



HAL
open science

Développement du Zirconium-89 pour le radiomarquage d'anticorps monoclonaux pour la tomographie par émission de positons

Florian Moulin

► **To cite this version:**

Florian Moulin. Développement du Zirconium-89 pour le radiomarquage d'anticorps monoclonaux pour la tomographie par émission de positons. Radiochimie. Université de Strasbourg, 2021. Français. NNT : 2021STRAE011 . tel-03289969

HAL Id: tel-03289969

<https://theses.hal.science/tel-03289969>

Submitted on 24 Jan 2022

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.

ÉCOLE DOCTORALE 182 Physique Chimie

[Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien]

THÈSE présentée par :

Florian MOULIN

soutenue le : **09 Avril 2021**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie/Radiochimie

Développement du Zirconium-89 pour le radiomarquage d'anticorps monoclonaux pour la tomographie par émission de positons

THÈSE dirigée par :

M. OUADI Ali

Ingénieur de Recherche, IPHC de Strasbourg

M. HADDAD Férid

Professeur, Université de Nantes

RAPPORTEURS :

M. BENOIST Eric

Professeur, Université de Toulouse III – Paul Sabatier

Mme PELLEGRINI-MOISE Nadia

Maître de conférences, Université de Nancy

EXAMINATEURS :

M. CHAMBRON Jean-Claude

Directeur de recherche, Université de Strasbourg

Mme NONAT Aline

Chargé de recherche, Université de Strasbourg

M. ALLIOT Cyrille

Ingénieur de recherche, INSERM, Nantes

Remerciements

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a été réalisé au Département Radiobiologie, Hadronthérapie et Imagerie Moléculaire (DRHIM) situé à l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), Université de Strasbourg en codirection avec le GIP ARRONAX.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse le Dr. Ali OUADI de m'avoir accueilli au sein de son équipe. Tes connaissances scientifiques très riches, ta disponibilité et ton enthousiasme m'ont permis de mener à bien cette thèse. Je tiens à remercier mon co-directeur de thèse le Pr. HADDAD Férid et mon encadrant scientifique Dr. ALLIOT Cyrille qui m'ont donné toute leur latitude et les moyens nécessaires pour mener à bien ce travail.

Je remercie également les membres de jury le Pr. BENOIST Eric, le Dr. PELLEGRINI-MOISE Nadia, le Dr. CHAMBRON Jean-Claude et le Dr. NONAT Aline qui me font l'honneur d'examiner mon travail de thèse.

Je tiens à remercier le Pr. HOLLAND Jason pour les calculs de DFT, le Dr. GUILLOU Amaury pour nos discussions et l'accueil au sein de l'Université de Zurich (UZH). Un grand merci au Dr. THOMAS Lionel et à JESSEL Bruno pour les images TEP. Je voudrais aussi remercier une nouvelle fois le Dr. CHAMBRON Jean-Claude dont la collaboration m'a permis d'obtenir ces images TEP. Je remercie également Mme KOUAHO-COUTIN Stéphanie et toute l'équipe du Service Commun de Spectrométrie de Masse de l'Institut LeBel.

Merci à tous les membres du laboratoire pour leur participation à la bonne ambiance qui a régné durant ces années : Dr. MARCHAND Patrice (pour son aide et nos discussions sur la chimie), Dr. BOISSON Frédéric, Dr. BRASSE David et Pr. LAQUERRIERE (pour votre soutien), l'équipe CYRCé dans son ensemble : Michel, Nathalie et Jacky pour leurs aides tout au long de ma thèse. Merci également à Quentin, Olivier, Maria, Catherine et Sylvia.

Je salue tous mes collègues que j'ai eu l'honneur de rencontrer et de côtoyer au laboratoire : Julie, Kajal, Truong, Alexandre et tous les stagiaires qui ont occupés nos bureaux avec leurs

bonnes humeurs. Je n'oublie pas d'associer à mes remerciements toutes les autres personnes du laboratoire de radiochimie et qui ont su rendre mon quotidien agréable.

Enfin, mes remerciements les plus chaleureux sont adressés à ma mère, à l'ensemble de ma famille, à mes amis chimistes désormais docteurs (Raphael, Julien ou Berthaud (au choix), Maxime, Corentin, Thibault et Morane) et bien sûr je remercie aussi mes amis non-chimistes (Jean, Adrien, Félix et Alexandre).

Pour finir, avec la meilleure, ma meilleure amie, celle avec qui j'ai partagé l'ensemble de mes études jusqu'à cet exact moment où je les termine enfin, celle avec qui je partage ma vie dans ses hauts et ses bas, pour son amour et son soutien, ma Julie. Merci pour tout.

Déclaration sur l'honneur

Declaration of Honour

J'affirme être informé que le plagiat est une faute grave susceptible de mener à des sanctions administratives et disciplinaires pouvant aller jusqu'au renvoi de l'Université de Strasbourg et passible de poursuites devant les tribunaux de la République Française.

