5 (*CH*_{ar}), 142.2 (*C*_{ar}), 137.4 (*CH*_{ar}), 136.8 (*C*_{ar}), 135.9 (*CH*_{ar}), 135.8 (*CH*_{ar}), 129.3 (*CH*_{ar}), 127.5 (*CH*_{ar}), 122.0 (*C*_{ar}), 120.4 (*CH*_{ar}), 109.0 (*C*_{ar}), 106.5 (*CH*_{ar}), 79.8 (C(CH₃)₃), 65.9 (2 CH₂), 44.6 (2 CH₂), 27.7 (C(CH₃)₃), -9.2 (Sn(CH₃)₃).

HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₀H₃₇N₆O₃Sn [M+H]⁺ : 649.1944 ; found: 649.1944

N-(7-(6-morpholinopyridin-3-yl)-5-(3-(trimethylstannyl)phenyl)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)benzamide **92**



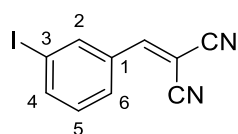
Chemical Formula: C₃₂H₃₂N₆O₂Sn
Molecular Weight: 651,36 g.mol⁻¹

Benzoyl chloride (5 μL, 0.041 mmol, 1.1 eq) and pyridine (3 μL, 0.037 mmol, 1 eq) were added to a solution of **90** (20 mg, 0.037 mmol, 1 eq) in DCM (100 μL) and the solution was stirred at room temperature for 24 h. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* and purified by silica gel chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 95/5) to give **92** as a yellow solid (15 mg, 63 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 9.20 (s, 1H, NH), 8.59-8.56 (m, 2H, 2 *H*_{ar}), 8.01 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.94 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, *H*_{ar}), 7.52-7.16 (m, 9H, 9 *H*_{ar}), 7.03 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, *H*_{ar}), 3.74-3.70 (m, 4H, 2 CH₂-morpholine), 3.67-3.64 (m, 4H, 2 CH₂-morpholine), 0.54 (s, 3H, CH₃), 0.17 (s, 6H, 2 CH₃)

HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₂H₃₃N₆O₂Sn [M+H]⁺ : 653.1681 ; found: 653.1678

2-(3-iodobenzylidene)malononitrile **77**



Chemical Formula: C₁₀H₅IN₂
Molecular Weight: 280,07 g.mol⁻¹

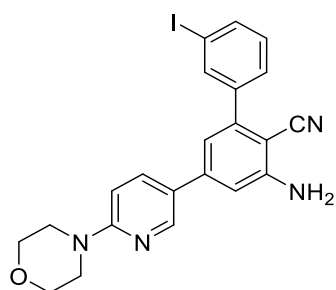
Prepared following general procedure B starting from 3-fluorobenzaldehyde. Expected product **77** was obtained as a white powder in 72 % yield.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.48 (s, 1H, *CH*), 8.26 (t, 1H, *J* = 1.5 Hz, *H*_{ar-2}), 8.04 (dt, 1H, *J* = 8.0 Hz, 0.9 Hz, *H*_{ar-4}), 7.96 (dt, 1H, *J* = 8.0 Hz, 0.9 Hz, *H*_{ar-6}), 7.42 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, *H*_{ar-5}).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 159.8 (*CH=C*), 142.3 (*CH*_{ar}), 138.7 (*CH*_{ar}), 133.2 (*C*_{ar}), 131.3 (*CH*_{ar}), 129.1 (*CH*_{ar}), 113.9 (*CN*), 112.8 (*CN*), 95.6 (*CI*), 83.1 (*C(CN)₂*).

HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₁₀H₅IN₂ [*M+H*]⁺: non-ionized by ESI source.

2-Amino-4-(3-iodophenyl)-6-[2-(4-morpholinyl)5-pyridyl]nicotinonitrile 81

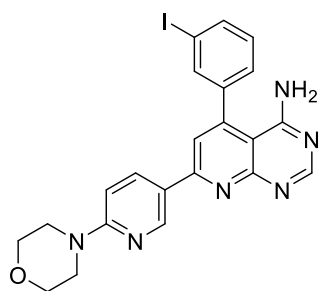


Chemical Formula: C₂₂H₁₉IN₄O
Molecular Weight: 482,33 g.mol⁻¹

Prepared following general procedure C starting from **77**. Crude product **81** was obtained as a brown solid.

LC-MS (ESI): *m/z* calculated for C₂₂H₂₀IN₄O [*M+H*]⁺: 483.06; found: 384.23.

*5-(3-iodophenyl)-7-(6-morpholinopyridin-3-yl)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-4-amine 85*



Chemical Formula: C₂₂H₁₉IN₆O
Molecular Weight: 510,34 g.mol⁻¹

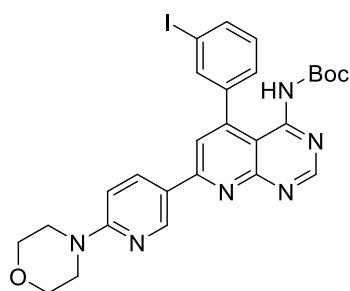
Prepared following general procedure D starting from **81**. Expected product **85** was obtained as a brown powder in 38 % yield.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 9.08 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, *H*_{ar}), 8.53 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.47 (dd, 1H, *J* = 9.0, *J* = 2.4 Hz, *H*_{ar}), 7.98 (t, 1H, *J* = 1.5 Hz, *H*_{ar}), 7.95 (dt, 1H, *J* = 7.8, *J* = 1.5 Hz, *H*_{ar}), 7.84 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.58 (dt, 1H, *J* = 7.8, *J* = 1.5 Hz, *H*_{ar}), 7.37 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, *H*_{ar}), 6.97 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, *H*_{ar}), 3.73-3.70 (m, 4H, 2 *CH*₂-morpholine), 3.62-3.59 (m, 4H, 2 *CH*₂-morpholine).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 161.9 (C_{ar}), 159.6 (CH_{ar}), 158.8 (C_{ar}), 158.1 (C_{ar}), 157.7 (C_{ar}), 148.0 (CH_{ar}), 147.7 (C_{ar}), 140.3 (C_{ar}), 137.9 (CH_{ar}), 136.8 (CH_{ar}), 136.5 (CH_{ar}), 130.8 (CH_{ar}), 128.2 (CH_{ar}), 122.2 (C_{ar}), 119.1 (CH_{ar}), 106.5 (CH_{ar}), 104.5 (C_{ar}), 95.52 (I- C_{ar}), 65.9 (2 CH_2), 44.7 (2 CH_2).

HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{IN}_6\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 511.0738 ; found: 511.0736

Tert-butyl (5-(3-iodophenyl)-7-(6-morpholinopyridin-3-yl)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)carbamate **94**



Chemical Formula: $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{IN}_6\text{O}_3$
Molecular Weight: 610,46 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

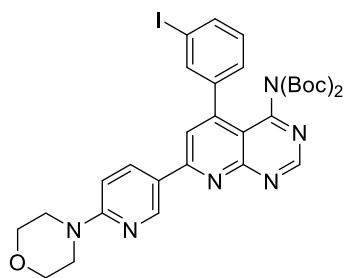
Prepared following general procedure E starting from **85**. Expected product **94** was obtained as a brown powder in 35 % yield.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 9.83 (s, 1H, NH), 9.21 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, H_{ar}), 9.03 (s, 1H, H_{ar}), 8.57 (dd, 1H, $J = 9.1$, $J = 2.4$ Hz, H_{ar}), 8.05 (s, 1H, H_{ar}), 8.02 (s, 1H, H_{ar}), 7.84 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, H_{ar}), 7.44 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, H_{ar}), 7.23 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz, H_{ar}), 7.01 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz, H_{ar}), 3.74-3.71 (m, 4H, 2 CH_2 -morpholine), 3.66-3.63 (m, 4H, 2 CH_2 -morpholine), 1.20 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 160.5 (C_{ar}), 160.4 (C_{ar}), 159.8 (C_{ar}), 157.4 (C_{ar}), 156.5 (C_{ar}), 151.2 ($\text{C}=\text{O}$), 148.9 (C_{ar}), 148.7 (C_{ar}), 139.9 (C_{ar}), 137.3 (C_{ar}), 137.0 (C_{ar}), 136.8 (C_{ar}), 129.6 (C_{ar}), 129.0 (C_{ar}), 121.9 (C_{ar}), 120.6 (C_{ar}), 109.2 (C_{ar}), 106.4 (C_{ar}), 94.7 (I- C_{ar}), 80.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 65.9 (2 CH_2 -morpholine), 44.6 (2 CH_2 -morpholine), 27.8 (3 CH_3).

HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{IN}_6\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 611.1262 ; found: 611.1253

Di-tert-butyl (5-(3-iodophenyl)-7-(6-morpholinopyridin-3-yl)pyrido[2,3-d]pyrimidin-4-yl)carbamate 93



Chemical Formula: C₃₂H₃₅IN₆O₅
Molecular Weight: 710,57 g.mol⁻¹

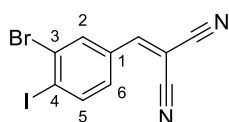
Prepared following general procedure E starting from **85**. Expected product **93** was obtained as a brown powder in 21 % yield.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 9.34 (s, 1H, *H*_{ar}), 9.22 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, *H*_{ar}), 8.58 (dd, 1H, *J* = 9.1, *J* = 2.4 Hz, *H*_{ar}), 8.15 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.90-7.88 (m, 2H, 2 *H*_{ar}), 7.49 (dt, 1H, *J* = 7.9, *J* = 1.2 Hz, *H*_{ar}), 7.25 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz, *H*_{ar}), 7.02 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz, *H*_{ar}), 3.73-3.71 (m, 4H, 2 CH₂-morpholine), 3.67-3.65 (m, 4H, 2 CH₂-morpholine), 1.31 (s, 18H, 2 C(CH₃)₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ 161.3 (*C*_{ar}), 160.8 (*C*_{ar}), 159.9 (*C*_{ar}), 158.8 (*C*_{ar}), 157.3 (*C*_{ar}), 149.6 & 149.2 (*C*_{ar}, 2 C=O), 147.2 (*C*_{ar}), 139.4 (*C*_{ar}), 137.5 (*C*_{ar}), 137.0 (*C*_{ar}), 136.5 (*C*_{ar}), 129.8 (*C*_{ar}), 128.4 (*C*_{ar}), 122.8 (*C*_{ar}), 121.4 (*C*_{ar}), 113.5 (*C*_{ar}), 106.4 (*C*_{ar}), 94.9 (*C*_{ar}), 83.5 (2 C(CH₃)₃), 65.9 (2 CH₂-morpholine), 44.6 (2 CH₂-morpholine), 27.4 (6 CH₃).

LC-MS (ESI): m/z calcd for C₃₂H₃₆IN₆O₅ [M+H]⁺ : 711.17 ; found: 711.15

2-(3-bromo-4-iodobenzylidene)malononitrile 79



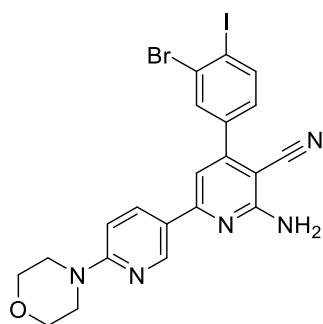
Chemical Formula: C₁₀H₄BrIN₂
Molecular Weight: 358,96 g.mol⁻¹

Prepared following general procedure B starting from 3-bromo-4-iodobenzaldehyde. Expected product **79** was obtained as a white powder in 70 % yield.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 8.47 (s, 1H, CH), 8.23 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, *H*_{ar-5}), 8.18 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, *H*_{ar-2}), 7.64 (dd, 1H, *J* = 8.2, *J* = 2.0 Hz, *H*_{ar-6}).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ 159.1 (CH=C), 141.3 (CH_{ar}), 133.7 (CH_{ar}), 132.6 (*C*_{ar}), 130.2 (*C*_{ar}), 129.1 (CH_{ar}), 113.9 (CN), 112.8 (CN), 110.2 (*C*_{ar}), 83.5 (C(CN)₂).

HRMS (ESI): m/z calcd for C₁₀H₅BrIN₂ [M+H]⁺ : non-ionized by ESI source.

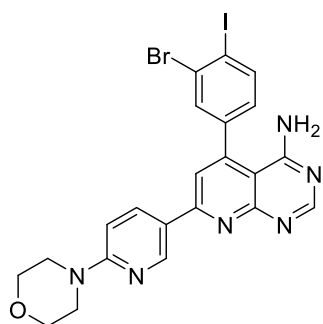
2-Amino-4-(3-bromo-4-iodophenyl)-6-[2-(4-morpholinyl)5-pyridyl]nicotinitrile **83**

Chemical Formula: C₂₁H₁₇BrIN₅O

Molecular Weight: 562,21 g.mol⁻¹

Prepared following general procedure C starting from **79**. Crude product **83** was obtained as a brown solid.

LC-MS (ESI): m/z calculated for C₂₁H₁₈BrIN₅O [M+H]⁺: 561.37; found: 562.00.

5-(3-bromo-4-iodophenyl)-7-(6-morpholinopyridin-3-yl)pyrido[2,3-d]pyrimidin-4-amine **86**

Chemical Formula: C₂₂H₁₈BrIN₆O

Molecular Weight: 589,24 g.mol⁻¹

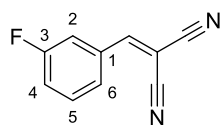
Prepared following general procedure D starting from **83**. Expected product **86** was obtained as a brown powder in 3 % yield.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 9.11 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.52 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.46 (dd, 1H, *J* = 9.1, *J* = 1.8 Hz, *H*_{ar}), 8.09 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, *H*_{ar}), 7.97 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, *H*_{ar}), 7.86 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.28 (dd, 1H, *J* = 8.1, *J* = 2.1 Hz, *H*_{ar}), 6.97 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz, *H*_{ar}), 3.72-3.70 (m, 4H, 2 CH₂ morpholine), 3.62-3.59 (m, 4H, 2 CH₂ morpholine).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ 161.9 (*C*_{ar}), 159.6 (*C*_{ar}), 158.8 (2 *C*_{ar}), 158.1 (*C*_{ar}), 148.0 (*C*_{ar}), 146.9 (*C*_{ar}), 140.3 (*C*_{ar}), 139.5 (*C*_{ar}), 138.8 (*C*_{ar}), 136.5 (*C*_{ar}), 132.7 (*C*_{ar}), 129.6 (2 *C*_{ar}), 122.2 (*C*_{ar}), 119.2 (*C*_{ar}), 106.4 (*C*_{ar}), 103.5 (*C*_{ar}), 65.9 (2 CH₂-morpholine), 44.7 (2 CH₂-morpholine).

LC-MS (ESI): m/z calculated for C₂₂H₁₉BrIN₆O [M+H]⁺:587.98; found 588.96

2-(3-Fluorobenzylidene)malononitrile **78**



Chemical Formula: C₁₀H₅FN₂
Molecular Weight: 172,16 g.mol⁻¹

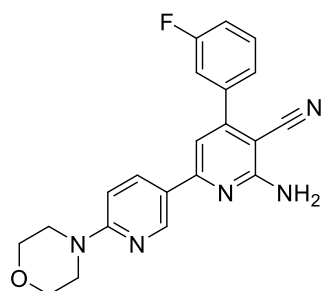
Prepared following general procedure B starting from 3-fluorobenzaldehyde. Expected product **78** was obtained as a white powder in 65 % yield.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 8.56 (s, 1H, CH), 7.79 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, *H*_{ar-6}), 7.74 (dt, 1H, *J* = 9.0, *J* = 2.5 Hz, *H*_{ar-2}), 7.69 (td, 1H, *J* = 7.9, *J* = 5.9 Hz, *H*_{ar-5}), 7.57 (td, 1H, *J* = 7.9, *J* = 2.5 Hz, *H*_{ar-4}).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ 161.8 (d, *J* = 245.8 Hz, *C*_{ar-F}), 160.0 (d, *J* = 3.1 Hz, CH=C), 133.2 (d, *J* = 8.0 Hz, *C*_{ar}), 131.7 (d, *J* = 8.6 Hz, CH_{ar}), 126.6 (d, *J* = 2.6 Hz, CH_{ar}), 121.0 (d, *J* = 21.3 Hz, CH_{ar}), 116.4 (d, *J* = 23.1 Hz, CH_{ar}), 113.8 (CN), 112.8 (CN), 83.5 (C(CN)₂).

HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₁₀H₅FN₂ [M+H]⁺: 173.0509 ; found: 173.0511.

2-Amino-4-(3-fluorophenyl)-6-[2-(4-morpholinyl)5-pyridyl]nicotinonitrile **82**

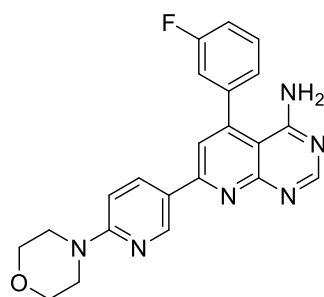


Chemical Formula: C₂₁H₁₈FN₅O
Molecular Weight: 375,41 g.mol⁻¹

Prepared following general procedure C starting from **78**. Crude product **82** was obtained as a brown solid.

HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₁H₁₉FN₅O [M+H]⁺: 376.1568 ; found: 376.1573.