Je suis conscient(e) que l'absence de citation claire et transparente d'une source empruntée à un tiers (texte, idée, raisonnement ou autre création) est constitutive de plagiat.

Au vu de ce qui précède, j'atteste sur l'honneur que le travail décrit dans mon manuscrit de thèse est un travail original et que je n'ai pas eu recours au plagiat ou à toute autre forme de fraude.

I affirm that I am aware that plagiarism is a serious misconduct that may lead to administrative and disciplinary sanctions up to dismissal from the University of Strasbourg and liable to prosecution in the courts of the French Republic.

I am aware that the absence of a clear and transparent citation of a source borrowed from a third party (text, idea, reasoning or other creation) is constitutive of plagiarism.

In view of the foregoing, I hereby certify that the work described in my thesis manuscript is original work and that I have not resorted to plagiarism or any other form of fraud.

Nom : Prénom : Moulin Florian

Ecole doctorale : Ecole doctorale de Physique et Chimie-Physique (ED182)

Laboratoire : Département Radiobiologie, Hadronthérapie et Imagerie Moléculaire, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (UMR7178)

Date : 07 mai 2021

Abréviations

AA Acide aminé

AcM Anticorps monoclonal

AMA Activité Molaire Apparente

CYRCé Cyclotron de Recherche et d'Enseignement

DFO Desferrioxamine B

DFT Density Functional Theory

DMF Diméthylformamide

DOTA acide 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tétrazacyclododécane-1,4,7,10-tétrayl)tétraacétique

DTPA acide diéthylènetriaminepentaacétique

EDTA acide éthylènediaminetétraacétique

ESI Electrospray Ionization

FDG Fluorodéoxyglucose

Glu Acide glutamique

Gly Glycine

HPLC High Performance Liquid Chromatography

IR Infra-rouge

MALDI-TOF Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization –Time Of Flight

PBS Phosphate Buffered Saline

RMN Résonance Magnétique Nucléaire

TFA acide trifluoro acétique

TEMP Tomographie par Émission MonoPhotonique

TEP Tomographie par Émission de Positons

Théranostique Contraction de thérapie et diagnostique

Tr/min Tour par minute

UV Ultraviolet

Zr Zirconium

Zr-89, ⁸⁹Zr Zirconium-89

Sommaire

Introduction générale.....	12
Chapitre 1 : ImmunoTEP.....	15
1 Médecine personnalisée	15
1.1 Concepts.....	15
1.1.1 Introduction	15
1.1.1.1 Historique des thérapies.....	16
1.1.2 Immunothérapie	17
1.1.2.1 Principes	17
1.1.2.2 Les anticorps.....	18
1.1.2.3 Antigènes : cibles des anticorps.....	19
1.1.2.4 Mécanisme de la mort des cellules cancéreuses.....	21
1.1.3 Conclusion	22
2 L'imagerie moléculaire : une technologie au service de la clinique.....	25
2.1.1 L'imagerie nucléaire en oncologie	26
2.1.1.1 L'imagerie TEMP	27
2.1.1.2 L'imagerie PET.....	28
2.1.1.3 Les limitations du TEP	29
2.1.2 Conclusion	30
3 Différents isotopes radioactifs utilisés.....	31
3.1.1 Généralités	31
3.1.2 Historique et productions des isotopes	33
3.1.2.1 Le cuivre-64	33
3.1.2.2 L'iode-124	34
3.1.3 Les objectifs.....	36
4 Bibliographie.....	37
Chapitre 2 : Le Zirconium-89.....	40
1 Généralités.....	40
1.1 Les productions de Zr-89.....	41
1.2 La purification	43
1.3 Caractéristiques du Zirconium	44
1.4 L'activité molaire apparente	47

2	<i>Matériels et méthodes pour la production de ⁸⁹Zr</i>	49
2.1	Introduction	49
2.2	Le choix de la cible	50
2.2.1	La pièce cible pour la production de Zirconium-89	50
2.2.2	Système de transport	52
2.2.3	Solubilisation de la couche d'Yttrium	53
3	<i>La séparation chimique du Zirconium-89</i>	55
3.1	La séparation par utilisation de résines	55
3.1.1	Préparation de la résine	55
3.1.2	Résine commerciale	57
3.1.3	Séparation à la main du Zirconium-89	57
3.2	Vers une automatisation de la séparation	58
3.3	Préparations des deux formes de Zirconium-89	61
3.4	Les analyses des productions en Zirconium-89	62
3.4.1	Détermination de la pureté des radionucléides.....	62
3.4.2	Détermination de l'activité molaire apparente (AMA)	63
3.4.3	Détermination de la pureté chimique	64
3.5	Conclusion	66
4	<i>Bibliographie</i>	67
Chapitre 3 : Synthèse de ligands au Zirconium-89		69
1	<i>Le ⁸⁹Zr-ImmunoTEP</i>	69
1.1	Généralités	69
1.2	Propriétés du Zirconium	70
1.2.1	Etat de l'art.....	70
1.2.2	Conclusion	72
1.3	Liste des ligands du Zr et imagerie TEP	73
1.3.1	Les dérivés de la Desferrioxamine-B	73
1.3.2	Les autres chélatants du Zirconium-89	78
1.3.2.1	Les chélatants cycliques.....	78
1.3.2.2	Les ligands à bases HOPO	79
1.3.3	Comparaison directe d'un même squelette linéaire et cyclique	83

1.3.4	Les ligands au squelette à base de cyclen et cyclam.....	85
1.3.4.1	Introduction.....	85
1.3.4.2	Un cycle tétraazacycloalkane bien connu, le DOTA.....	87
1.3.5	Le ligand historique, la Desferrioxamine-B	91
2	Synthèse de dérivé du DFO	93
2.1	Les acides aminés capables de complexer le Zr-89.....	96
2.2	La synthèse du tripeptide Gly-Glu-Gly	97
2.2.1	Synthèse via la Voie A	97
2.2.2	Synthèse via la Voie B	99
2.3	Synthèse du tripeptide Gly-Asp-Gly.....	101
2.4	Synthèse du dérivé de la desferoxamine : la desferoxamine-glycine-acide glutamique-glycine	103
2.4.1	Synthèse de la DFO-Gly-Glu(OBz)-Gly-NHBoc	103
2.4.2	Synthèse de la DFO-Gly-Glu(OBz)-Gly-NH ₂	104
2.4.3	Synthèse de la DFO-Gly-Glu(OH)-Gly-NH ₂	107
3	Synthèse et applications de dérivés du DFO-Gly-Glu(OH)-Gly-NH₂, 15	109
3.1	Introduction à la photochimie.....	109
3.1.1	Etat de l'art.....	109
3.1.2	Choix du groupement réactif pour la photosynthèse	109
3.1.3	Photoréaction produisant des carbènes (exemple des produits diazirines)	110
3.1.4	Photoréaction des azotures d'aryle	111
3.2	Photoconjugaison de ligands à un anticorps.....	112
3.2.1	Etat de l'art.....	112
3.2.2	Intérêt d'une telle conjugaison	114
3.3	Dérivé hydrosoluble de la Desferrioxamine aryle azide.....	116
3.4	Synthèse de dérivé de 15 photolabile.....	118
4	Bibliographie.....	121
	Chapitre 4 : Etudes <i>in vitro</i>.....	124
1	Complexation de 15 et du Zirconium-89.....	124
1.1	Matériels et méthodes	124
1.1.1	Introduction	124

1.1.2	Préparation des solutions : complexation des ligands et du Zirconium-89	125
1.2	Tests de stabilité en milieu aqueux	126
1.2.1	Dans du PBS.....	126
1.2.2	Face à l'EDTA	127
1.3	Dans du plasma murin	128
1.4	Détermination du log D	129
1.5	Conclusion	130
2	<i>Complexation de 23, 24 et 25 avec le Zirconium-89</i>	<i>131</i>
2.1	Etude de stabilité <i>in vitro</i>.....	131
2.1.1	Stabilité des ligands dans du plasma murin	131
2.1.2	Stabilité face à la transchélation l'EDTA.....	132
2.1.3	Stabilité face à la transmétallation.....	133
2.2	La stabilité thermodynamique d'un complexe métal-ligand, telle que mesurée par la constante de formation ($\log \beta$)	134
2.3	Conclusion	136
3	<i>Bibliographie.....</i>	<i>137</i>
Chapitre 5 : Projet ZRpNET.....		138
1	<i>Problématiques de ce projet</i>	<i>138</i>
2	<i>Les tumeurs neuroendocrines du pancréas.....</i>	<i>138</i>
2.1	Introduction.....	138
2.2	Evaluation de l'angiogenèse tumorale dans les pNETs	139
2.3	La détection des tumeurs endocrines du pancréas.....	139
3	<i>La bioconjugaison du dérivé du DFO et du Ramucirumab</i>	<i>140</i>
3.1	La réaction de couplage	140
3.2	Caractérisation du bioconjugué 27	141
4	<i>Les études de stabilités de la sonde immunoTEP 27</i>	<i>142</i>
4.1	Stabilité du ligand dans du plasma murin	142
4.2	Stabilité du bioconjugué face à la transchélation.....	142

4.2.1	Face à l'EDTA	142
4.2.2	Face au DFO.....	143
5	<i>Imagerie in vivo de 27 dans le modèle murin.....</i>	144
6	<i>Bibliographie.....</i>	146
	Conclusion générale et perspectives.....	147
	Partie expérimentale.....	149