5-(3-fluorophenyl)-7-(6-morpholinopyridin-3-yl)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-4-amine **63**



Chemical Formula: C₂₂H₁₉FN₆O
Molecular Weight: 402,43 g.mol⁻¹

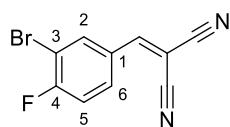
Prepared following general procedure D starting from **82**. Expected product **63** was obtained as a brown solid in 26 % yield.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 9.08 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, *H*_{ar}), 8.53 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.47 (dd, 1H, *J* = 9.0, *J* = 2.5 Hz, *H*_{ar}), 7.85 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.63 (tt, 1H, *J* = 8.6, *J* = 6.0 Hz, *H*_{ar}), 7.50 (ddd, 1H, *J* = 9.0, *J* = 2.5, *J* = 1.9 Hz, *H*_{ar}), 7.43 (dd, 1H, *J* = 8.6, *J* = 2.5 Hz, *H*_{ar}), 7.40 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, *H*_{ar}), 6.98 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, *H*_{ar}), 3.73-3.70 (m, 4H, 2 *CH*₂-morpholine), 3.62-3.59 (m, 4H, 2 *CH*₂-morpholine).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 162.0 (d, *J* = 246.8 Hz, *C*_{ar}-F), 161.9 (*C*_{ar}), 159.7 (*C*_{ar}), 159.6 (*C*_{ar}), 158.8 (*C*_{ar}), 158.2 (*CH*_{ar}), 148.0 (*CH*_{ar}), 147.9 (*C*_{ar}), 140.4 (d, *J* = 8.0 Hz, *C*_{ar}), 136.5 (*CH*_{ar}), 131.0 (d, *J* = 8.6 Hz, *CH*_{ar}), 125.0 (d, *J* = 3.0 Hz, *CH*_{ar}), 122.2 (*C*_{ar}), 119.1 (*CH*_{ar}), 116.1 (d, *J* = 20.9 Hz, *CH*_{ar}), 116.0 (d, *J* = 22.8 Hz, *CH*_{ar}), 106.4 (*CH*_{ar}), 104.6 (*C*_{ar}), 65.9 (2 *CH*₂), 44.7 (2 *CH*₂).

HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₂H₂₀FN₆O [*M*+*H*]⁺: 403.1677; found: 403.1683.

2-(3-bromo-4-fluorobenzylidene)malononitrile **80**



Chemical Formula: C₁₀H₄BrFN₂
Molecular Weight: 251,06 g.mol⁻¹

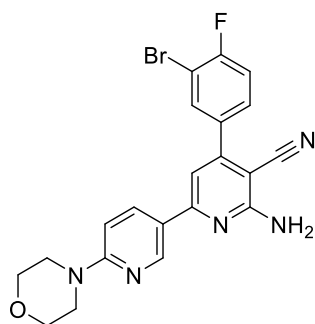
Prepared following general procedure B starting from 3-bromo-4-fluorobenzaldehyde. Expected product **63** was obtained as a yellow powder in 77 % yield.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.52 (s, 1H, *CH*), 8.27 (dd, 1H, *J* = 6.7, *J* = 2.5 Hz, *H*_{ar-2}), 8.04 (ddd, 1H, *J* = 8.8, *J* = 5.0, *J* = 2.5 Hz, *H*_{ar-6}), 7.68 (t, 1H, *J* = 8.8 Hz, *H*_{ar-5}).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 161.1 (d, *J* = 255.3 Hz, *C*_{ar}-F), 158.7 (*CH*=*C*), 136.0 (d, *J* = 1.5 Hz, *C*_{ar}), 132.0 (d, *J* = 9.1 Hz, *CH*_{ar}), 129.4 (d, *J* = 3.6 Hz, *CH*_{ar}), 118.1 (d, *J* = 23.3 Hz, *CH*_{ar}), 113.8 (*CN*), 112.8 (*CN*), 109.3 (d, *J* = 21.9 Hz, *CBr*), 82.9 (d, *J* = 2.2 Hz, *C*(*CN*)₂).

HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₁₀H₅BrIN₂ [*M*+*H*]⁺: non-ionized by ESI source.

2-Amino-4-(3-bromo-4-fluorophenyl)-6-[2-(4-morpholinyl)5-pyridyl]nicotinonitrile **84**



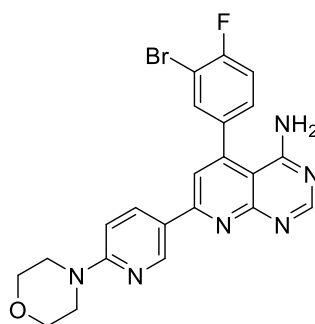
Chemical Formula: C₂₁H₁₇BrFN₅O

Molecular Weight: 454,30 g.mol⁻¹

Prepared following general procedure C starting from **80**. Expected product **84** was obtained as a brown solid.

LC-MS (ESI): m/z calculated for C₂₁H₁₈BrFN₅O [M+H]⁺: 543.06; found: 454.03.

5-(3-bromo-4-fluorophenyl)-7-(6-morpholinopyridin-3-yl)pyrido[2,3-d]pyrimidin-4-amine **64**



Chemical Formula: C₂₂H₁₈BrFN₆O

Molecular Weight: 481,33 g.mol⁻¹

Prepared following general procedure D starting from **84**. Expected product **64** was obtained as a brown powder in 20 % yield.

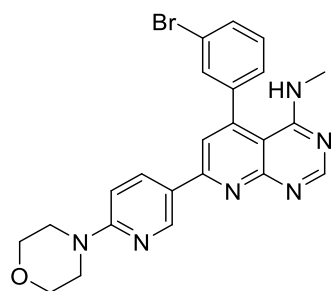
¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 9.09 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, *H*_{ar}), 8.52 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.47 (dd, 1H, *J* = 9.1, *J* = 2.4 Hz, *H*_{ar}), 8.01 (dd, 1H, *J* = 6.8, *J* = 2.0 Hz, *H*_{ar}), 7.86 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.62-7.54 (m, 2H, 2 *H*_{ar}), 6.98 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz, *H*_{ar}), 3.73-3.70 (m, 4H, 2 CH₂-morpholine), 3.62-3.60 (m, 4H, 2 CH₂-morpholine).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ 161.9 (*C*_{ar}), 160.9 (d, *J* = 246.8 Hz, *C*_{ar}-F), 159.8 (*C*_{ar}), 159.6 (*C*_{ar}), 158.8 (*C*_{ar}), 158.1 (CH_{ar}), 148.0 (CH_{ar}), 146.9 (*C*_{ar}), 136.5 (*C*_{ar}), 134.0 (CH_{ar}), 132.6 (CH_{ar}), 130.6 (d, *J* = 7.0 Hz, CH_{ar}), 122.2 (*C*_{ar}), 119.5 (CH_{ar}), 117.0 (d, *J* = 21.3 Hz, CH_{ar}), 108.9 (CBr), 106.4 (CH_{ar}), 104.7 (*C*_{ar}), 65.9 (2 CH₂), 44.7 (2 CH₂).

HRMS (ESI): m/z calcd for C₂₂H₁₉FN₆O [M+H]⁺ : 481.0782 ; found: 481.0781

5-(3-bromophenyl)-N-methyl-7-(6-morpholinopyridin-3-yl)pyrido[2,3-d]pyrimidin-4-amine

62

**Chemical Formula:** C₂₃H₂₁BrN₆O**Molecular Weight:** 477,37 g.mol⁻¹

Iodomethane (34 μ L, 0.55 mmol, 5 eq) was added to a solution of **ABT-702** (50.0 mg, 0.11 mmol, 1 eq) in DMF (500 μ L). The reaction mixture was heated to 40 °C for 1 hour. Then the reaction was concentrated. The product was purified by silica gel chromatography (DCM/MeOH 95/5 to 90/10) to obtain **62** as a white solid (16 mg, 30 %)

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 9.22 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz, H_{ar}), 8.90 (s, 1H, H_{ar}), 8.54 (dd, 1H, $J = 9.1$, $J = 2.5$ Hz, H_{ar}), 8.13 (s, 1H, H_{ar}), 7.89 (t, 1H, $J = 1.7$ Hz, H_{ar}), 7.79 (dt, 1H, $J = 7.6$, $J = 1.7$ Hz, H_{ar}), 7.58-7.51 (m, 2H, H_{ar}), 7.00 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz, H_{ar}), 4.00 (s, 3H, CH₃), 3.74-3.72 (m, 4H, 2 CH₂-morpholine), 3.68-3.66 (m, 4H, 2 CH₂-morpholine).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ 162.4 (C_{ar}), 159.9 (C_{ar}), 159.1 (C_{ar}), 153.7 (CH_{ar}), 150.0 (C_{ar}), 149.4 (CH_{ar} or C_{ar}), 149.3 (CH_{ar} or C_{ar}), 138.1 (C_{ar}), 136.8 (CH_{ar}), 132.6 (CH_{ar}), 131.7 (CH_{ar}), 131.0 (CH_{ar}), 128.2 (CH_{ar}), 122.3 (C_{ar}), 121.2 (CH_{ar}), 120.5 (C_{ar}), 106.4 (CH_{ar}), 104.1 (C_{ar}), 65.9 (2 CH₂), 44.6 (2 CH₂), 36.4 (CH₃).

HRMS (ESI): m/z calcd for C₂₃H₂₂BrN₆O [M+H]⁺ : 477.1033 ; found: 477.1030

II. Radiochemistry

II.1. General information

Radiosyntheses were performed on commercially available synthesizers installed in 7.5 cm lead shielded hotcells. Before each synthesis, the synthesizer was purged from any residual chemicals or solvents leftovers (reservoirs, reactors and tubings) from a previous radiotracer production, cleaned with distilled water and dried with acetone and ethanol. Chemicals were purchased from commercial companies and used as received. All cartridges were supplied by Waters (USA) under the Sep-Pak[®] designation.

The radiochemical yield (RCY) was calculated as the ratio of the decay-corrected activity of the radiotracer at the end of the synthesis measured in an ionization chamber (Capintec[®], Berthold, France) over the activity of the starting material ($[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ or $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$) measured by a calibrated gamma counter inside the synthesizer.

II.2. Analytical methods

II.2.1. Quality control

The quality control was realized by analytical HPLC performed on a Waters Alliance 2690 equipped with a UV spectrophotometer (Photodiode Array Detector, Waters 996 (Waters)) and a Berthold LB509 radioactivity detector. HPLC were realized on an analytical Symmetry-M[®] C-18, 50×4.6 mm, 5 μm (Waters) with two eluents; solvent A: H₂O containing Low-UV PIC[®] B7 reagent (20 mL for 1000 mL), solvent B: H₂O/CH₃CN: 30/70 (v/v) containing Low-UV PIC[®] B7 reagent (20 mL for 1000 mL), flow rate: 2.0 mL/min; UV detection at $\lambda=254$ nm and 310 nm. The system was operated with the Empower 3 (Waters, USA) software. The chemical identification of the peak was determined by comparing the retention time of the radiotracer with the retention time of the non-radioactive reference (t_{Rref}). Radiochemical and chemical purities were calculated as the ratio of the area under the peak of the radiotracer peak over the sum of the area under the peak of all other peaks on gamma and UV chromatograms respectively. Molar activity (MA) was calculated as the ratio of the activity of the collected peak of the radioatracer measured in an ionization chamber (Capintec[®], Berthold, France) over the molar quantity of the non-radioactive compound determined using a calibration curve. MA was calculated as the mean value of three consecutive runs.

II.2.2. Thin Layer Chromatography

Thin Layer Chromatography (TLC) was performed on pre-coated plates of silica gel 60F254 (Merck, USA) and eluted with a mixture of MeOH/DCM. Radio-TLC plates were read on a RITA Star (Elysia Raytest, Germany) radioTLC reader and analyzed with GINA Star software (version 6.0).

II.3. Carbon-11 radiochemistry

II.3.1. Radioisotope production

No carrier added [^{11}C]CO₂ was produced *via* the $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ nuclear reaction by irradiation of a [^{14}N]N₂ target containing 0.15 to 0.5 % of O₂ on an Cyclone 18/9 cyclotron (18 MeV proton beam, IBA, Belgium) and transferred to the appropriate hot cell containing the radiosynthesizer. Target hardware: 50 mL, aluminum target holder (135 mm length, 64 mm diameter) (IBA, Belgium). Target to hot cell liquid-transfer system: 60 m stainless steel line (1/8 inch external diameter), pressure let-down driven. Typical transfer time varies from 3 to 6 minutes. Typical production of [^{11}C]CO₂ at the end of bombardment for a 25 μA and 45 min (19 $\mu\text{A}\cdot\text{h}$) irradiation is around 35-45 GBq.

II.3.2. Experimental procedures for the automated production of C-11 tracers

II.3.2.a. TRACERLab™ FX C Pro

TRACERLab™ FX C Pro (GE HealthCare, Sweden) radiosynthesizer employs the gaseous method for production of [^{11}C]CH₃I. This automated system enables the formation of [^{11}C]CH₃I or [^{11}C]CH₃OTf from cyclotron-produced [^{11}C]CO₂ or [^{11}C]CH₄ by a gaseous recirculating process described by Larsen *et al.*¹⁸⁶ and Jewett.¹⁸⁷ The synoptic of the radiosynthesizer is presented below (Figure 70). It includes a [^{11}C]CO₂ trap, a reactor able to be heated up to 200°C, 6 vials for chemicals, an HPLC system equipped with UV and radioactivity detectors as well as a SPE formulation part.

[^{11}C]CO₂ is trapped at room temperature on 4 Å molecular sieves packed with Shimalite nickel previously loaded with hydrogen. Reduction into [^{11}C]CH₄ is carried out at 380 °C for 1 min and the gas is released under hydrogen flow (100 mL/min), passed through sicapent® and ascarite® cartridges and trapped at -75 °C on Carbosphere™ 60 / 80 mesh. Upon heating at 80 °C, [^{11}C]CH₄ is released and converted into [^{11}C]CH₃I by reaction with gaseous iodine at 750 °C for 3 min using a recirculation process. [^{11}C]CH₃I is trapped at room temperature on a Porapak™ phase and released at 190 °C under a flow of helium (30 mL/min). Conversion into [^{11}C]MeOTf is performed according to the method of Jewett.¹⁸⁷ Upon release from Porapak™, [^{11}C]CH₃I is passed through a preheated (200 °C) AgOTf/Carbopack™ 60/80 mesh (1/1 w/w) column, instantaneously affording [^{11}C]CH₃OTf. [^{11}C]CH₃OTf is bubbled in the reaction vial

containing the precursor in the reaction solvent. The reactor is then sealed and heated at the required temperature for 3 to 5 minutes. The crude is diluted with HPLC eluent and purified by semi-preparative HPLC. The product peak is collected in the dilution flask prior to reformulation step on a C-18 Sep-pek cartridge.

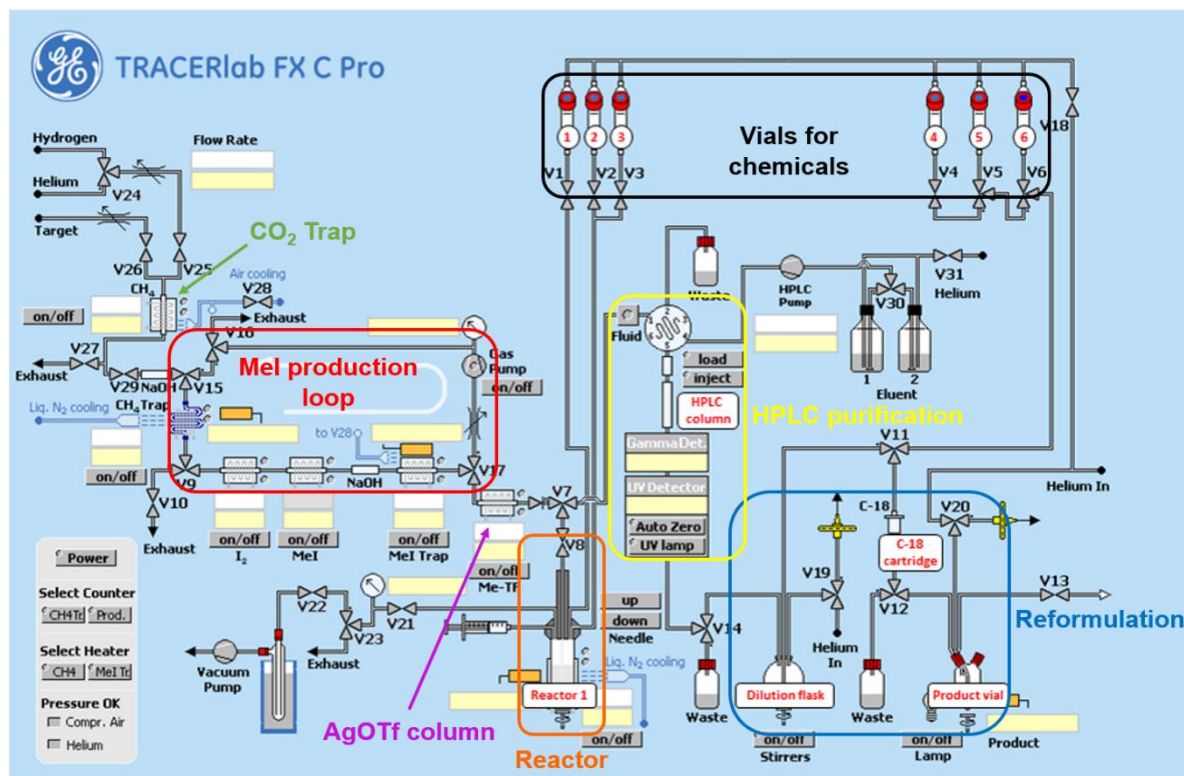


Figure 70. Synoptic of the TRACERLab™ FX C Pro radiosynthesizer.

A one-step radiomethylation requires the preparation of different reservoirs and vessels for the radiolabeling, the purification and the reformulation steps (Table 1).

Table 14. Preparation of the TRACERLab™ FX C Pro synthesizer for one-step radiomethylation.

Vessel	Compound	Quantity
Reactor	Precursor, solvent, (base)	1 mg of precursor
		300 μ L solvent (\geq 1 eq of base)
Reservoir 3	HPLC eluent	0.5 mL
Reservoir 4	Distilled water	10 mL
Reservoir 5	Ethanol	2 mL
Dilution flask	Distilled water	30 L

II.3.2.b. Iphase C-11 Pro²

The iPhase Technologies (Australia) C-11 Pro² radiosynthesizer employs the liquid method to produce [¹¹C]CH₃I and produces carbon-11 radiotracers by the “wet” chemistry method developed by Langström and Lundqvist.¹⁸⁸ The synoptic of the radiosynthesizer is represented below (Figure 71). [¹¹C]CO₂ is trapped at room temperature on 5Å molecular sieves 80/100 mesh, transferred at 200 °C to reactor 1 and reduced to [¹¹C]CH₃OH with LiAlH₄ solution at 85 °C for 3 minutes. A HI solution is added to the reactor 1 enabling conversion of [¹¹C]CH₃OH to [¹¹C]CH₃I by heating at 140 °C during 3 minutes. [¹¹C]CH₃I is then passed through Soda Lime and P₂O₅ cartridges in order to obtain dry [¹¹C]CH₃I in reactor 2, where the precursor is diluted in the reaction solvent. Additionally, [¹¹C]CH₃I can be transformed into [¹¹C]CH₃OTf using an AgOTf/Carbopack™ 60/80 mesh (1/1 w/w) column at 220 °C. After sealing the reactor and labelling for 3-5 minutes at the required temperature, the crude mixture is diluted with HPLC eluant and purification is carried out by semi-preparative HPLC prior to SPE reformulation using a disposable kit.

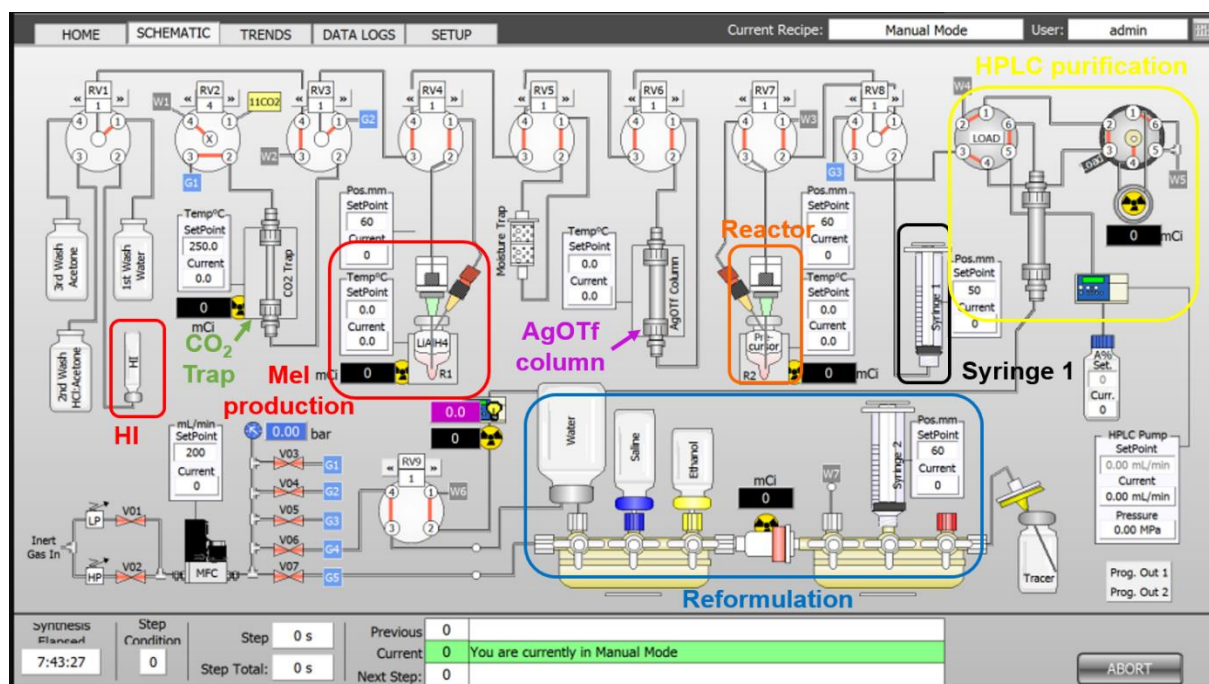
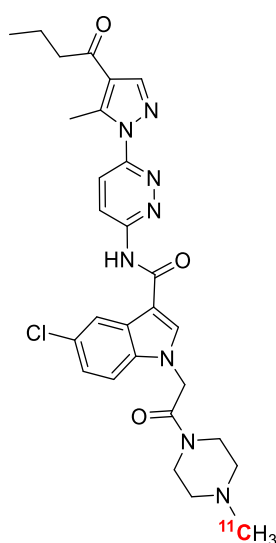


Figure 71. Synoptic of the iPhase C-11 Pro² radiosynthesizer.

For a typical one-step radiomethylation, the reservoirs and vessels of the module are filled with the compounds presented in Table 2 enabling production of [¹¹C]CH₃I, labeling, purification and reformulation step.

Table 15. Preparation of the iPhase C-11 Pro 2 synthesizer for one-step radiomethylation.

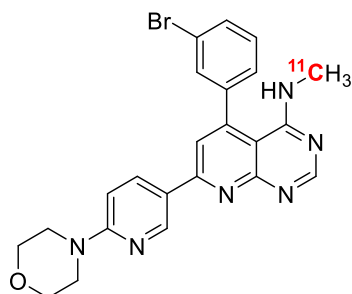
Vessel	Compound(s)	Quantity
Reactor 1	LiAlH ₄ 1M in THF	150 μL
Reactor 2	Precursor, solvent, (base)	1 mg of precursor 300 μL solvent (≥ 1 eq of base)
HI vial	HI _{aq} (53% wt)	300 μL
Syringe 1	HPLC eluent	1 mL

Radiosynthesis of [¹¹C]47 on Iphase C-11 Pro²

[¹¹C]CH₃OTf was prepared as described in procedure II.3.2.b and was added to a solution of precursor **55** (1 mg) and 1M NaOH (5 μL) in acetone (300 μL). The radiomethylation was carried out for 5 minutes at 80 °C. The mixture was diluted in HPLC eluent (1 mL) then purified by reverse phase semi-preparative HPLC (Waters Symmetry® C18 7.8×300mm, 7 μm) using 0.1 M NH₄OAc pH 10/acetonitrile (45/55 v/v, 5 mL/min). UV detection was carried out at 254 nm. The retention time of [¹¹C]47 is around 10.5 min. The purified compound was diluted with water (20 mL) and passed through a Sep-Pak® C18 cartridge (Waters). The cartridge was rinsed with water (10 mL) and [¹¹C]47 was eluted with ethanol (2 mL) and diluted with saline (0.9 % NaCl w/v, 3 mL). The chemical and radiochemical purities were higher than 95 % as attested by analytical HPLC using a mixture of eluent A/eluent B 45/55 and UV detection at 310 nm. Synthesis of [¹¹C]47 was achieved in 45 minutes with a 19.7 ± 3.5 % yield and an average decay corrected molar activity of 40.9 ± 23.3 GBq/μmol (n = 14).

The synthesis of [^{11}C]47 has also been performed on the TRACERLabTM FX C Pro synthesizer using the same conditions. The radioligand [^{11}C]47 was obtained with 17.7 ± 7.7 % yield (n = 3).

Radiosynthesis of [^{11}C]62 on Iphase C-11 Pro²



[^{11}C]CH₃OTf was prepared as described in procedure II.3.2.b and added to the solution of precursor ABT-702 (1 mg) in DMF (300 μL). The radiomethylation was then carried out for 3 minutes at 110 $^{\circ}\text{C}$. The mixture was diluted in HPLC eluent (1 mL) then purified by reverse phase semi-preparative HPLC (Waters Symmetry[®] C18 7.8 \times 300mm, 7 μm) using ammonium formate pH 10/acetonitrile (40/60 v/v, 5 mL/min). UV detection was carried out at 254 nm. The retention time of [^{11}C]62 is around 6 min. The purified compound was diluted with water (20 mL) and passed through a Sep-Pak[®] C18 cartridge (Waters). The cartridge was rinsed with water (10 mL) and [^{11}C]62 was eluted with ethanol (2 mL) and diluted with saline (0.9 % NaCl w/v, 3 mL). The chemical and radiochemical purities were higher than 95 % as attested by analytical HPLC using a mixture of eluent A/eluent B 55/45 and UV detection at 310 nm. Synthesis of [^{11}C]62 was achieved in 45 minutes with a 7.9 ± 5.0 % yield (n = 3) and an average decay corrected molar activity of 9.0 GBq/ μmol (n = 1).

II.4. Fluorine-18 radiochemistry

II.4.1. Fluorine-18 production

No-carrier-added aqueous [^{18}F]fluoride ion was produced *via* the [$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$] nuclear reaction by irradiation of a 2 mL [^{18}O]water target (> 97%-enriched, CortecNet) on a Cyclone-18/9 cyclotron (18 MeV proton beam, IBA) and was transferred to the hot cell. Target hardware: commercial, 2-mL, two-port, stainless steel target holder equipped with a domed-end niobium cylinder insert. Target to hot cell liquid-transfer system: 60 m PTFE line (0.8 mm internal diameter; 1/16 inch external diameter), 2.0 bar helium drive pressure, transfer time 3-6 min. Typical production of [^{18}F]fluoride ion at the end of bombardment for a 25 μA , 30 minutes irradiation: 27-30 GBq.

II.4.2. Trasis AllInOne (AIO)

The Trasis AllInOne (AIO, Belgium) radiosynthesizer is used to perform radiolabeling of compounds with fluorine-18. This radiosynthesis module (Figure 72) presents thirty-six positions equipped with rotation mechanisms enabling **K[¹⁸F]F-K₂₂₂ preparation**, labeling and **reformulation** of the radiotracer, two **heating reactors** and an integrated **HPLC system** equipped with UV and gamma detectors. AIO operates using single use cassettes and reagent sets to prevent cross-contaminations.

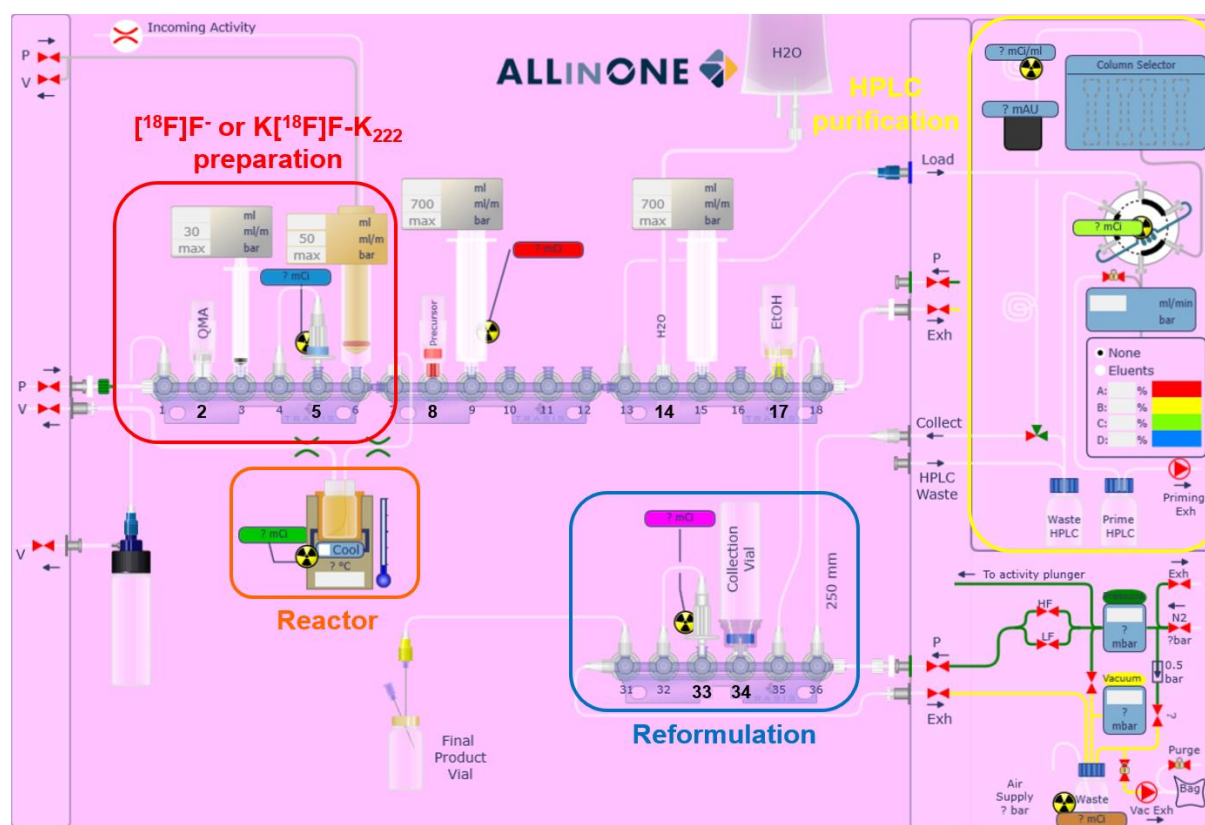


Figure 72. Synoptic of Trasis AllInOne radiotracer for one step radiolabeling.

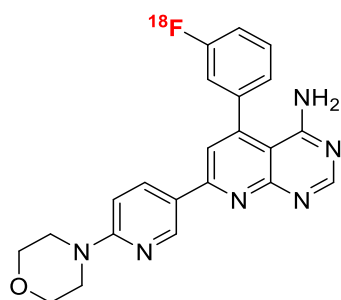
A standard cassette for radiofluorination is made up of four manifolds containing 6 valves each. The reagents required for the radiolabeling are connected to the cassette at different positions of the manifolds (see Table 3).

Table 16. Preparation of the cassette for one-step radiofluorination.

Position	Reagent/component	Quantity
2	organo-aqueous solution, salt, (K ₂₂₂)	300 µL
5	QMA-carbonate cartridge	1
8	Precursor, solvent	2 mg of precursor in 700 µL solvent
14	Distilled water	
17	Ethanol	10 mL
33	C18 cartridge	1
34	Collection vial	1

II.4.3. K^[18F]F·K₂₂₂ preparation

The aqueous solution containing [¹⁸F]fluoride anions was automatically transferred to the Trasis AllInOne automate after the end of irradiation. The irradiated water was then sucked through an anion exchange cartridge (Sep-Pak® Accell Plus QMA Plus Light cartridge, Waters – position 5) to fix [¹⁸F]fluoride anions and remove the enriched water. The [¹⁸F]fluoride anions were eluted from the resin and transferred to the reactor with 300 µL of a solution containing 12 mg of Kryptofix® 222 in 450 µL of acetonitrile and 100 µL of 33.3 mg/mL K₂CO₃ (position 2). The K^[18F]F-K₂₂₂ complex was prepared by evaporation of the solvents under vacuum and under a stream of helium at (i) 80 °C for 15 s, (ii) 115 °C for 115 s, (iii) 125 °C for 180 s, (iv) 110 °C for 80 s and (v) 95 °C for 100 s. The dry [¹⁸F]F-K₂₂₂ complex was then diluted with the appropriate solvent (DMI, DMF, can or DMA) and transferred to a vial for radiolabelling experiments in a lead-shielded glovebox.

Radiosynthesis of [¹⁸F]63 on Trasis AllInOne

The aqueous solution containing [¹⁸F]fluoride anions was automatically transferred to the Trasis AllInOne automate after the end of irradiation. The K[¹⁸F]F-K₂₂₂ complex was prepared as described in procedure II.5.3. After cooling to 40 °C, labeling precursor **94** (2 mg) and Cu(OTf)₂(py)₄ (4 mg) were added to the dry complex in 700 μL DMI (position **8**) and the radiolabeling was carried out at 120 °C for 20 minutes before 2 successive dilutions with water (5 mL and 3.5 mL - position **14**) and semi-preparative HPLC purification. The mixture was purified by reverse phase semi-preparative HPLC (Waters Symmetry® C18 7.8×300mm, 7 μm) using H₂O/MeCN/TFA (80/20/0.1 v/v/v, 5 mL/min). UV detection was carried out at 254 nm. The retention time of [¹⁸F]**63** is around 14 min. The expected product was collected in a vial (position **34**) containing 25 mL water and the final formulation was performed automatically using Sep-Pak C18 cartridge (Waters - position **33**). The purified product was recovered after elution of the cartridge with EtOH (1.5 mL - position **17**) with a 1.5 ± 0.5 % (n = 3) radiochemical yield (d.c.) after an average reaction time of 50 minutes. The chemical and radiochemical purities were higher than 95 % as attested by quality control HPLC using a mixture of eluent A/eluent B 60/40 and UV detection at 310 nm. Synthesis of [¹⁸F]**54** was achieved with an average decay corrected molar activity of 28.8 GBq/μmol (n = 1).