Introduction générale

L'isotope Zirconium-89 est l'un des radiométaux émetteurs de positrons dont la popularité pour la tomographie par émission de positrons (TEP) ne cesse de croître. Une recherche dans la base de données PubMed a permis de trouver plus de 255 publications où le Zirconium-89 est mentionné dans le titre, dont 80% ont été publiées depuis 2017 inclus. La tomographie par émission de positrons avec des anticorps marqués au Zirconium-89 montre un grand potentiel d'imagerie des tumeurs cancéreuses. Elle peut fournir des informations importantes sur la pharmacocinétique et les propriétés de ciblage des tumeurs des anticorps monoclonaux et peut aider à anticiper la toxicité. Elle permet de planifier précisément les doses pour une radio-immunothérapie individualisée et la surveillance de la réponse précoce pour les thérapies ciblées. Le Zirconium-89 est un radionucléide idéal pour l'immunoTEP. L'énergie relativement faible du positon émis (Energie moyenne du β^+ = 396.9 keV) et la distance moyenne parcourue du β^+ de 1.18 mm donnent des images Zirconium-89 de haute résolution. Les caractéristiques sont proches de celles du Fluor-18 et du Cuivre-64 (Distance moyenne du β^+ = 0.60 et 0.70 mm, respectivement), autres radionucléides utilisés en TEP. La demi-vie de 78.4 heures du Zirconium-89 correspond parfaitement à la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux qui présentent généralement un rapport tumeur/sang optimal à environ trois jours après l'injection. Cela n'est pas le cas du Fluor-18 et du Cuivre-64. Un accélérateur à faible énergie de protons de type Cyclotron étant à disposition à Strasbourg au sein de l'équipe, la production maison de cet isotope a représenté une grande partie du travail de cette thèse. Nous avons utilisé les caractéristiques de notre cyclotron CYRCé qui est capable d'accélérer des protons jusqu'à 24 MeV. Une étude des différentes voies de production montre que la section efficace la plus élevée (la probabilité la plus grande) de produire le Zirconium-89 est obtenue avec des protons de 13 MeV. Cette réaction (p,n) a une section efficace de 800 mb et utilise l'Yttrium-89 comme matériaux cible. Un avantage de cette cible est qu'elle est monoisotopique ce qui fait que nous limitons le nombre de réactions parasites. Pour ces raisons, la réaction $^{nat}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ est la voie de réaction la plus courante pour la production de ^{89}Zr et celle que nous avons choisie.

Les innovations majeures apportées à cette voie de production, dans la première partie, peuvent se présenter de cette façon :

- Production de Zirconium-89 via réaction (p,n) d'Yttrium pulvérisé sur un support de Niobium
- Séparation et purification automatisées de cet isotope
- Production possible des deux formes du radiométal (oxalate et tétrachlorure)

Le chélateur, le plus couramment utilisé pour le Zirconium-89 est la Desferioxamine B (DFO). Des études précliniques ont montré que la DFO n'est pas le chélateur idéal car le complexe $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO})]$ est partiellement instable *in vivo*. La libération du Zirconium radioactif par le chélateur entraîne l'accumulation de la radioactivité dans les os. Cette accumulation osseuse interfère avec l'interprétation, la quantification précises de l'absorption osseuse sur les images TEP et provoque une irradiation du patient. Il est donc nécessaire de disposer de nouveaux chélateurs qui permettent une complexation plus stable du Zirconium-89. Néanmoins, aucun ligand du Zirconium-89 n'est optimal d'un point de vue chimique. Un radiotracer optimal pour l'immunoTEP doit remplir les critères ci-dessus :

- Non-toxique en vue d'une utilisation en clinique
- La pharmacocinétique de l'anticorps une fois couplé au ligand doit rester inchangée
- Le ligand ne doit pas libérer son radiotracer

Dans un second temps, mon travail a consisté à imaginer, optimiser et finalement réaliser la synthèse de dérivés du DFO. Ces dérivés doivent permettre d'augmenter la solubilité du complexe désiré en milieu aqueux, par exemple via le couplage du DFO avec un peptide. Cet agent chélatant doit présenter une forme bifonctionnalisée afin de pouvoir être conjugué à un anticorps monoclonal ou tout autre vecteur immunospécifique.

Une méthode de conjugaison photochimique simultanée (en une seule étape) et de radiomarquage d'un anticorps avec le Zirconium-89 est présentée.

Des études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées afin de prouver l'efficacité des dérivés du DFO que j'ai synthétisé ainsi que des études préliminaires *in vivo* d'un autre dérivé du DFO bien connu, le DFOCyclo*.

La dernière partie de cette thèse porte sur un projet pluridisciplinaire : ZRpNET en collaboration avec l'équipe de Jean Claude Chambron dans le cadre du défi ISOTOP, AAP2020 dans lequel les radiomarquages sont réalisés dans notre laboratoire. Pour cela, nous avons utilisé la molécule DFOCyclo*. L'anticorps utilisé est le CYRAMZA ou Ramucirumab qui est un anticorps monoclonal dirigé contre les cancers gastriques principalement. Le ligand fournit par l'équipe de Jean Claude Chambron possède une fonction isothiocyanate qui réagit sous condition basique avec une lysine.