III. Biological assays

III.1. P2Y₁₂ ligands

III.1.1. β -arrestin assay

All the binding assays were carried out on a CHO-K1 β -arrestin cell line stably transfected with P2Y₁₂ human receptor prepared by Haneen Al-Hroub (from Dr Christa Müller lab in Bonn University).

Seeding cells:

When the cells reached a confluence of 90-95 %, 10 mL of PBS was used to wash the flask and discarded. Then, 10 mL of dissociation buffer was added to the flask and the flask was incubated for 10 min at 37 °C and 5 % CO₂. The mix was transferred to a Falcon tube and centrifuged for 5 minutes at 1200 rpm. The supernatant was removed and the cell pellet was dissolved with 10 mL of medium (Optimem®, FCS 2 %, PS 1 %, hygromycin 300 μ g/mL and G418 800 μ g/mL). Concentration of cells was determined with a Neubauer Chamber® and the Nunclondelta® plates were seeded at 30,000 cells/well. The plate was then incubated for 24 hours at 37 °C and 5 % CO₂.

Agonist Assay:

10 μ l of agonist (100 μ M to 0.3 nM) with 90 μ L of buffer (Optimem®, FCS 2 %, PS 1 %, hygromycin 300 μ g/mL and G418 800 μ g/mL) was added to a 96 wells plate containing P2Y₁₂R CHO-K1 cells (30 \times 10³/well). The plate was then incubated for 90 minutes at 37 °C and 5 % CO₂. A detection reagent (4150 μ l of cell assay buffer, 1100 μ l of Emerald II solution and 220 μ l of Galacton Star® substrate) was then prepared and 50 μ l of this reagent solution was added in each well. After 60 minutes incubation at room temperature in the dark, the results were obtained by analysing the intensity of light produced by chemiluminescence on a Berthold Mirthras LB 940®.

Antagonist Assay:

5 μ l of antagonist (10 μ M to 0.3 nM) with 90 μ L of buffer (Optimem®, FCS 2 %, PS 1 %, hygromycin 300 μ g/mL and G418 800 μ g/mL) was added to a 96 wells plate containing P2Y₁₂R CHO-K1 cells (30 \times 10³/well). The plate was then incubated for 90 minutes at 37 °C and 5 % CO₂. Then, 5 μ L of a standard agonist (2-Me-S-ADP – 20 nM) was added and the plate was incubated for another 90 minutes at 37 °C and 5 % CO₂. A detection reagent (4150 μ l of cell assay buffer, 1100 μ l of Emerald II solution and 220 μ l of Galacton Star® substrate) was then prepared and 50 μ l of this reagent solution was added in each well. After 60 minutes incubation

at room temperature in the dark, the results were obtained by analysis the intensity of light produced by chemiluminescent on a Berthold Mirthras LB 940®.

III.1.2. Radioligand binding assay

The experiments were carried out in a 50 mM Tris-HCl buffer at pH 7.4. The assay had a final volume of 500 μ L, which included 5 μ L of the test compound (prepared via serial dilutions), 100 μ L of [3 H]PSB-22219 at a final concentration of 2 nM, and 100 μ L of CHO- β -arrestin-*h*P2Y₁₂ membrane preparation (containing 5 μ g of protein). To assess non specific binding, 1 μ M PSB-0739 was included. Incubation initiated with the addition of the membrane preparation and was conducted for 1 hour at 18 °C under the specified conditions. Bound radioligand was separated from unbound ligand by filtering through GF/B glass fiber filters using a Brandel cell harvester (Model M-48, Brandel, MD, USA). Each sample was washed three times with 3 mL of ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer containing 0.1% Tween 20 at pH 7.4. After washing, the filters were punched out and placed into scintillation vials, where they were incubated with 2.5 mL of scintillation cocktail (ProSafe FC+, Triskem) for 9 hours. The radioactivity of the samples was then measured using a Hidex 600 SL Automatic TDCR Liquid Scintillation Counter, which has a counting efficiency of 53-55%. Each experiment was independently repeated three times, with each trial performed in duplicate. pIC₅₀ and pK_i values were calculated using the one-site homologous or one-site fit K_i models as defined in GraphPad Prism software version 8.4.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

III.1.3. *In vitro* metabolism

Rat liver microsomes (RLM) and pooled human liver microsomes (HLM) that were fully characterized for their protein content, P450s concentration and catalytic activities were obtained from Gibco (Fisher Scientific, France) and stored at -80 °C prior to use. Stock solutions (10 mM) of P2Y₁₂ ligands synthesized in this study (**47-54**) were prepared in DMSO. The incubation mixtures containing 1 mg of microsomal proteins (HLM and MLM), a NADPH-generating system (5 mM G6P, 1 mM NADP⁺, 2 UI/assay G6PDH), the P2Y₁₂ ligand at a final concentration of 100 μ M (**47-54**) and 0.1 M aqueous potassium phosphate buffer, pH 7.4 in a final volume of 1 mL, were pre-incubated for 2 minutes at 37 °C. The reaction was started by the addition of the NADPH-generating system (200 μ L) and was conducted in a 37 °C water bath with gentle shaking for 60 minutes. The reaction was stopped by the addition of an equal volume of acetonitrile (1 mL). The mixtures were centrifuged at 4 °C for 5 minutes at 10000 g. The resulting supernatants were filtered (Vecta Spin Micro 0.2 mm; Whatman), and analyzed by LC/MS. In control assays, the mixtures were incubated without the NADPH-generating system or without microsomes to confirm the stability of the ligand in the experimental conditions. The percentage of each metabolite was determined as a percentage of the total peak area (UV detection). The main oxidative metabolites generated upon P450 oxidation in

microsomal incubates were characterized by LC/MS in the positive mode using an Ion Trap LTQ VelosPro ion mass spectrometer equipped with an electrospray source (Thermo Fisher Scientific, France). The Ultimate 3000 UPLC system interfaced with the LTQ consisted of LC pumps (HPG3400RS series N°8041829), PDA (DAD3000 Series N°8041519) and autosampler (WPS3000TRS Series N°8043592). Pressurized nitrogen was used as sheath gas with a flow rate of 25 units (arbitrary units for sheath gas pressure as defined by the manufacturer). The source voltage for electrospray ionization was 4 kV; source temperature was 250°C; capillary voltage was 40 V and capillary temperature was 350 °C. The parent ligands and their metabolites were separated on a reverse phase UPLC Atlantis C18, 1.8 µm, 2.1x100 mm column (Waters, France). The mobile phase consisted of A: water containing 0.05% formic acid and B: acetonitrile containing 0.05% formic acid. A linear gradient from 20 to 100% of B in 17 minutes was applied to the column at a flow rate of 300 µL/min. The full scan MS acquisition mode was set up to detect ions in the range of m/z 50-700. The MS was set up in the MS/MS mode for acquiring, isolating with a mass width of 1-3 amu (CI) and dissociating the ions m/z of the parent ligands and their main metabolites by Collision Induced Dissociation and in the ion trap using helium as the collision gas with an energy of 35 %. MSⁿ experiments were performed to further characterize the molecular ions corresponding to hydroxylated metabolites. Data acquisition and processing were performed with Xcalibur™ software (version 2.2) with the assistance of Mass Frontier™ software (version 7.0) for proposed fragmentation mechanisms (Thermo Fisher Scientific, France).

III.1.4. Autoradiography

Frozen brain sections (coronal or axial) from AAV-hP2Y₁₂ intrastrially injected rats and from one non-human primate were incubated for 20 minutes with [¹¹C]**47** (85 ± 27 MBq, 29 ± 12 GBq/µmol (EOB); 50-389 nM) or with [¹⁸F]**54** (54 ± 31 MBq, 59 ± 52 GBq/µmol (EOB); 9-16 nM) in Tris Buffer (50 mM TRIZMA preset crystals purchased from Sigma-Aldrich) adjusted to pH 7.4 with 1 M HCl. Specific binding was assessed using an excess (10 µM) of either unlabeled **47** or **54**, respectively. After incubation, slices were rinsed two times for 5 min in ice-cold Tris-HCl buffer, washed in ice-cold distilled water. Sections were then dried using an air stream, placed in direct contact with a Phosphor-Imager screen (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) and exposed for 4 hours. Autoradiograms were analyzed using ImageJ software (<https://imagej.nih.gov>). Mean gray values for each ROI normalised by area were obtained, and expressed as percentage relative to mean tracer binding on brain sections incubated with the respective radioligand only.

III.1.5. *In vivo* imaging

III.1.5.a. Rats

In vivo PET imaging was performed under isoflurane anesthesia (2-2.5% in O₂) in healthy (n = 8) or AAV-CAG-*hP2Y₁₂R* injected rats (n = 7). A catheter was inserted into the caudal tail vein and anesthetized animals were rapidly transferred to the microPET scanner. PET images were acquired on a Siemens Inveon® small animal PET-CT or PET scanner. Both scanners were used in parallel in order to assure a high specific radioactivity at the time of injection. [¹¹C]47 or [¹⁸F]54 were injected intravenously (19.3 ± 6.3 MBq and 31.4 ± 14.3 MBq, respectively) and dynamic PET acquisition (60 min) started with radioligand injection. The efflux substrate behavior of radiolabeled [¹¹C]47 or [¹⁸F]54 was investigated in the presence or absence of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein inhibitor tariquidar (8 mg/kg) administered intravenously 15 min before PET as previously described.¹⁸⁹

III.1.5.b. Cynomolgus monkey

[¹¹C]47 was formulated in 0.9% aqueous saline with 3% ethanol (v/v). The radiochemical purity of [¹¹C]47 was greater than 98% and the molar activity at the time of injection was 61.5 GBq/μmol. PET imaging was performed on a Biograph (Siemens) under standard anesthesia and monitoring procedures.¹⁹⁰ Briefly, the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*, male, 10.4 kg, 7 years) received a mixture of ketamine (10 mg/kg, i.m.) and xylazine (0.5 mg/kg) to induce anesthesia. After intubation in the supine position, venous catheters were inserted for radiotracer injections (saphenous vein) and propofol infusion (saphenous vein). Another catheter was inserted into the femoral artery for arterial blood sampling. The head of the macaque was positioned under the camera before administration of a 2 mL IV bolus of propofol, followed by a 1 mL/kg/h IV infusion under oxygen ventilation. Dynamic PET data acquisition (90 min) started with the IV bolus injection of [¹¹C]47 (223.6 MBq/kg, 1.12 μg/kg). During PET acquisition, a total of 25 blood samples of 0.3 mL were collected: 15 samples during the first 20 minutes, followed by 7 samples every 10 minutes. Larger samples (1–1.5 mL) were collected at 5, 15, 30, 60, and 90 minutes for metabolite analysis.

III.1.6. Biodistribution of radioligands

12 healthy Sprague Dawley male rats (282 ± 17 g) were injected *via* the tail vein with radioligand. The animals, placed under deep gaseous isoflurane/oxygen anesthesia (4%), were sacrificed by decapitation at 5, 15, 30 and 60 minutes after injection (n = 2 per time point). Blood, plasma and organs (brain, cerebellum, heart, liver, spleen, kidney, pancreas, stomach, intestine, lung, bone marrow, bone (femur) and muscle) were collected, weighed and counted for radioactivity using a cross-calibrated gamma counter (Cobra Quantum D5003; Perkin-Elmer, France). All values were corrected for fluorine-18 decay (109.8 minutes) till the

injection time. The concentration of radioactivity per gram of tissue in whole blood, plasma and tissues were normalized by the injected dose and expressed as a percentage of injected dose per gram of tissue \pm standard deviation (%ID/g \pm SD). The tissue concentrations were corrected by plasma concentration at the same time (%ID/g plasma/ %ID/g tissue).

III.1.7. *In vivo* metabolism of [¹⁸F]54

Bood samples were collected with 5 mL hemolysis tubes using an heparinized syringe (at 5, 15, 30 and 60 minutes after injection), and they were immediately centrifuged at 4 °C for 5 min at 3000 g to obtain cell-free plasma. Plasma samples (500 μ L) were deproteinated with 700 μ L of acetonitrile, and centrifuged at 4 °C for 2 min (3000 g). The whole supernatants were analyzed by radio-HPLC following the procedure described below. Simultaneously, the brain was excised and the cerebellum was dissected. Both cerebral hemispheres and the cerebellum were weighted and assessed for radioactivity. One hemisphere was homogenized by sonication in 1 mL of acetonitrile on ice and was centrifuged at 3500 rpm for 5 min. The pellet was re-suspended and further sonicated in 1 mL of acetonitrile. After centrifugation of the second homogenate, both extracts were pooled before analysis by radio-HPLC. The radioactivity in the resulting pellets (plasma and brain) was measured to calculate the recovery of radioactivity in acetonitrile. The whole supernatants (plasma and brain extracts) were diluted in an equal volume of water and the whole samples were injected onto the radio-HPLC system consisted of a quaternary gradient pump, an ASI100T autosampler and a UVD170U UV-Vis detector (Dionex S.A., France) online with a LB-509 radioisotope detector (MX Z500 cell; Berthold, France). [¹⁸F]54 and its radiometabolites were separated using a 5 μ m, 10x250 mm, C18 Atlantis T3 preparative column (Waters, France). The mobile phases consisted of 0.1% v/v trifluoroacetic acid in water (A) and 0.1% v/v trifluoroacetic acid in acetonitrile (B). A linear gradient from 10% to 100% of B in 12 minutes was applied to the column at a flow rate of 5 mL/min. The thermostatic column oven was set at 25°C. Data acquisition and processing were performed with Chromeleon software (version 1.0; Dionex). The radioactivity due to non-metabolized [¹⁸F]54 in plasma or in brain was expressed as a fraction of the total radiolabeled peak areas. The percentages of non-metabolized [¹⁸F]54 in plasma or in the brain as a function of time were fitted by a nonlinear regression analysis (OriginPro software version 8.5; OriginLab, Northampton, MA) using a standard following biexponential decay equation.

III.2. ABT-702 ligands

III.2.1. Affinity test

The affinity of the compounds was determined through their ability to inhibit the adenosine kinase enzyme. Inhibition of ADK activity in intact cells was investigated in 1321N1 astrocytoma cells. Cultured human 1321N1 astrocytoma cells were grown to confluency in 96-well plates. After washing with PBS buffer, ABT-702 ligands dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) were added to the wells to a final concentration of 10 μM (1 % final concentration of DMSO in all wells). 1 μM [^3H]adenosine (specific activity = 230 mCi/mmol) was added to the wells and the reaction mixture was incubated for 30 min at room temperature. The supernatant was quickly removed using a Brandel 96-channel cell harvester (Brandel, Gaithersburg, MD, USA) and cells were then lysed with 20 % NaCl solution. 0.1 mL of cold 0.1 M aq LaCl_3 solution was then added and the reaction mixture was kept on ice for at least 3 h. The precipitate containing [^3H]adenosine monophosphate was collected by filtration (GF/B-glass fiber filter) using a Brandel 96-channel cell harvester (Brandel, Gaithersburg, MD, USA) through Packard 96-well GF/B glass fiber filter plates. Filters were rinsed ten times with 0.2 mL of ice-cold distilled water, each. The entire filtration procedure did not exceed 30 s per plate. Radioactivity of the wet 96-well filter plates was counted after 6 h of preincubation with 50 μL of Microscint-20 scintillation cocktail (Packard Bioscience) by liquid scintillation counting. At least three separate experiments were conducted for each compound.

III.2.2. *In vivo* imaging of [^{18}F]63

In vivo PET imaging was performed under isoflurane anesthesia (2-2.5% in O_2) in LPS injected rats ($n = 2$). A catheter was inserted into the caudal tail vein and anesthetized animals were rapidly transferred to the microPET scanner. PET images were acquired on a Siemens Inveon® small animal PET-CT or PET scanner. Both scanners were used in parallel in order to assure a high specific radioactivity at the time of injection. [^{18}F]63 was injected intravenously (12.6 ± 3.6 MBq) and dynamic PET acquisition (60 min) started with radioligand injection.

Bibliographie

- (1) *La tomographie par émission de positons – tomodensitométrie (TEP-TDM) - Examens.* <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Se-faire-soigner/Traitements/Examens/TEP-TDM-et-cancer> (accessed 2024-07-30).
- (2) de Dreuille, O.; Maszelin, P.; Foehrenbach, H.; Bonardel, G.; Gaillard, J.-F. Principe et Technique de La Tomographie Par Émission de Positons (TEP). *EMC - Radiologie* **2004**, *1* (1), 2–35.
- (3) Richardson, P. Applications of Fluorine to the Construction of Bioisosteric Elements for the Purposes of Novel Drug Discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2021**, *16* (11), 1261–1286.
- (4) Li, Z.; Conti, P. S. Radiopharmaceutical Chemistry for Positron Emission Tomography. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, *62* (11), 1031–1051.
- (5) Pees, A.; Chassé, M.; Lindberg, A.; Vasdev, N. Recent Developments in Carbon-11 Chemistry and Applications for First-In-Human PET Studies. *Molecules* **2023**, *28* (3), 931.
- (6) Någren, K.; Halldin, C. Methylation of Amide and Thiol Functions with [11C]Methyl Triflate, as Exemplified by [11C]NMSP[11C]Flumazenil and [11C]Methionine. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **1998**, *41* (9), 831–841.
- (7) Långström, B.; Lundqvist, H. The Preparation of 11C-Methyl Iodide and Its Use in the Synthesis of 11C-Methyl-L-Methionine. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes* **1976**, *27* (7), 357–363.
- (8) Link, J. M.; Krohn, K. A.; Clark, J. C. Production of [11C]CH₃I by Single Pass Reaction of [11C]CH₄ with I₂. *Nucl Med Biol* **1997**, *24* (1), 93–97.
- (9) Larsen, P.; Ulin, J.; Dahlstrøm, K.; Jensen, M. Synthesis of [11C]Iodomethane by Iodination of [11C]Methane. *Applied Radiation and Isotopes* **1997**, *48* (2), 153–157.
- (10) Jewett, D. M. A Simple Synthesis of [11C]Methyl Triflate. *Int J Rad Appl Instrum A* **1992**, *43* (11), 1383–1385.
- (11) Mock, B. H.; Mulholland, G. K.; Vavrek, M. T. Convenient Gas Phase Bromination of [11C]Methane and Production of [11C]Methyl Triflate. *Nucl Med Biol* **1999**, *26* (4), 467–471.
- (12) Rong, J.; Haider, A.; Jeppesen, T. E.; Josephson, L.; Liang, S. H. Radiochemistry for Positron Emission Tomography. *Nat Commun* **2023**, *14* (1), 3257.
- (13) Calvori, C.; Frontali, L.; Leoni, L.; Tecce, G. Effect of Rifamycin on Protein Synthesis. *Nature* **1965**, *207* (4995), 417–418.
- (14) Tucker, E. W.; Guglieri-Lopez, B.; Ordonez, A. A.; Ritchie, B.; Klunk, M. H.; Sharma, R.; Chang, Y. S.; Sanchez-Bautista, J.; Frey, S.; Lodge, M. A.; Rowe, S. P.; Holt, D. P.; Gobburu, J. V. S.; Peloquin, C. A.; Mathews, W. B.; Dannals, R. F.; Pardo, C. A.; Kannan, S.; Ivaturi, V. D.; Jain, S. K. Noninvasive 11C-Rifampin Positron Emission Tomography Reveals Drug Biodistribution in Tuberculous Meningitis. *Science Translational Medicine* **2018**, *10* (470), eaau0965.
- (15) Liu, L.; Xu, Y.; Shea, C.; Fowler, J. S.; Hooker, J. M.; Tonge, P. J. Radiosynthesis and Bioimaging of the Tuberculosis Chemotherapeutics Isoniazid, Rifampicin and Pyrazinamide in Baboons. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (7), 2882–2891.
- (16) Gribble, F. M.; Reimann, F. Sulphonylurea Action Revisited: The Post-Cloning Era. *Diabetologia* **2003**, *46* (7), 875–891.
- (17) Satoh, H.; Yamashita, F.; Tsujimoto, M.; Murakami, H.; Koyabu, N.; Ohtani, H.; Sawada, Y. Citrus Juices Inhibit the Function of Human Organic Anion-Transporting Polypeptide Oatp-B. *Drug Metab Dispos* **2005**, *33* (4), 518–523.
- (18) Gedeon, C.; Behravan, J.; Koren, G.; Piquette-Miller, M. Transport of Glyburide by Placental ABC Transporters: Implications in Fetal Drug Exposure. *Placenta* **2006**, *27* (11), 1096–1102.

- (19) Caillé, F.; Gervais, P.; Auvity, S.; Coulon, C.; Marie, S.; Tournier, N.; Kuhnast, B. Automated Two-Step Manufacturing of [¹¹C]Glyburide Radiopharmaceutical for PET Imaging in Humans. *Nuclear Medicine and Biology* **2020**, *84–85*, 20–27.
- (20) Glaudemans, A. W. J. M.; Enting, R. H.; Heesters, M. A. A. M.; Dierckx, R. A. J. O.; van Rheeën, R. W. J.; Walenkamp, A. M. E.; Slart, R. H. J. A. Value of ¹¹C-Methionine PET in Imaging Brain Tumours and Metastases. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2013**, *40* (4), 615–635.
- (21) Nabulsi, N. B.; Mercier, J.; Holden, D.; Carré, S.; Najafzadeh, S.; Vandergeten, M.-C.; Lin, S.; Deo, A.; Price, N.; Wood, M.; Lara-Jaime, T.; Montel, F.; Laruelle, M.; Carson, R. E.; Hannestad, J.; Huang, Y. Synthesis and Preclinical Evaluation of ¹¹C-UCB-J as a PET Tracer for Imaging the Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A in the Brain. *Journal of Nuclear Medicine* **2016**, *57* (5), 777–784.
- (22) Xiong, M.; Roshanbin, S.; Rokka, J.; Schlein, E.; Ingelsson, M.; Sehlin, D.; Eriksson, J.; Syvänen, S. *In Vivo* Imaging of Synaptic Density with [¹¹C]UCB-J PET in Two Mouse Models of Neurodegenerative Disease. *NeuroImage* **2021**, *239*, 118302.
- (23) Dahl, K.; Halldin, C.; Schou, M. New Methodologies for the Preparation of Carbon-11 Labeled Radiopharmaceuticals. *Clin Transl Imaging* **2017**, *5* (3), 275–289.
- (24) Hooker, J. M.; Reibel, A. T.; Hill, S. M.; Schueller, M. J.; Fowler, J. S. One-Pot, Direct Incorporation of [¹¹C]CO₂ into Carbamates. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48* (19), 3482–3485.
- (25) Wilson, A. A.; Garcia, A.; Houle, S.; Sadovski, O.; Vasdev, N. Synthesis and Application of Isocyanates Radiolabeled with Carbon-11. *Chemistry – A European Journal* **2011**, *17* (1), 259–264.
- (26) Hicks, J. W.; Parkes, J.; Sadovski, O.; Tong, J.; Houle, S.; Vasdev, N.; Wilson, A. A. Synthesis and Preclinical Evaluation of [¹¹C-Carbonyl]PF-04457845 for Neuroimaging of Fatty Acid Amide Hydrolase. *Nuclear Medicine and Biology* **2013**, *40* (6), 740–746.
- (27) Åberg, O.; Lindhe, Ö.; Hall, H.; Hellman, P.; Kihlberg, T.; Långström, B. Synthesis and Biological Evaluation of [Carboxyl-¹¹C]Eprosartan. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **2009**, *52* (8), 295–303.
- (28) Lee, H. G.; Milner, P. J.; Placzek, M. S.; Buchwald, S. L.; Hooker, J. M. Virtually Instantaneous, Room-Temperature [¹¹C]-Cyanation Using Biaryl Phosphine Pd(0) Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (2), 648–651.
- (29) Meanwell, N. A. Fluorine and Fluorinated Motifs in the Design and Application of Bioisosteres for Drug Design. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (14), 5822–5880.
- (30) Jacobson, O.; Kiesewetter, D. O.; Chen, X. Fluorine-18 Radiochemistry, Labeling Strategies and Synthetic Routes. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26* (1), 1–18.
- (31) Ido, T.; Wan, C.-N.; Casella, V.; Fowler, J. S.; Wolf, A. P.; Reivich, M.; Kuhl, D. E. Labeled 2-Deoxy-D-Glucose Analogs. ¹⁸F-Labeled 2-Deoxy-2-Fluoro-D-Glucose, 2-Deoxy-2-Fluoro-D-Mannose and ¹⁴C-2-Deoxy-2-Fluoro-D-Glucose. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **1978**, *14* (2), 175–183.
- (32) Calderoni, L.; Giovanella, L.; Fanti, S. Endocrinology Application of Molecular Imaging: Current Role of PET/CT. *J Endocrinol Invest* **2024**, *47* (10), 2383–2396.
- (33) Cole, E. L.; Stewart, M. N.; Littich, R.; Hoareau, R.; Scott, P. J. H. Radiosyntheses Using Fluorine-18: The Art and Science of Late Stage Fluorination. *Current Topics in Medicinal Chemistry* *14* (7), 875–900.
- (34) Labroo, V. M.; Hebel, D.; Kirk, K. L.; Cohen, L. A.; Lemieux, C.; Schiller, P. W. Direct Electrophilic Fluorination of Tyrosine in Dermorphin Analogues and Its Effect on Biological Activity, Receptor Affinity and Selectivity. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1991**, *37* (5), 430–439.

- (35) Golan, H.; Volkov, O.; Shalom, E. Nuclear Imaging in Parkinson's Disease: The Past, the Present, and the Future. *Journal of the Neurological Sciences* **2022**, *436*, 120220.
- (36) Teare, H.; Robins, E. G.; Kirjavainen, A.; Forsback, S.; Sandford, G.; Solin, O.; Luthra, S. K.; Gouverneur, V. Radiosynthesis and Evaluation of [18F]Selectfluor Bis(Triflate). *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49* (38), 6821–6824.
- (37) Stenhagen, I. S. R.; Kirjavainen, A. K.; Forsback, S. J.; Jørgensen, C. G.; Robins, E. G.; Luthra, S. K.; Solin, O.; Gouverneur, V. [18F]Fluorination of an Arylboronic Ester Using [18F]Selectfluor Bis(Triflate): Application to 6-[18F]Fluoro-L-DOPA. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (14), 1386–1388.
- (38) Haveman, L. Y. F.; Vugts, D. J.; Windhorst, A. D. State of the Art Procedures towards Reactive [18F]Fluoride in PET Tracer Synthesis. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry* **2023**, *8* (1), 28.
- (39) Halder, R.; Ritter, T. 18F-Fluorination: Challenge and Opportunity for Organic Chemists. *J. Org. Chem.* **2021**, *86* (20), 13873–13884.
- (40) James, M. L.; Fulton, R. R.; Vercoullie, J.; Henderson, D. J.; Garreau, L.; Chalon, S.; Dolle, F.; Selleri, S.; Guilloteau, D.; Kassiou, M. DPA-714, a New Translocator Protein-Specific Ligand: Synthesis, Radiofluorination, and Pharmacologic Characterization. *Journal of Nuclear Medicine* **2008**, *49* (5), 814–822.
- (41) Damont, A.; Hinnen, F.; Kuhnast, B.; Schöllhorn-Peyronneau, M.-A.; James, M.; Luus, C.; Tavitian, B.; Kassiou, M.; Dollé, F. Radiosynthesis of [18F]DPA-714, a Selective Radioligand for Imaging the Translocator Protein (18 kDa) with PET. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **2008**, *51* (7), 286–292.
- (42) Harhausen, D.; Sudmann, V.; Khojasteh, U.; Müller, J.; Zille, M.; Graham, K.; Thiele, A.; Dyrks, T.; Dirnagl, U.; Wunder, A. Specific Imaging of Inflammation with the 18kDa Translocator Protein Ligand DPA-714 in Animal Models of Epilepsy and Stroke. *PLOS ONE* **2013**, *8* (8), e69529.
- (43) Cheval, M.; Rodrigo, S.; Taussig, D.; Caillé, F.; Petrescu, A. M.; Bottlaender, M.; Tournier, N.; Besson, F. L.; Leroy, C.; Boullieret, V. [18F]DPA-714 PET Imaging in the Presurgical Evaluation of Patients With Drug-Resistant Focal Epilepsy. *Neurology* **2023**, *101* (19), e1893–e1904.
- (44) Shiue, C.-Y.; Shiue, G. G.; Mozley, P. D.; Kung, M.-P.; Zhuang, Z.-P.; Kim, H.-J.; Kung, H. F. P-[18F]-MPPF: A Potential Radioligand for PET Studies of 5-HT1A Receptors in Humans. *Synapse* **1997**, *25* (2), 147–154.
- (45) Plenevaux, A.; Lemaire, C.; Aerts, J.; Lacan, G.; Rubins, D.; Melega, W. P.; Brihaye, C.; Degueldre, C.; Fuchs, S.; Salmon, E.; Maquet, P.; Laureys, S.; Damhaut, P.; Weissmann, D.; Le Bars, D.; Pujol, J.-F.; Luxen, A. [18F]*p*-MPPF: A Radiolabeled Antagonist for the Study of 5-HT1A Receptors with PET. *Nuclear Medicine and Biology* **2000**, *27* (5), 467–471.
- (46) Passchier, J.; Waarde, A. van; Vaalburg, W.; Willemsen, A. T. M. On the Quantification of [18F]MPPF Binding to 5-HT1A Receptors in the Human Brain. *Journal of Nuclear Medicine* **2001**, *42* (7), 1025–1031.
- (47) Preshlock, S.; Tredwell, M.; Gouverneur, V. 18F-Labeling of Arenes and Heteroarenes for Applications in Positron Emission Tomography. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (2), 719–766.
- (48) Horti, A.; Ravert, H. T.; London, E. D.; Dannals, R. F. Synthesis of a Radiotracer for Studying Nicotinic Acetylcholine Receptors: (+/−)-Exo-2-(2-[18F]Fluoro-5-Pyridyl)-7-Azabicyclo[2.2.1]Heptane. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **1996**, *38* (4), 355–365.
- (49) Dolci, L.; Dolle, F.; Valette, H.; Vaufrey, F.; Fuseau, C.; Bottlaender, M.; Crouzel, C. Synthesis of a Fluorine-18 Labeled Derivative of Epibatidine for in Vivo Nicotinic

- Acetylcholine Receptor PET Imaging. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1999**, 7 (3), 467–479.
- (50) Neumann, C. N.; Hooker, J. M.; Ritter, T. Concerted Nucleophilic Aromatic Substitution with $^{19}\text{F}^-$ and $^{18}\text{F}^-$. *Nature* **2016**, 534 (7607), 369–373.
- (51) Beyzavi, H.; Mandal, D.; Strelb, M. G.; Neumann, C. N.; D'Amato, E. M.; Chen, J.; Hooker, J. M.; Ritter, T. ^{18}F -Deoxyfluorination of Phenols via Ru π -Complexes. *ACS Cent. Sci.* **2017**, 3 (9), 944–948.
- (52) Carroll, M. A.; Martín-Santamaría, S.; Pike, V. W.; Rzepa, H. S.; Widdowson, D. A. An Ab Initio and MNDO-d SCF-MO Computational Study of Stereoelectronic Control in Extrusion Reactions of R₂I–F Iodine(III) Intermediates†. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, No. 12, 2707–2714.
- (53) 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.
- (54) 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**, No. 21, 2215–2216.
- (55) Pagano, G.; Niccolini, F.; Politis, M. Current Status of PET Imaging in Huntington's Disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2016**, 43 (6), 1171–1182.
- (56) Mandap, K. S.; Ido, T.; Kiyono, Y.; Kobayashi, M.; Lohith, T. G.; Mori, T.; Kasamatsu, S.; Kudo, T.; Okazawa, H.; Fujibayashi, Y. Development of Microwave-Based Automated Nucleophilic [^{18}F]Fluorination System and Its Application to the Production of [^{18}F]Flumazenil. *Nuclear Medicine and Biology* **2009**, 36 (4), 403–409.
- (57) Moon, B. S.; Kil, H. S.; Park, J. H.; Kim, J. S.; Park, J.; Chi, D. Y.; Lee, B. C.; Kim, S. E. Facile Aromatic Radiofluorination of [^{18}F]Flumazenil from Diaryliodonium Salts with Evaluation of Their Stability and Selectivity. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9 (24), 8346.
- (58) Cardinale, J.; Ermert, J.; Humpert, S.; Coenen, H. H. Iodonium Ylides for One-Step, No-Carrier-Added Radiofluorination of Electron Rich Arenes, Exemplified with 4-((^{18}F)Fluorophenoxy)-Phenylmethyl)Piperidine NET and SERT Ligands. *RSC Adv.* **2014**, 4 (33), 17293–17299.
- (59) Rotstein, B. H.; Stephenson, N. A.; Vasdev, N.; Liang, S. H. Spirocyclic Hypervalent Iodine(III)-Mediated Radiofluorination of Non-Activated and Hindered Aromatics. *Nat Commun* **2014**, 5 (1), 4365.
- (60) Hill, D. E.; Holland, J. P. Computational Studies on Hypervalent Iodonium(III) Compounds as Activated Precursors for ^{18}F Radiofluorination of Electron-Rich Arenes. *Computational and Theoretical Chemistry* **2015**, 1066, 34–46.
- (61) Stephenson, N. A.; Holland, J. P.; Kassenbrock, A.; Yokell, D. L.; Livni, E.; Liang, S. H.; Vasdev, N. Iodonium Ylide-Mediated Radiofluorination of ^{18}F -FPEB and Validation for Human Use. *Journal of Nuclear Medicine* **2015**, 56 (3), 489–492.
- (62) Qiao, J. X.; Lam, P. Y. S. Copper-Promoted Carbon-Heteroatom Bond Cross-Coupling with Boronic Acids and Derivatives. *Synthesis* **2010**, 2011, 829–856.
- (63) Tredwell, M.; Preshlock, S. M.; Taylor, N. J.; Gruber, S.; Huiban, M.; Passchier, J.; Mercier, J.; Génicot, C.; Gouverneur, V. A General Copper-Mediated Nucleophilic ^{18}F Fluorination of Arenes. *Angew Chem Int Ed* **2014**, 53 (30), 7751–7755.
- (64) Taylor, N. J.; Emer, E.; Preshlock, S.; Schedler, M.; Tredwell, M.; Verhoog, S.; Mercier, J.; Génicot, C.; Gouverneur, V. Derisking the Cu-Mediated ^{18}F -Fluorination of Heterocyclic Positron Emission Tomography Radioligands. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139 (24), 8267–8276.