Chapitre 1 : ImmunoTEP

1 Médecine personnalisée

1.1 Concepts

1.1.1 Introduction

La médecine, durant ces dernières années, a beaucoup progressé dans la prise en charge et le traitement des patients atteints de cancer. Le cancer est la seconde cause de mortalité chez l'Homme derrière les maladies cardio-vasculaires. Le mécanisme moléculaire entraînant l'apparition et l'expansion des cellules cancéreuses a donné de nombreuses recherches au cours de ces 30 dernières années autour de facteurs engendrant la multiplication de ces cellules. Par exemple, les avancées sur les récepteurs CD20 des lymphocytes B et sur la synthèse des anticorps monoclonaux ont permis de produire un traitement efficace contre les lymphomes à cellules de bas grade, approuvé par la FDA en 1997¹. Ceci n'est qu'un exemple de ce qu'ont permis des études biologiques lorsqu'elles sont mises en pratique en oncologie. Le but d'une médecine personnalisée est d'éviter aux patients d'être traités par une quantité de drogue pouvant lui être nocive car trop concentrée. On parle désormais de délivrer à un patient : le bon médicament, à la bonne dose et au bon moment. Pour une population de patients atteints d'une même pathologie, un traitement n'aura pas les mêmes effets chez tous. En effet, la classification des cancers ne se faisant couramment que par le tissu ou l'organe atteint, on ne s'intéresse donc pas à l'environnement biologique du tissu touché. Un même cancer n'ayant pas un même milieu de croissance, de production d'élément biologique vitale à sa propre survie, il est nécessaire pour l'oncologue de connaître « biologiquement » son patient. Après une imagerie dite « classique » permettant de diagnostiquer le lieu de la tumeur, il sera alors possible de pratiquer une biopsie permettant de connaître la pharmacologie environnant les cellules cancéreuses. Des analyses histochimiques, d'immunofluorescences et de cytométries de flux sont pratiquées de manière courantes dans tout laboratoires d'immunologie d'un hôpital. Il est alors possible de connaître le type de cellules impliquées, de trouver des marqueurs tumoraux (antigène tumoral) et oncogènes (facteur de croissance épidermique). Prenons l'exemple du cancer du sein, le clinicien va déterminer si la tumeur chez le patient surexprime le récepteur de croissance épidermique

humaine de type 2 (HER2). Si tel est le cas, un traitement à base de Trastuzumab augmentera les chances de guérison. Chaque traitement est validé par l'Agence européenne du Médicament (EMA) avec une méthode de diagnostic propre à chaque produit. Ce nouveau diagnostic dit moléculaire sera donc propre au patient et définira dès lors son traitement personnalisé, lié à son cancer. Nous nous intéresserons spécifiquement aux différents types de traitement utilisant des anticorps monoclonaux.

1.1.1.1 Historique des thérapies

Nous avons vu que les thérapies utilisant des complexes antigéniques sont devenues importantes au cours de ces 30 dernières années. Il est dès lors nécessaire de faire un bref historique et de comprendre comment nous sommes passés à ces traitements personnalisés. Le traitement en oncologie commença en 1930 par des agents alkylants qui ont fait leurs preuves contre les lymphomes, tel que la cyclophosphamide et la chloraminophene. Ces molécules ont pour rôle, après métabolisation dans les cellules cancéreuses, d'ajouter des groupements alkyles à l'ADN (**Figure 1**). Une fois l'ADN alkylé, sa réplication est alors compromise, ce qui empêche la multiplication cellulaire².