- (65) Makaravage, K. J.; Brooks, A. F.; Mossine, A. V.; Sanford, M. S.; Scott, P. J. H. Copper-Mediated Radiofluorination of Arylstannanes with [18F]KF. *Org. Lett.* **2016**, *18* (20), 5440–5443.
- (66) Höhne, A.; Yu, L.; Mu, L.; Reiher, M.; Voigtmann, U.; Klar, U.; Graham, K.; Schubiger, P. A.; Ametamey, S. M. Organofluorosilanes as Model Compounds for 18F-Labeled Silicon-Based PET Tracers and Their Hydrolytic Stability: Experimental Data and Theoretical Calculations (PET=Positron Emission Tomography). *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15* (15), 3736–3743.
- (67) Niedermoser, S.; Chin, J.; Wängler, C.; Kostikov, A.; Bernard-Gauthier, V.; Vogler, N.; Soucy, J.-P.; McEwan, A. J.; Schirmacher, R.; Wängler, B. In Vivo Evaluation of ¹⁸F-SiFA Lin –Modified TATE: A Potential Challenge for ⁶⁸Ga-DOTATATE, the Clinical Gold Standard for Somatostatin Receptor Imaging with PET. *J Nucl Med* **2015**, *56* (7), 1100–1105.
- (68) Ting, R.; Adam, M. J.; Ruth, T. J.; Perrin, D. M. Arylfluoroborates and Alkylfluorosilicates as Potential PET Imaging Agents: High-Yielding Aqueous Biomolecular 18F-Labeling. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (38), 13094–13095.
- (69) Ting, R.; Harwig, C.; auf dem Keller, U.; McCormick, S.; Austin, P.; Overall, C. M.; Adam, M. J.; Ruth, T. J.; Perrin, D. M. Toward [18F]-Labeled Aryltrifluoroborate Radiotracers: In Vivo Positron Emission Tomography Imaging of Stable Aryltrifluoroborate Clearance in Mice. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (36), 12045–12055.
- (70) Ting, R.; Harwig, C. W.; Lo, J.; Li, Y.; Adam, M. J.; Ruth, T. J.; Perrin, D. M. Substituent Effects on Aryltrifluoroborate Solvolysis in Water: Implications for Suzuki–Miyaura Coupling and the Design of Stable 18F-Labeled Aryltrifluoroborates for Use in PET Imaging. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (12), 4662–4670.
- (71) 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 18F-Labeling. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53* (44), 11876–11880.
- (72) Kuo, H.-T.; Lepage, M. L.; Lin, K.-S.; Pan, J.; Zhang, Z.; Liu, Z.; Pryyma, A.; Zhang, C.; Merkens, H.; Roxin, A.; Perrin, D. M.; Bénard, F. One-Step 18F-Labeling and Preclinical Evaluation of Prostate-Specific Membrane Antigen Trifluoroborate Probes for Cancer Imaging. *Journal of Nuclear Medicine* **2019**, *60* (8), 1160–1166.
- (73) Schmitt, S.; Moreau, E. Radiochemistry with {Al18F}2+: Current Status and Optimization Perspectives for Efficient Radiofluorination by Complexation. *Coordination Chemistry Reviews* **2023**, *480*, 215028.
- (74) Pearson, R. G. Hard and Soft Acids and Bases. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (22), 3533–3539.
- (75) Bruce Martin, R. Ternary Complexes of Al3+ and F– with a Third Ligand. *Coordination Chemistry Reviews* **1996**, *149*, 23–32.
- (76) 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 18F Radiolabeling for PET. *Journal of Nuclear Medicine* **2009**, *50* (6), 991–998.
- (77) Fersing, C.; Bouhlel, A.; Cantelli, C.; Garrigue, P.; Lisowski, V.; Guillet, B. A Comprehensive Review of Non-Covalent Radiofluorination Approaches Using Aluminum [18F]Fluoride: Will [18F]AlF Replace ⁶⁸Ga for Metal Chelate Labeling? *Molecules* **2019**, *24* (16), 2866.
- (78) Cleeren, F.; Lecina, J.; Bridoux, J.; Devoogdt, N.; Tshibangu, T.; Xavier, C.; Bormans, G. Direct Fluorine-18 Labeling of Heat-Sensitive Biomolecules for Positron Emission Tomography Imaging Using the Al18F-RESCA Method. *Nat Protoc* **2018**, *13* (10), 2330–2347.

- (79) Laverman, P.; McBride, W. J.; Sharkey, R. M.; Eek, A.; Joosten, L.; Oyen, W. J. G.; Goldenberg, D. M.; Boerman, O. C. A Novel Facile Method of Labeling Octreotide with ¹⁸F-Fluorine. *Journal of Nuclear Medicine* **2010**, *51* (3), 454–461.
- (80) Long, T.; Yang, N.; Zhou, M.; Chen, D.; Li, Y.; Li, J.; Tang, Y.; Liu, Z.; Li, Z.; Hu, S. Clinical Application of ¹⁸F-AIF-NOTA-Octreotide PET/CT in Combination With ¹⁸F-FDG PET/CT for Imaging Neuroendocrine Neoplasms. *Clin Nucl Med* **2019**, *44* (6), 452–458.
- (81) *Maladies neurodégénératives*. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-neurodegeneratives> (accessed 2024-06-10).
- (82) Takata, F.; Nakagawa, S.; Matsumoto, J.; Dohgu, S. Blood-Brain Barrier Dysfunction Amplifies the Development of Neuroinflammation: Understanding of Cellular Events in Brain Microvascular Endothelial Cells for Prevention and Treatment of BBB Dysfunction. *Front. Cell. Neurosci.* **2021**, *15*.
- (83) Gosselet, F.; Candela, P.; Cecchelli, R.; Fenart, L. La barrière hémato-encéphalique - Une nouvelle cible thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer ? *Med Sci (Paris)* **2011**, *27* (11), 987–992.
- (84) Adamu, A.; Li, S.; Gao, F.; Xue, G. The Role of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases: Current Understanding and Future Therapeutic Targets. *Front. Aging Neurosci.* **2024**, *16*.
- (85) Galic, M. A.; Riazi, K.; Pittman, Q. J. Cytokines and Brain Excitability. *Frontiers in Neuroendocrinology* **2012**, *33* (1), 116–125.
- (86) Boyd, R. J.; Avramopoulos, D.; Jantzie, L. L.; McCallion, A. S. Neuroinflammation Represents a Common Theme amongst Genetic and Environmental Risk Factors for Alzheimer and Parkinson Diseases. *J Neuroinflammation* **2022**, *19* (1), 223.
- (87) Renaud, J.; Thérien, H.-M.; Plouffe, M.; Martinoli, M.-G. La neuro-inflammation: Dr Jekyll ou Mr Hyde ? *Med Sci (Paris)* **2015**, *31* (11), 979–988.
- (88) Pulli, B.; Chen, J. W. Imaging Neuroinflammation – from Bench to Bedside. *J Clin Cell Immunol* **2014**, *5*, 226.
- (89) Pike, V. W. PET Radiotracers: Crossing the Blood–Brain Barrier and Surviving Metabolism. *Trends in Pharmacological Sciences* **2009**, *30* (8), 431–440.
- (90) Jain, P.; Chaney, A. M.; Carlson, M. L.; Jackson, I. M.; Rao, A.; James, M. L. Neuroinflammation PET Imaging: Current Opinion and Future Directions. *Journal of Nuclear Medicine* **2020**, *61* (8), 1107–1112.
- (91) Jaremko, Ł.; Jaremko, M.; Giller, K.; Becker, S.; Zweckstetter, M. Structure of the Mitochondrial Translocator Protein in Complex with a Diagnostic Ligand. *Science* **2014**, *343* (6177), 1363–1366.
- (92) Camsonne, R.; Crouzel, C.; Comar, D.; Mazière, M.; Prenant, C.; Sastre, J.; Moulin, M.; Syrota, A. Synthesis of N-(¹¹C) Methyl, N-(Methyl-1 Propyl), (Chloro-2 Phenyl)-1 Isoquinoline Carboxamide-3 (PK 11195): A New Ligand for Peripheral Benzodiazepine Receptors. *Labelled Comp Radiopharmac* **1984**, *21* (10), 985–991.
- (93) Chauveau, F.; Becker, G.; Boutin, H. Have (R)-[¹¹C]PK11195 Challengers Fulfilled the Promise? A Scoping Review of Clinical TSPO PET Studies. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2021**, *49* (1), 201–220.
- (94) Costa, B.; Da Pozzo, E.; Giacomelli, C.; Barresi, E.; Taliani, S.; Da Settimo, F.; Martini, C. TSPO Ligand Residence Time: A New Parameter to Predict Compound Neurosteroidogenic Efficacy. *Sci Rep* **2016**, *6* (1), 18164.
- (95) Selleri, S.; Bruni, F.; Costagli, C.; Costanzo, A.; Guerrini, G.; Ciciani, G.; Costa, B.; Martini, C. 2-Arylpyrazolo[1,5-*a*]Pyrimidin-3-Yl Acetamides. New Potent and Selective Peripheral Benzodiazepine Receptor Ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2001**, *9* (10), 2661–2671.

- (96) James, M. L.; Fulton, R. R.; Henderson, D. J.; Eberl, S.; Meikle, S. R.; Thomson, S.; Allan, R. D.; Dolle, F.; Fulham, M. J.; Kassiou, M. Synthesis and in Vivo Evaluation of a Novel Peripheral Benzodiazepine Receptor PET Radioligand. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13* (22), 6188–6194.
- (97) Chauveau, F.; Camp, N. V.; Dollé, F.; Kuhnast, B.; Hinnen, F.; Damont, A.; Boutin, H.; James, M.; Kassiou, M.; Tavitian, B. Comparative Evaluation of the Translocator Protein Radioligands 11C-DPA-713, 18F-DPA-714, and 11C-PK11195 in a Rat Model of Acute Neuroinflammation. *Journal of Nuclear Medicine* **2009**, *50* (3), 468–476.
- (98) Zanolli-Fregonara, P.; Zhang, Y.; Jenko, K. J.; Gladding, R. L.; Zoghbi, S. S.; Fujita, M.; Sbardella, G.; Castellano, S.; Taliani, S.; Martini, C.; Innis, R. B.; Da Settimo, F.; Pike, V. W. Synthesis and Evaluation of Translocator 18 kDa Protein (TSPO) Positron Emission Tomography (PET) Radioligands with Low Binding Sensitivity to Human Single Nucleotide Polymorphism Rs6971. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5* (10), 963–971.
- (99) Fujita, M.; Kobayashi, M.; Ikawa, M.; Gunn, R. N.; Rabiner, E. A.; Owen, D. R.; Zoghbi, S. S.; Haskali, M. B.; Telu, S.; Pike, V. W.; Innis, R. B. Comparison of Four 11C-Labeled PET Ligands to Quantify Translocator Protein 18 kDa (TSPO) in Human Brain: (R)-PK11195, PBR28, DPA-713, and ER176—Based on Recent Publications That Measured Specific-to-Non-Displaceable Ratios. *EJNMMI Research* **2017**, *7* (1), 84.
- (100) Chauveau, F.; Winkeler, A.; Chalon, S.; Boutin, H.; Becker, G. PET Imaging of Neuroinflammation: Any Credible Alternatives to TSPO Yet? *Mol Psychiatry* **2024**, 1–16.
- (101) Tewari, M.; Seth, P. Emerging Role of P2X7 Receptors in CNS Health and Disease. *Ageing Research Reviews* **2015**, *24*, 328–342.
- (102) Bhattacharya, A.; Biber, K. The Microglial ATP-gated Ion Channel P2X7 as a CNS Drug Target. *Glia* **2016**, *64* (10), 1772–1787.
- (103) Monif, M.; Burnstock, G.; Williams, D. A. Microglia: Proliferation and Activation Driven by the P2X7 Receptor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2010**, *42* (11), 1753–1756.
- (104) Burnstock, G. Purinergic Signalling and Disorders of the Central Nervous System. *Nat Rev Drug Discov* **2008**, *7* (7), 575–590.
- (105) Territo, P. R.; Meyer, J. A.; Peters, J. S.; Riley, A. A.; McCarthy, B. P.; Gao, M.; Wang, M.; Green, M. A.; Zheng, Q.-H.; Hutchins, G. D. Characterization of 11C-GSK1482160 for Targeting the P2X7 Receptor as a Biomarker for Neuroinflammation. *Journal of Nuclear Medicine* **2017**, *58* (3), 458–465.
- (106) Huang, G.; Lu, X.; Qiu, Y.; Bi, L.; Ye, P.; Yang, M.; Shen, Y.; Jin, H.; Han, J. Hetero-Aryl Bromide Precursor Fluorine-18 Radiosynthesis and Preclinical Evaluation of a Novel Positron Emission Tomography (PET) Tracer [18F]GSK1482160. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2022**, *73*, 116996.
- (107) Van Weehaeghe, D.; Koole, M.; Schmidt, M. E.; Deman, S.; Jacobs, A. H.; Souche, E.; Serdons, K.; Sunaert, S.; Bormans, G.; Vandenberghe, W.; Van Laere, K. [11C]JNJ54173717, a Novel P2X7 Receptor Radioligand as Marker for Neuroinflammation: Human Biodistribution, Dosimetry, Brain Kinetic Modelling and Quantification of Brain P2X7 Receptors in Patients with Parkinson's Disease and Healthy Volunteers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2019**, *46* (10), 2051–2064.
- (108) Koole, M.; Schmidt, M. E.; Hijzen, A.; Ravenstijn, P.; Vandermeulen, C.; Weehaeghe, D. V.; Serdons, K.; Celen, S.; Bormans, G.; Ceusters, M.; Zhang, W.; Nueten, L. V.; Kolb, H.; Hoon, J. de; Laere, K. V. 18F-JNJ-64413739, a Novel PET Ligand for the P2X7 Ion Channel: Radiation Dosimetry, Kinetic Modeling, Test-Retest Variability, and Occupancy of the P2X7 Antagonist JNJ-54175446. *Journal of Nuclear Medicine* **2019**, *60* (5), 683–690.