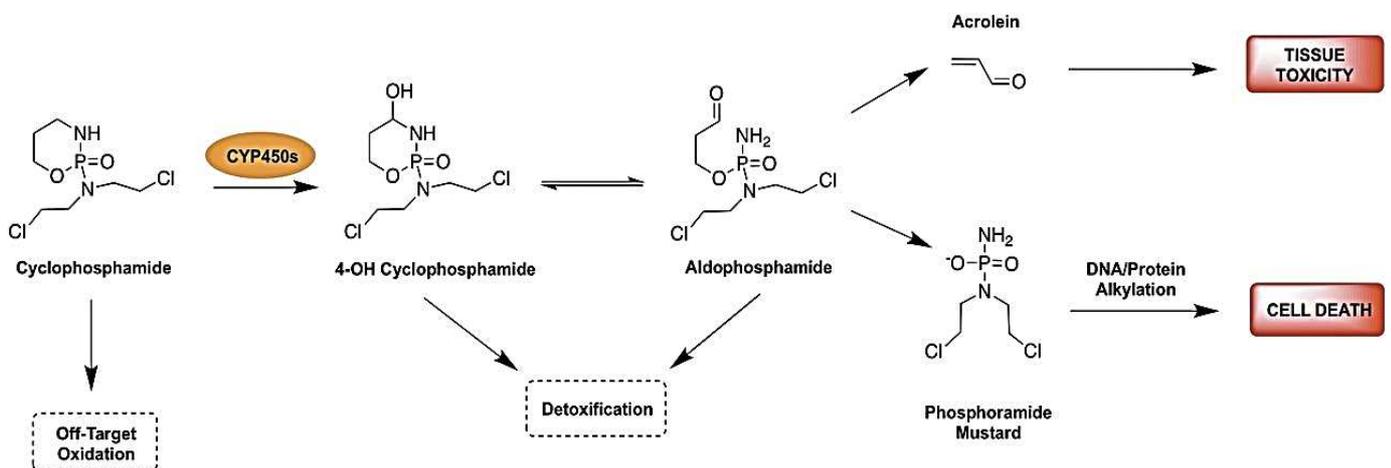


Figure 1 Schéma du métabolisme de la cyclophosphamide³

Dans un autre registre, la 5-fluorouracil (5-FU) développée en 1951 permet de contrer les cancers colorectaux, des ovaires, de l'estomac, du sein et est encore utilisée de nos jours. Dans les années 80, le cisplatine a connu son âge d'or notamment grâce à un traitement par combinaison du sulfate de bléomycine et du sulfate de vinblastine. Chacune de ces molécules

agissant à différentes phases du cycle cellulaire, cela a poussé la communauté scientifique à comprendre les changements moléculaires des cellules cancéreuses. De plus, les effets secondaires de ces traitements (notamment au niveau cardiovasculaire) ont lancé le développement de la thérapie via liposome. Le liposome ou vésicule à bicouche lipidique permet d'encapsuler les drogues, limitant ainsi les effets indésirables sur les cellules saines. La chimiothérapie adjuvante et/ou néoadjuvante permettrait de réduire la taille des cellules cancéreuses et de prévenir les métastases. Les méthodes listées ainsi que les méthodes chirurgicales jusque-là énumérées ont permis de diminuer drastiquement la mortalité associée aux différents cancers. Nous allons désormais nous pencher sur une méthode émergente qui se base sur les différentes défenses du système immunitaires des mammifères.

1.1.2 Immunothérapie

1.1.2.1 Principes

L'immunothérapie ou thérapie aux anticorps est devenu au cours de ces 15 dernières années la thérapie de pointe et est aujourd'hui une stratégie de choix face aux tumeurs solides et malignes. Cette thérapie se base sur l'utilisation du système immunitaire inné des mammifères en stimulant et en ciblant les cellules cancéreuses comme corps antigéniques. Par méthode immunohistochimique, la comparaison de l'expression d'une poignée d'antigènes connus de tissus normaux ainsi que plus de 200 types de tumeurs a permis de déterminer par exemple l'expression de CD90 (nommé Thy-1). Le récepteur de nécrose tumorale était bien supérieur dans les sarcomes, les carcinomes des ovaires et neuroendocrine ainsi que dans les deux types de lymphomes (Hodgkin et Non-Hodgkin). Cette étude a été rendue possible grâce à l'utilisation d'anticorps. En 1975, Georges Köhler et César Milstein ont réussi à produire un hybridome en réalisant des fusions de lignées de cellules de myélome avec des cellules B⁵. Les hybridomes permettent de produire des agents spécifiques à un seul antigène connu ou inconnu, ce sont les anticorps monoclonaux (AcM). Cette prouesse technologie d'hybridome et l'émergence des cellules activées par fluorescence ont permis l'investigation des différentes altérations des récepteurs membranaires. Ainsi, lorsque ces récepteurs sont connus, il est possible de les activer via un rôle d'agoniste ou d'antagoniste, de moduler le système immunitaire ou de délivrer spécifiquement une drogue.

1.1.2.2 Les anticorps

Un anticorps peut être divisé en deux parties fonctionnelles bien distinctes : le fragment qui se liera à l'antigène, le Fab, et le fragment constant, le Fc. Dans les années 80, les anticorps étaient intégralement d'origine murin, mais cela les rendait immunogènes lorsque injectés chez l'homme. Du fait de ce problème naquit une nouvelle voie thérapeutique dans les années 90, en passant par une forme chimérique par fusion d'un Fc murin et d'un Fab humain⁶. Finalement, les anticorps sont devenus humanisés, c'est-à-dire que le Fc humain et le Fab sont humain à 90-95% (résumé en **Figure 2**)⁷.

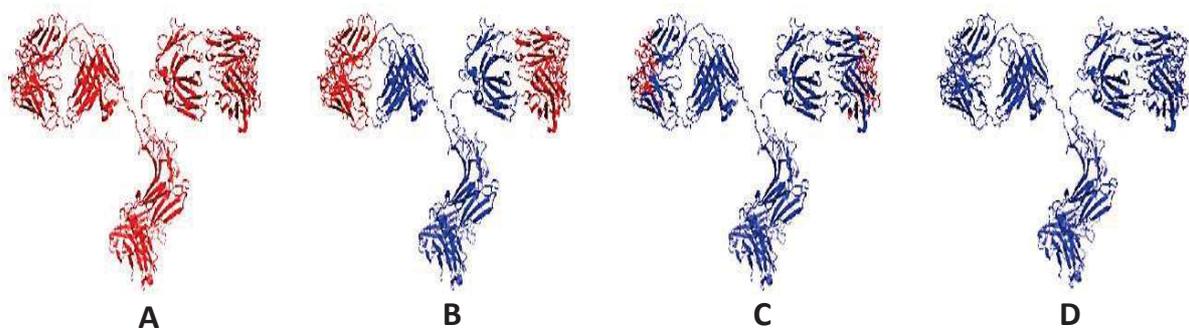


Figure 2 Evolution des anticorps monoclonaux de murin (-omab) (A), chimérique (-iximab) (B), humanisé (-zumab) (C) à entièrement humain (-umab) (D) en rouge la séquence amino acide murin et en bleu la séquence amino acide humain (image tirée de la Review dans *Antibodies*, 2020, 9, 2)

Ce sont les anticorps humanisés qui sont majoritairement approuvés aujourd'hui par la FDA aux USA ou l'ANSM en France. Plus récemment, des anticorps sont devenus entièrement humain, Fc et Fab (75-80 kDa) étant humain à 100%⁸. On peut aussi retrouver des fragments résultants d'anticorps (résumé en **Figure 3**) recombinant comme les Fv (fragments variables de l'anticorps), les scFv (30 kDa, les fragments variables à chaîne simple), les Fab (les fragments de l'anticorps se liant à l'antigène) et on peut aussi noter les nanobodys (>10kDa, minibodies, polypeptides synthétisés) dont la structure se rapproche du domaine IgV (domaine variable d'un anticorps).

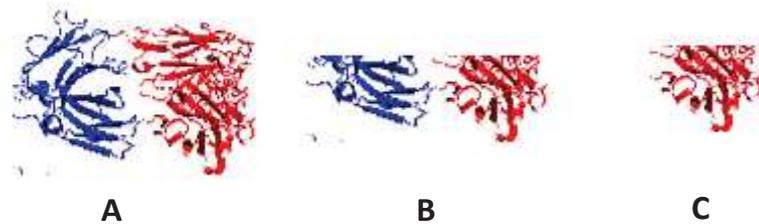


Figure 3 Structure basée sur le AcM chimérique dont on retrouve le Fab (A), le scFv (B) et le nanobody (C) (image modifiée de la Review dans *Antibodies*, 2020, 9, 2)

1.1.2.3 Antigènes : cibles des anticorps

Historiquement, le premier anticorps approuvé par la FDA était le Muromonab CD3⁹ et plus récemment la Basiliximab, qui avait pour but d'éviter tout problème de rejet après une transplantation rénale. Depuis les années 90 et jusqu'à aujourd'hui, la FDA a approuvé une soixantaine d'anticorps thérapeutiques¹⁰. Sur cette longue liste, nous nous intéressons essentiellement aux anticorps ciblant les tumeurs. Nous avons vu que ces anticorps sont hautement sélectifs et ils ont permis de cibler les cytokines, que ce soit les TNF α ou les interleukines (IL-17, IL-17A, IL-1), responsables de maladies auto-immunes tels que les plaques psoriasis, les maladies de Crohn, la polyarthrite rhumatoïde, etc. (*FDA Data*, <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf>). Dans la famille des récepteurs du ligand qui induit l'apoptose on peut cibler TRAIL-R1 (ou TNFRSF10A), TRAIL-R2 (ou TNFRSF10B) et le récepteur activateur du ligand du facteur nucléaire- κ B, RANKL (ou TNFSF11). Il est notamment possible depuis 1994 de traiter via cette liste des angines instables. Pour ce qui est des maladies du sang, il en existe désormais 4 qui ont été approuvés et qui sont prescrits lors de traitements. Les interleukines jouant un rôle prépondérant dans les allergies, des patients sont déjà traitées par AcM pour des cas d'asthme et de dermatite atopique¹¹.

Tableau 1 Type d'anticorps et cibles associées décrivant les potentiels utilisations cliniques de ces derniers. (Tableau tiré de Scott A. M., et al. *Nature Review*, 2012, 12, 278-287)

Antibody constructs	Examples of targets	Potential clinical use
scFv	CC49, ERBB2 and Le ^y	Imaging and cell targeting
Diabody	Le ^y and TAG-72	Imaging and drug delivery
Affibody	ERBB2	Imaging and drug delivery
Minibody	CEA and ERBB2	Imaging and drug delivery
Protein-Fc	Angiopoietin 1, angiopoietin 2, VEGFR1 and VEGFR2	Imaging and therapy
Intact IgG	CD20, CD33, EGFR, ERBB2 and VEGF	Imaging therapy and drug delivery
IgE and IgM	GM2	Therapy
Drug conjugates	CD30, CD33 and ERBB2	Therapy
Loaded nanoparticles	A33, EGFR and transferrin	Drug delivery
Bispecifics	CD19-CD3, EPCAM-CD3 and gp100-CD3	Therapy