- (109) Ghazanfari, N.; Van Waarde, A.; Dierckx, R. A. J. O.; Doorduyn, J.; De Vries, E. F. J. Is Cyclooxygenase-1 Involved in Neuroinflammation? *J of Neuroscience Research* **2021**, *99* (11), 2976–2998.
- (110) Ohnishi, A.; Senda, M.; Yamane, T.; Sasaki, M.; Mikami, T.; Nishio, T.; Ikari, Y.; Nishida, H.; Shukuri, M.; Takashima, T.; Mawatari, A.; Doi, H.; Watanabe, Y.; Onoe, H. Human Whole-Body Biodistribution and Dosimetry of a New PET Tracer, [11C]Ketoprofen Methyl Ester, for Imagings of Neuroinflammation. *Nuclear Medicine and Biology* **2014**, *41* (7), 594–599.
- (111) Ohnishi, A.; Senda, M.; Yamane, T.; Mikami, T.; Nishida, H.; Nishio, T.; Akamatsu, G.; Ikari, Y.; Kimoto, S.; Aita, K.; Sasaki, M.; Shinkawa, H.; Yamamoto, Y.; Shukuri, M.; Mawatari, A.; Doi, H.; Watanabe, Y.; Onoe, H. Exploratory Human PET Study of the Effectiveness of 11C-Ketoprofen Methyl Ester, a Potential Biomarker of Neuroinflammatory Processes in Alzheimer’s Disease. *Nuclear Medicine and Biology* **2016**, *43* (7), 438–444.
- (112) Shukuri, M.; Mawatari, A.; Takatani, S.; Tahara, T.; Inoue, M.; Arakaki, W.; Ohno, M.; Doi, H.; Onoe, H. Synthesis and Preclinical Evaluation of 18F-Labeled Ketoprofen Methyl Esters for Cyclooxygenase-1 Imaging in Neuroinflammation. *Journal of Nuclear Medicine* **2022**, *63* (11), 1761–1767.
- (113) De Vries, E. F. J.; Doorduyn, J.; Dierckx, R. A.; Van Waarde, A. Evaluation of [11C]Rofecoxib as PET Tracer for Cyclooxygenase 2 Overexpression in Rat Models of Inflammation. *Nuclear Medicine and Biology* **2008**, *35* (1), 35–42.
- (114) Ji, B.; Kumata, K.; Onoe, H.; Kaneko, H.; Zhang, M.-R.; Seki, C.; Ono, M.; Shukuri, M.; Tokunaga, M.; Minamihisamatsu, T.; Suhara, T.; Higuchi, M. Assessment of Radioligands for PET Imaging of Cyclooxygenase-2 in an Ischemic Neuronal Injury Model. *Brain Research* **2013**, *1533*, 152–162.
- (115) Yamagishi, S.; Iga, Y.; Nakamura, M.; Takizawa, C.; Fukumoto, D.; Kakiuchi, T.; Nishiyama, S.; Ohba, H.; Tsukada, H.; Sato, K.; Ouchi, Y. Upregulation of Cannabinoid Receptor Type 2, but Not TSPO, in Senescence-Accelerated Neuroinflammation in Mice: A Positron Emission Tomography Study. *Journal of Neuroinflammation* **2019**, *16* (1), 208.
- (116) Ahmad, R.; Postnov, A.; Bormans, G.; Versijpt, J.; Vandenbulcke, M.; Van Laere, K. Decreased in Vivo Availability of the Cannabinoid Type 2 Receptor in Alzheimer’s Disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2016**, *43* (12), 2219–2227.
- (117) Pottier, G.; Gómez-Vallejo, V.; Padro, D.; Boisgard, R.; Dollé, F.; Llop, J.; Winkeler, A.; Martín, A. PET Imaging of Cannabinoid Type 2 Receptors with [11C]A-836339 Did Not Evidence Changes Following Neuroinflammation in Rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **2017**, *37* (3), 1163–1178.
- (118) Zhang, J.; Zhang, K.; Gao, Z.-G.; Paoletta, S.; Zhang, D.; Han, G. W.; Li, T.; Ma, L.; Zhang, W.; Müller, C. E.; Yang, H.; Jiang, H.; Cherezov, V.; Katritch, V.; Jacobson, K. A.; Stevens, R. C.; Wu, B.; Zhao, Q. Agonist-Bound Structure of the Human P2Y12 Receptor. *Nature* **2014**, *509* (7498), 119–122.
- (119) Hickman, S.; Izzy, S.; Sen, P.; Morsett, L.; El Khoury, J. Microglia in Neurodegeneration. *Nat Neurosci* **2018**, *21* (10), 1359–1369.
- (120) Murugappan, S. The Role of ADP Receptors in Platelet Function. *Front Biosci* **2006**, *11* (1), 1977.
- (121) Entsie, P.; Kang, Y.; Amofo, E. B.; Schöneberg, T.; Liverani, E. The Signaling Pathway of the ADP Receptor P2Y12 in the Immune System: Recent Discoveries and New Challenges. *IJMS* **2023**, *24* (7), 6709.

- (122) Haghghi, F.; Yesylevskyy, S.; Davani, S.; Ramseyer, C. Membrane Environment Modulates Ligand-Binding Propensity of P2Y₁₂ Receptor. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (4), 524.
- (123) Savi, P.; Herbert, J.-M. Clopidogrel and Ticlopidine: P2Y₁₂ Adenosine Diphosphate-Receptor Antagonists for the Prevention of Atherothrombosis. *Semin Thromb Hemost* **2005**, *31* (02), 174–183.
- (124) Cattaneo, M.; Schulz, R.; Nylander, S. Adenosine-Mediated Effects of Ticagrelor: Evidence and Potential Clinical Relevance. *Journal of the American College of Cardiology* **2014**, *63* (23), 2503–2509.
- (125) VAN Giezen, J. J. J.; Nilsson, L.; Berntsson, P.; Wissing, B.-M.; Giordanetto, F.; Tomlinson, W.; Greasley, P. J. Ticagrelor Binds to Human P2Y₁₂ Independently from ADP but Antagonizes ADP-Induced Receptor Signaling and Platelet Aggregation. *J Thromb Haemost* **2009**, *7* (9), 1556–1565.
- (126) Bach, P.; Antonsson, T.; Bylund, R.; Björkman, J.-A.; Österlund, K.; Giordanetto, F.; van Giezen, J. J. J.; Andersen, S. M.; Zachrisson, H.; Zetterberg, F. Lead Optimization of Ethyl 6-Aminonicotinate Acyl Sulfonamides as Antagonists of the P2Y₁₂ Receptor. Separation of the Antithrombotic Effect and Bleeding for Candidate Drug AZD1283. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (17), 7015–7024.
- (127) Sugidachi, A.; Ogawa, T.; Kurihara, A.; Hagihara, K.; Jakubowski, J. A.; Hashimoto, M.; Niitsu, Y.; Asai, F. The Greater *in Vivo* Antiplatelet Effects of Prasugrel as Compared to Clopidogrel Reflect More Efficient Generation of Its Active Metabolite with Similar Antiplatelet Activity to That of Clopidogrel's Active Metabolite. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2007**, *5* (7), 1545–1551.
- (128) Villa, A.; Klein, B.; Janssen, B.; Pedragosa, J.; Pepe, G.; Zinnhardt, B.; Vugts, D. J.; Gelosa, P.; Sironi, L.; Beaino, W.; Damont, A.; Dollé, F.; Jago, B.; Winkeler, A.; Ory, D.; Solin, O.; Vercouillie, J.; Funke, U.; Laner-Plamberger, S.; Blomster, L. V.; Christophersen, P.; Vegeto, E.; Aigner, L.; Jacobs, A.; Planas, A. M.; Maggi, A.; Windhorst, A. D. Identification of New Molecular Targets for PET Imaging of the Microglial Anti-Inflammatory Activation State. *Theranostics* **2018**, *8* (19), 5400–5418.
- (129) Bach, P.; Boström, J.; Brickmann, K.; Van Giezen, J. J. J.; Groneberg, R. D.; Harvey, D. M.; O'Sullivan, M.; Zetterberg, F. Synthesis, Structure–Property Relationships and Pharmacokinetic Evaluation of Ethyl 6-Aminonicotinate Sulfonylureas as Antagonists of the P2Y₁₂ Receptor. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *65*, 360–375.
- (130) Van Der Wildt, B.; Janssen, B.; Pekošak, A.; Stéen, E. J. L.; Schuit, R. C.; Kooijman, E. J. M.; Beaino, W.; Vugts, D. J.; Windhorst, A. D. Novel Thienopyrimidine-Based PET Tracers for P2Y₁₂ Receptor Imaging in the Brain. *ACS Chem. Neurosci.* **2021**, *12* (23), 4465–4474.
- (131) Breuil, L.; Marie, S.; Goutal, S.; Auvity, S.; Truillet, C.; Saba, W.; Langer, O.; Caillé, F.; Tournier, N. Comparative Vulnerability of PET Radioligands to Partial Inhibition of P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier: A Criterion of Choice? *J Cereb Blood Flow Metab* **2022**, *42* (1), 175–185.
- (132) Fox, E.; Bates, S. E. Tariquidar (XR9576): A P-Glycoprotein Drug Efflux Pump Inhibitor. *Expert Review of Anticancer Therapy* **2007**, *7* (4), 447–459.
- (133) Jackson, I. M.; Buccino, P. J.; Azevedo, E. C.; Carlson, M. L.; Luo, A. S. Z.; Deal, E. M.; Kalita, M.; Reyes, S. T.; Shao, X.; Beinart, C.; Nagy, S. C.; Chaney, A. M.; Anders, D. A.; Scott, P. J. H.; Smith, M.; Shen, B.; James, M. L. Radiosynthesis and Initial Preclinical Evaluation of [¹¹C]AZD1283 as a Potential P2Y₁₂ PET Radiotracer. *Nuclear Medicine and Biology* **2022**, *114–115*, 143–150.
- (134) Maeda, J.; Minamihisamatsu, T.; Shimojo, M.; Zhou, X.; Ono, M.; Matsuba, Y.; Ji, B.; Ishii, H.; Ogawa, M.; Akatsu, H.; Kaneda, D.; Hashizume, Y.; Robinson, J. L.; Lee, V.

- M.-Y.; Saito, T.; Saïdo, T. C.; Trojanowski, J. Q.; Zhang, M.-R.; Suhara, T.; Higuchi, M.; Sahara, N. Distinct Microglial Response against Alzheimer's Amyloid and Tau Pathologies Characterized by P2Y₁₂ Receptor. *Brain Communications* **2021**, *3* (1), fcab011.
- (135) Carter, S. F.; Herholz, K.; Rosa-Neto, P.; Pellerin, L.; Nordberg, A.; Zimmer, E. R. Astrocyte Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Trends in Molecular Medicine* **2019**, *25* (2), 77–95.
- (136) Gulyás, B.; Pavlova, E.; Kása, P.; Gulya, K.; Bakota, L.; Várszegi, S.; Keller, E.; Horváth, M. C.; Nag, S.; Hermeicz, I.; Magyar, K.; Halldin, C. Activated MAO-B in the Brain of Alzheimer Patients, Demonstrated by [¹¹C]-L-Deprenyl Using Whole Hemisphere Autoradiography. *Neurochem Int* **2011**, *58* (1), 60–68.
- (137) Fowler, J. S.; Logan, J.; Shumay, E.; Alia-Klein, N.; Wang, G.-J.; Volkow, N. D. Monoamine Oxidase: Radiotracer Chemistry and Human Studies: Monoamine Oxidase: Radiotracer Chemistry and Human Studies. *J. Label Compd. Radiopharm* **2015**, *58* (3), 51–64.
- (138) Fowler, J. S.; Wang, G.-J.; Logan, J.; Xie, S.; Volkow, N. D.; MacGregor, R. R.; Schlyer, D. J.; Pappas, N.; Alexoff, D. L.; Patlak, C.; Wolf, A. P. Selective Reduction of Radiotracer Trapping by Deuterium Substitution: Comparison of Carbon-11-L-Deprenyl and Carbon-11-Deprenyl-D₂ for MAO B Mapping. *J Nucl Med* **1995**, *36* (7), 1255.
- (139) Nag, S.; Fazio, P.; Lehmann, L.; Kettschau, G.; Heinrich, T.; Thiele, A.; Svedberg, M.; Amini, N.; Leesch, S.; Catafau, A. M.; Hannestad, J.; Varrone, A.; Halldin, C. In Vivo and In Vitro Characterization of a Novel MAO-B Inhibitor Radioligand, 18F-Labeled Deuterated Fluorodeprenyl. *Journal of Nuclear Medicine* **2016**, *57* (2), 315–320.
- (140) Narayanaswami, V.; Dahl, K.; Bernard-Gauthier, V.; Josephson, L.; Cumming, P.; Vasdev, N. Emerging PET Radiotracers and Targets for Imaging of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases: Outlook Beyond TSPO. *Mol Imaging* **2018**, *17*.
- (141) Hicks, J. W.; Sadvski, O.; Parkes, J.; Houle, S.; Hay, B. A.; Carter, R. L.; Wilson, A. A.; Vasdev, N. Radiosynthesis and Ex Vivo Evaluation of [¹⁸F]-(S)-3-(6-(3-Fluoropropoxy)Benzo[d]isoxazol-3-Yl)-5-(Methoxymethyl)Oxazolidin-2-One for Imaging MAO-B with PET. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2015**, *25* (2), 288–291.
- (142) Parker, C. A.; Nabulsi, N.; Holden, D.; Lin, S.; Cass, T.; Labaree, D.; Kealey, S.; Gee, A. D.; Husbands, S. M.; Quelch, D.; Carson, R. E.; Nutt, D. J.; Huang, Y.; Tyacke, R. J. Evaluation of ¹¹C-BU99008, a PET Ligand for the Imidazoline₂ Binding Sites in Rhesus Brain. *Journal of Nuclear Medicine* **2014**, *55* (5), 838–844.
- (143) Kawamura, K.; Shimoda, Y.; Yui, J.; Zhang, Y.; Yamasaki, T.; Wakizaka, H.; Hatori, A.; Xie, L.; Kumata, K.; Fujinaga, M.; Ogawa, M.; Kurihara, Y.; Nengaki, N.; Zhang, M.-R. A Useful PET Probe [¹¹C]BU99008 with Ultra-High Specific Radioactivity for Small Animal PET Imaging of I₂-Imidazoline Receptors in the Hypothalamus. *Nuclear Medicine and Biology* **2017**, *45*, 1–7.
- (144) Parker, C. A.; Nutt, D. J.; Tyacke, R. J. Imidazoline-I₂ PET Tracers in Neuroimaging. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, *24* (12), 9787.
- (145) Vincenzi, F.; Pasquini, S.; Contri, C.; Cappello, M.; Nigro, M.; Travagli, A.; Merighi, S.; Gessi, S.; Borea, P. A.; Varani, K. Pharmacology of Adenosine Receptors: Recent Advancements. *Biomolecules* **2023**, *13* (9), 1387.
- (146) Effendi, W. I.; Nagano, T.; Kobayashi, K.; Nishimura, Y. Focusing on Adenosine Receptors as a Potential Targeted Therapy in Human Diseases. *Cells* **2020**, *9* (3), 785.
- (147) Borea, P. A.; Gessi, S.; Merighi, S.; Vincenzi, F.; Varani, K. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiological Reviews* **2018**, *98* (3), 1591–1625.

- (148) Haskó, G.; Linden, J.; Cronstein, B.; Pacher, P. Adenosine Receptors: Therapeutic Aspects for Inflammatory and Immune Diseases. *Nat Rev Drug Discov* **2008**, *7* (9), 759–770.
- (149) Ohta, A.; Sitkovsky, M. Role of G-Protein-Coupled Adenosine Receptors in Downregulation of Inflammation and Protection from Tissue Damage. *Nature* **2001**, *414* (6866), 916–920.
- (150) Boison, D.; Jarvis, M. F. Adenosine Kinase: A Key Regulator of Purinergic Physiology. *Biochemical Pharmacology* **2021**, *187*, 114321.
- (151) Latini, S.; Pedata, F. Adenosine in the Central Nervous System: Release Mechanisms and Extracellular Concentrations. *Journal of Neurochemistry* **2001**, *79* (3), 463–484.
- (152) Boison, D. Adenosine Kinase, Epilepsy and Stroke: Mechanisms and Therapies. *Trends in Pharmacological Sciences* **2006**, *27* (12), 652–658.
- (153) Gebril, H.; Wahba, A.; Zhou, X.; Lai, T.; Alharfoush, E.; DiCicco-Bloom, E.; Boison, D. Developmental Role of Adenosine Kinase in the Cerebellum. *eNeuro* **2021**, *8* (3), 11–21.
- (154) Fedele, D. E.; Gouder, N.; Güttinger, M.; Gabernet, L.; Scheurer, L.; Rüllicke, T.; Crestani, F.; Boison, D. Astroglialosis in Epilepsy Leads to Overexpression of Adenosine Kinase, Resulting in Seizure Aggravation. *Brain* **2005**, *128* (10), 2383–2395.
- (155) Jin, W.; Xu, W.; Chen, J.; Zhang, X.; Shi, L.; Ren, C. Adenosine Kinase Facilitated Astroglialosis-Induced Cortical Neuronal Death in Traumatic Brain Injury. *J Mol Hist* **2016**, *47* (3), 259–271.
- (156) Boison, D. Adenosine Kinase: Exploitation for Therapeutic Gain. *Pharmacol Rev* **2013**, *65* (3), 906–943.
- (157) Ugarkar, B. G.; Castellino, A. J.; DaRe, J. M.; Kopcho, J. J.; Wiesner, J. B.; Schanzer, J. M.; Erion, M. D. Adenosine Kinase Inhibitors. 2. Synthesis, Enzyme Inhibition, and Antiseizure Activity of Diaryltubercidin Analogues. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (15), 2894–2905.
- (158) Bookser, B. C.; Matelich, M. C.; Ollis, K.; Ugarkar, B. G. Adenosine Kinase Inhibitors. 4. 6,8-Disubstituted Purine Nucleoside Derivatives. Synthesis, Conformation, and Enzyme Inhibition. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (9), 3389–3399.
- (159) Cottam, H. B.; Wasson, D. B.; Shih, H. C.; Raychaudhuri, A.; Di Pasquale, G.; Carson, D. A. New Adenosine Kinase Inhibitors with Oral Antiinflammatory Activity: Synthesis and Biological Evaluation. *J. Med. Chem.* **1993**, *36* (22), 3424–3430.
- (160) Bookser, B. C.; Ugarkar, B. G.; Matelich, M. C.; Lemus, R. H.; Allan, M.; Tsuchiya, M.; Nakane, M.; Nagahisa, A.; Wiesner, J. B.; Erion, M. D. Adenosine Kinase Inhibitors. 6. Synthesis, Water Solubility, and Antinociceptive Activity of 5-Phenyl-7-(5-Deoxy- β -d-Ribofuranosyl)Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidines Substituted at C4 with Glycinamides and Related Compounds. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (24), 7808–7820.
- (161) Zheng, G. Z.; Lee, C.-H.; Pratt, J. K.; Perner, R. J.; Jiang, M. Q.; Gomtsyan, A.; Matulenko, M. A.; Mao, Y.; Koenig, J. R.; Kim, K. H.; Muchmore, S.; Yu, H.; Kohlhaas, K.; Alexander, K. M.; McGaraughty, S.; Chu, K. L.; Wismer, C. T.; Mikusa, J.; Jarvis, M. F.; Marsh, K.; Kowaluk, E. A.; Bhagwat, S. S.; Stewart, A. O. Pyridopyrimidine Analogues as Novel Adenosine Kinase Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001**, *11* (16), 2071–2074.
- (162) Perner, R. J.; Gu, Y.-G.; Lee, C.-H.; Bayburt, E. K.; McKie, J.; Alexander, K. M.; Kohlhaas, K. L.; Wismer, C. T.; Mikusa, J.; Jarvis, M. F.; Kowaluk, E. A.; Bhagwat, S. S. 5,6,7-Trisubstituted 4-Aminopyrido[2,3-*d*]Pyrimidines as Novel Inhibitors of Adenosine Kinase. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (24), 5249–5257.
- (163) Matulenko, M. A.; Lee, C.-H.; Jiang, M.; Frey, R. R.; Cowart, M. D.; Bayburt, E. K.; DiDomenico, S.; Gfesser, G. A.; Gomtsyan, A.; Zheng, G. Z.; McKie, J. A.; Stewart, A.

- O.; Yu, H.; Kohlhaas, K. L.; Alexander, K. M.; McGaraughty, S.; Wismer, C. T.; Mikusa, J.; Marsh, K. C.; Snyder, R. D.; Diehl, M. S.; Kowaluk, E. A.; Jarvis, M. F.; Bhagwat, S. S. 5-(3-Bromophenyl)-7-(6-Morpholin-4-Ylpyridin-3-Yl)Pyrido[2,3-d]Pyrimidin-4-Ylamine: Structure–Activity Relationships of 7-Substituted Heteroaryl Analogs as Non-Nucleoside Adenosine Kinase Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13* (11), 3705–3720.
- (164) Boldron, C.; Besse, A.; Bordes, M.-F.; Tissandié, S.; Yvon, X.; Gau, B.; Badorc, A.; Rousseaux, T.; Barré, G.; Meneyrol, J.; Zech, G.; Nazare, M.; Fossey, V.; Pflieger, A.-M.; Bonnet-Lignon, S.; Millet, L.; Briot, C.; Dol, F.; Héroult, J.-P.; Savi, P.; Lassalle, G.; Delesque, N.; Herbert, J.-M.; Bono, F. *N* -[6-(4-Butanoyl-5-Methyl-1 *H* -Pyrazol-1-Yl)Pyridazin-3-Yl]-5-Chloro-1-[2-(4-Methylpiperazin-1-Yl)-2-Oxoethyl]-1 *H* -Indole-3-Carboxamide (SAR216471), a Novel Intravenous and Oral, Reversible, and Directly Acting P2Y₁₂ Antagonist. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (17), 7293–7316.
- (165) Krūkle-Bērziņa, K.; Bērziņš, K.; Shubin, K. Synthesis of Some Heptazine Derivatives. *Chem Heterocycl Comp* **2019**, *55* (12), 1281–1284.
- (166) Vandersteen, A. A.; Mundle, S. O. C.; Kluger, R. Protonated Carbonic Acid and Reactive Intermediates in the Acidic Decarboxylation of Indolecarboxylic Acids. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (15), 6505–6509.
- (167) Simpson, M. G.; Pittelkow, M.; Watson, S. P.; Sanders, J. K. M. Dynamic Combinatorial Chemistry with Hydrazones: Libraries Incorporating Heterocyclic and Steroidal Motifs. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (5), 1181.
- (168) Gangarapu, N. R.; Reddy, E. K.; Sajith, A. M.; Yellappa, S.; Chandrasekhar, K. B. NMI/MsCl-Mediated Amide Bond Formation of Aminopyrazines and Aryl/Heteroaryl Carboxylic Acids: Synthesis of Biologically Relevant Pyrazine Carboxamides. *ChemistrySelect* **2017**, *2* (25), 7706–7710.
- (169) *DiscoverX, Eurofins*. www.discoverx.com/technologies-platforms/enzyme-fragment-complementation-technology/cell-based-efc-assays/protein-protein-interactions/gpcrs-b-arrestin.
- (170) Marzano, C.; Jakobsen, S.; Salinas, C.; Tang, S. P.; Bender, D.; Passchier, J.; Plisson, C. Radiosynthesis and Evaluation of 1-Substituted 3-(2,3-Dihydro-1H-Inden-2-Yl)-6-(1-Ethylpropyl)-(3 *R*, 6 *R*)-2,5-Piperazinedione Derivatives as PET Tracers for Imaging the Central Oxytocinergic System. *J Label Compd Radiopharm* **2017**, *60* (12), 556–565.
- (171) Challis, R. C.; Ravindra Kumar, S.; Chan, K. Y.; Challis, C.; Beadle, K.; Jang, M. J.; Kim, H. M.; Rajendran, P. S.; Tompkins, J. D.; Shivkumar, K.; Deverman, B. E.; Gradinaru, V. Systemic AAV Vectors for Widespread and Targeted Gene Delivery in Rodents. *Nat Protoc* **2019**, *14* (2), 379–414.
- (172) Zhang, M.; Hugon, G.; Bouillot, C.; Bolbos, R.; Langlois, J.-B.; Billard, T.; Bonnefoi, F.; Li, B.; Zimmer, L.; Chauveau, F. Evaluation of Myelin Radiotracers in the Lysolecithin Rat Model of Focal Demyelination: Beware of Pitfalls! *Contrast Media & Molecular Imaging* **2019**, *2019* (1).
- (173) Ballerini, P.; Dovizio, M.; Bruno, A.; Tacconelli, S.; Patrignani, P. P2Y₁₂ Receptors in Tumorigenesis and Metastasis. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*.
- (174) Palacios-Acedo, A. L.; Mezouar, S.; Mège, D.; Crescence, L.; Dubois, C.; Panicot-Dubois, L. P2RY₁₂-Inhibitors Reduce Cancer-Associated Thrombosis and Tumor Growth in Pancreatic Cancers. *Front. Oncol.* **2021**, *11*.
- (175) Jarvis, M. F.; Yu, H.; Kohlhaas, K.; Alexander, K.; Lee, C.-H.; Jiang, M.; Bhagwat, S. S.; Williams, M.; Kowaluk, E. A. ABT-702 (4-Amino-5-(3-Bromophenyl)-7-(6-Morpholinopyridin-3-Yl)Pyrido[2,3-d]Pyrimidine), a Novel Orally Effective Adenosine Kinase Inhibitor with Analgesic and Anti-Inflammatory Properties: I. In Vitro

- Characterization and Acute Antinociceptive Effects in the Mouse. *J Pharmacol Exp Ther* **2000**, 295 (3), 1156–1164.
- (176) Lee, C.-H.; Jiang, M.; Cowart, M.; Gfesser, G.; Perner, R.; Kim, K. H.; Gu, Y. G.; Williams, M.; Jarvis, M. F.; Kowaluk, E. A.; Stewart, A. O.; Bhagwat, S. S. Discovery of 4-Amino-5-(3-Bromophenyl)-7-(6-Morpholino-Pyridin-3-Yl)Pyrido[2,3-*d*]Pyrimidine, an Orally Active, Non-Nucleoside Adenosine Kinase Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2001**, 44 (13), 2133–2138.
- (177) White, E. Deamination of Amines. 2-Phenylethyl Benzoate via the Nitrosoamide Decomposition. *Org. Synth.* **1967**, 47, 44.
- (178) Zhu, M.; Jalalian, N.; Olofsson, B. One-Pot Synthesis of Diaryliodonium Salts Using Toluenesulfonic Acid: A Fast Entry to Electron-Rich Diaryliodonium Tosylates and Triflates. *Synlett* **2008**, 2008, 592–596.
- (179) Bielawski, M.; Olofsson, B. High-Yielding One-Pot Synthesis of Diaryliodonium Triflates from Arenes and Iodine or Aryl Iodides. *Chem. Commun.* **2007**, No. 24, 2521–2523.
- (180) Bielawski, M.; Malmgren, J.; Pardo, L. M.; Wikmark, Y.; Olofsson, B. One-Pot Synthesis and Applications of N-Heteroaryl Iodonium Salts. *ChemistryOpen* **2014**, 3 (1), 19–22.
- (181) Weber, V.; Arnaud, L.; Dukic-Stefanovic, S.; Wenzel, B.; Roux, V.; Chezal, J.-M.; Lai, T.-H.; Teodoro, R.; Kopka, K.; Miot-Noirault, E.; Deuther-Conrad, W.; Maisonia-Besset, A. Novel Radioiodinated and Radiofluorinated Analogues of FT-2102 for SPECT or PET Imaging of mIDH1 Mutant Tumours. *Molecules* **2022**, 27 (12), 3766.
- (182) Köse, M.; Schiedel, A. C.; Bauer, A. A.; Poschenrieder, H.; Burbiel, J. C.; Akkinepally, R. R.; Stachel, H.-D.; Müller, C. E. Focused Screening to Identify New Adenosine Kinase Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2016**, 24 (21), 5127–5133.
- (183) Gomtsyan, A.; Didomenico, S.; Lee, C.-H.; Stewart, A. O.; Bhagwat, S. S.; Kowaluk, E. A.; Jarvis, M. F. Synthesis and Biological Evaluation of Pteridine and Pyrazolopyrimidine Based Adenosine Kinase Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, 14 (16), 4165–4168.
- (184) Bobowska, A.; Galezowski, M.; Eremeta-Spisak, J.; Nowogrodski, M.; Obara, A.; Lozinska, I.; Dudek, M.; Janiga, A.; Reus, J.; Wronowski, M.; Zastawna, M.; Fabritius, C.-H.; Radja, A.; Porter, R. A.; Wyrebek, P.; Swirski, M.; Stasi, L. Modulators of the Adenosine A2A Receptor. WO2020/128036A1, 2019.
- (185) Dziedzic, K.; Węgrzyn, P.; Gałęzowski, M.; Bońkowska, M.; Grycuk, K.; Satała, G.; Wiatrowska, K.; Wiklik, K.; Brzózka, K.; Nowak, M. Release of Adenosine-Induced Immunosuppression: Comprehensive Characterization of Dual A2A/A2B Receptor Antagonist. *International Immunopharmacology* **2021**, 96.
- (186) Larsen, P.; Ulin, J.; Dahlstrøm, K.; Jensen, M. Larsen P, Ulin J, Dahlstrøm K, Jensen M. Synthesis of [¹¹C]Iodomethane by Iodination of [¹¹C]Methane. *Appl Radiat Isot* 48:153-157. *Applied Radiation and Isotopes* **1997**, 48, 153–157.
- (187) Jewett, D. M. A Simple Synthesis of [¹¹C]Methyl Triflate. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part A. Applied Radiation and Isotopes* **1992**, 43 (11), 1383–1385.
- (188) Långström, B.; Lundqvist, H. The Preparation of ¹¹C-Methyl Iodide and Its Use in the Synthesis of ¹¹C-Methyl-L-Methionine. *Int J Appl Radiat Isot* **1976**, 27 (7), 357–363.
- (189) Pottier, G.; Marie, S.; Goutal, S.; Auvity, S.; Peyronneau, M.-A.; Stute, S.; Boisgard, R.; Dollé, F.; Buvat, I.; Caillé, F.; Tournier, N. Imaging the Impact of the P-Glycoprotein (ABCB1) Function on the Brain Kinetics of Metoclopramide. *Journal of Nuclear Medicine* **2016**, 57 (2), 309–314.

- (190) Tournier, N.; Goutal, S.; Auvity, S.; Traxl, A.; Mairinger, S.; Wanek, T.; Helal, O.-B.; Buvat, I.; Soussan, M.; Caillé, F.; Langer, O. Strategies to Inhibit ABCB1- and ABCG2-Mediated Efflux Transport of Erlotinib at the Blood–Brain Barrier: A PET Study on Nonhuman Primates. *Journal of Nuclear Medicine* **2017**, 58 (1), 117–122.

Titre : Synthèse, radiomarquage et caractérisation *in vitro* et *in vivo* de nouveaux radiotraceurs pour l'imagerie TEP de la neuroinflammation.

Mots clés : Tomographie par émission de positons, radiochimie, chimie organique, neuroinflammation

Résumé : La neuroinflammation (NI) est un phénomène commun à toutes les maladies neurodégénératives affectant le système nerveux central (SNC). L'un des effets de la NI est l'activation des cellules immunitaires du SNC telles que les microglies et les astrocytes. Dans un premier temps, cette activation a un caractère protecteur pour le cerveau. Cependant, lorsqu'elle n'est plus régulée, cela provoque la suractivation des microglies et des astrocytes, ce qui a un effet délétère sur le cerveau. Pour visualiser cette neuroinflammation, la tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie moléculaire de choix. A ce jour, il existe quelques radiotraceurs capables d'imager la NI, mais leur seule cible cellulaire n'est pas spécifique à un seul type de cellules du cerveau. Pour pallier à ce problème, il est nécessaire d'identifier de nouvelles cibles biologiques plus spécifiques, comme les récepteurs P2Y₁₂ (P2Y₁₂R) ou l'enzyme adénosine kinase (ADK). Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse sont de développer de nouveaux radiotraceurs ciblant ces deux cibles et de les évaluer *in vitro* et *in vivo* au moyen de l'imagerie TEP.

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur les récepteurs P2Y₁₂ qui sont des récepteurs présents à la surface des cellules microgliales. Plusieurs pharmacophores avec une haute affinité pour récepteurs P2Y₁₂ ont été identifiés dans la littérature. Parmi ceux-ci, nous avons sélectionné un composé basé sur un noyau pyrazolo-pyridazine et préparé des analogues méthylés ou fluorés dans l'optique d'un marquage au carbone-11 ou au fluor-18.

Une première sélection a été faite après évaluation *in vitro* de l'affinité de ces composés pour P2Y₁₂ grâce à deux tests : un test basé sur le recrutement de la β -arrestine et test de compétition avec un ligand tritié. Leur métabolisme a aussi été évalué *in vitro* via l'emploi de microsomes de rats ou humains. Les composés sélectionnés après ces tests *in vitro* ont été radiomarqués au carbone-11 et au fluor-18, et ont ensuite été évalués par autoradiographie puis *in vivo* par imagerie TEP au sein d'un modèle animal de surexpression des récepteurs ciblés.

Dans un second temps, nous nous sommes focalisés sur l'adénosine kinase, une enzyme qui régule la concentration cellulaire en adénosine et qui est notamment exprimée par les astrocytes, des cellules gliales du SNC. En se basant sur un ligand de la littérature présentant une forte affinité pour l'ADK et pouvant traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE), nous avons imaginé des analogues pouvant être radiomarqués. Dans ce cas également, l'introduction d'un atome de fluor-18 ou de carbone-11 à différentes positions a été étudiée. Trois analogues méthylés ou fluorés ont ainsi été préparés et leur affinité a été déterminée par un test d'inhibition. En parallèle, le radiomarquage au carbone-11 et au fluor-18 des précurseurs de marquage correspondants a été mis en place et l'évaluation biologique *in vitro* et *in vivo* de ces radiotraceurs est en cours.

Title: Synthesis, radiolabeling and *in vitro* and *in vivo* characterisation of new radiotracers for PET imaging of neuroinflammation.

Keywords: Positron emission tomography, radiochemistry, organic synthesis, neuroinflammation

Abstract: Neuroinflammation (NI) is a common phenomenon to all neurodegenerative diseases affecting the central nervous system (CNS). One effect of NI is the activation of the immune cells of CNS like microglia and astrocytes. This activation usually protects the brain against inflammation, however, if it is not regulated, the resulting overactivation can lead to brain-damaging consequences. To visualize and diagnose neuroinflammation, positron emission tomography (PET) is a commonly used molecular imaging technique. A few radiotracers have been reported for neuroinflammation imaging, but the lack of specificity of their targets is a drawback for their use in medical imaging. To overcome this problem, it is therefore necessary to focus on new biological targets like P2Y₁₂ receptors (P2Y₁₂R) or the adenosine kinase enzyme (ADK). The aims of this doctoral project are to develop new radioligands of these targets and to evaluate their *in vitro* and *in vivo* efficiency by PET imaging.

P2Y₁₂ receptors are found at the surface of microglia. Several pharmacophores with high affinity for P2Y₁₂ receptors have been identified in the literature. Amongst them, we selected a pyrazolo-pyridazine scaffold and synthesized analogues presenting a fluorine or a methyl group with the perspective of labeling with carbon-11 and fluorine-18.

Best compounds were selected *in vitro* from evaluation of their affinities for the receptors with two methods: a β -arrestin recruitment assay and a radioligand binding assay. Their *in vitro* metabolism was also tested with human and rat microsomes. The corresponding labelling precursors were prepared and, after labelling with carbon-11 or fluorine-18, the radiotracers were evaluated *in vitro* by autoradiography and *in vivo* by PET imaging on a P2Y₁₂ receptors animal model.

The second target examined in this thesis project was adenosine kinase, an enzyme regulating extracellular adenosine concentration and mostly expressed by astrocytes, CNS glial cells. In the literature, we have selected a potent ADK ligand with the ability to go through the blood brain barrier (BBB) and synthesized analogues containing a fluorine or a methylated group. Three new ligands have thus been synthesised and their affinity for ADK has been determined by cell adenosine kinase inhibition assay. Concurrently, the radiolabelling of the corresponding labelling precursors with carbon-11 or fluorine-18 have been implemented and *in vitro* and *in vivo* biological evaluations of these radioligands are currently underway.