Concernant les antigènes cibles des anticorps monoclonaux, nous allons désormais en établir une liste non exhaustive¹². Par souci de clarté, les gènes associés aux protéines sont indiqués entre parenthèses. Les antigènes type glycoprotéine de différenciation hématopoïétique font partie des groupes de différenciation, noté CD dont les CD20, CD30, CD33 et CD52. Les antigènes qui sont impliqués dans la croissance et la signalisation de la différenciation sont les récepteurs du facteur de croissance épidermique EGFR (ou ERBB1), HGFR (ou MET), HER2 (ou ERBB2), ERBB3, le récepteur du facteur de croissance de type insuline 1 (IGF1R) et le récepteur de l'éphrine A3 (EPHA3). Il est possible aussi de stopper l'angiogénèse des cellules en bloquant les récepteurs induisant la prolifération des cellules cancéreuses. Ces antigènes sont généralement des protéines ou des facteurs de croissance qui favorisent la formation de nouvelles micro-vascularisations sanguines, qui représentent une grande partie de la masse cancéreuse (de 20 à 90% suivant l'organe touché) et présentent-eux aussi des antigènes spécifiques via le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), le récepteur du VEGF (VEGFR), l'intégrine $\alpha V\beta 3$ et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Le stroma tumoral et la matrice extracellulaire sont des structures de soutien indispensables pour une tumeur qui demande l'activation de fibroblastes (FAP) et de la ténascine. Avec l'entrée en phase clinique du Sibrotuzumab en 2003, l'équipe de Scott A. M. *et al.*¹³ s'est intéressée à la glycoprotéine F19 qui est la cible de cet anticorps. Nous pouvons aussi cibler les marqueurs tumoraux des vaisseaux sanguins comme le TEM1 qui a un rôle majeur dans le développement de ces cellules. Cette protéine de surface des cellules sert à l'adhésion, la migration et la progression tumorale. C'est un antigène de choix pour la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques¹⁴.

1.1.2.4 Mécanisme de la mort des cellules cancéreuses

Nous avons vu les différentes cibles que la biologie cellulaire a permis de comprendre et leurs intérêts thérapeutiques à être ciblées, nous allons désormais voir par l'intermédiaire de plusieurs exemples les modes d'actions de ces anticorps. Pour cela nous prendrons trois anticorps déjà validés par la FDA, le rituximab (RITUXAN® approuvé en 1997), l'ipilimumab (YERVOY® approuvé en 2011) et le trastuzumab (HERCEPTIN® approuvé en 1998). Dans le cas du rituximab, un anticorps ciblant l'antigène transmembranaire CD20, le mécanisme de mort cellulaire n'est pas clairement défini comme étant unique¹⁵. En effet, par interaction avec le CD20, le complexe AcM-CD20 entraîne la lyse de la cellule par perturbation de sa membrane donc la mort cellulaire. C'est la cytotoxicité dépendant du complément, CDC ou CMC, pour *complement-dependant-cytotoxicity* en anglais. Ce même complexe pourrait activer la reconnaissance des cellules NK de l'hôte par le Fc du rituximab. Par un mécanisme connu en immunologie, les macrophages vont alors intervenir et par phagocytose détruire les cellules cancéreuses. Cette voie est appelée cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps, ADCC, pour *Antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity* en anglais. L'ipilimumab, anticorps entièrement humain, cible l'antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique (CTLA-4) qui régule l'activation de lymphocyte T (T-cell). Ainsi en empêchant la régulation des leucocytes, la réponse immunitaire de l'hôte face à la tumeur est réactivée¹⁶. Pour finir, le trastuzumab est un AcM humanisé ciblant le récepteur HER2 discuté précédemment. Ce récepteur se trouve dans 20 à 30% des carcinomes du cancer du sein précoce et métastatique. Pour résumer, lorsque les récepteurs de la famille HER (HER1, 3 et 4) sont activés par leurs ligands respectifs et spécifiques, ils formeront un dimère avec le HER2. Ce dimère entraîne la phosphorylation des tyrosines kinases intra-cellulaire de ces nouveaux complexes entraînant la prolifération, la durabilité et la mobilité des cellules par transcription du VEGF. En ciblant le monomère unique de ces dimères, le trastuzumab entraîne l'inhibition de la dimérisation. Pour la mort cellulaire, le mécanisme n'est pas encore très clair, néanmoins on pourrait supposer que l'inhibition entrainerait l'annulation du recrutement des facteurs de croissances épidermiques humain et bloquerait la production de VEGF¹⁷. Le trastuzumab étant humanisé, le Fc permettrait d'entraîner le mécanisme ADCC vu précédemment. Les méthodes d'actions sont plus ou moins connues et ne peuvent être décrites de manière unique. Cette théorie demanderait des études d'actions plus poussées mais elle peut être résumée dans la **Figure 4**

pour l'effet tumoricide des anticorps monoclonaux. L'effet tumoricide peut être accru par l'utilisation d'approches combinatoires différentes : les agents thérapeutiques (via chimiothérapie ou thérapie ciblée), la radiothérapie, etc.

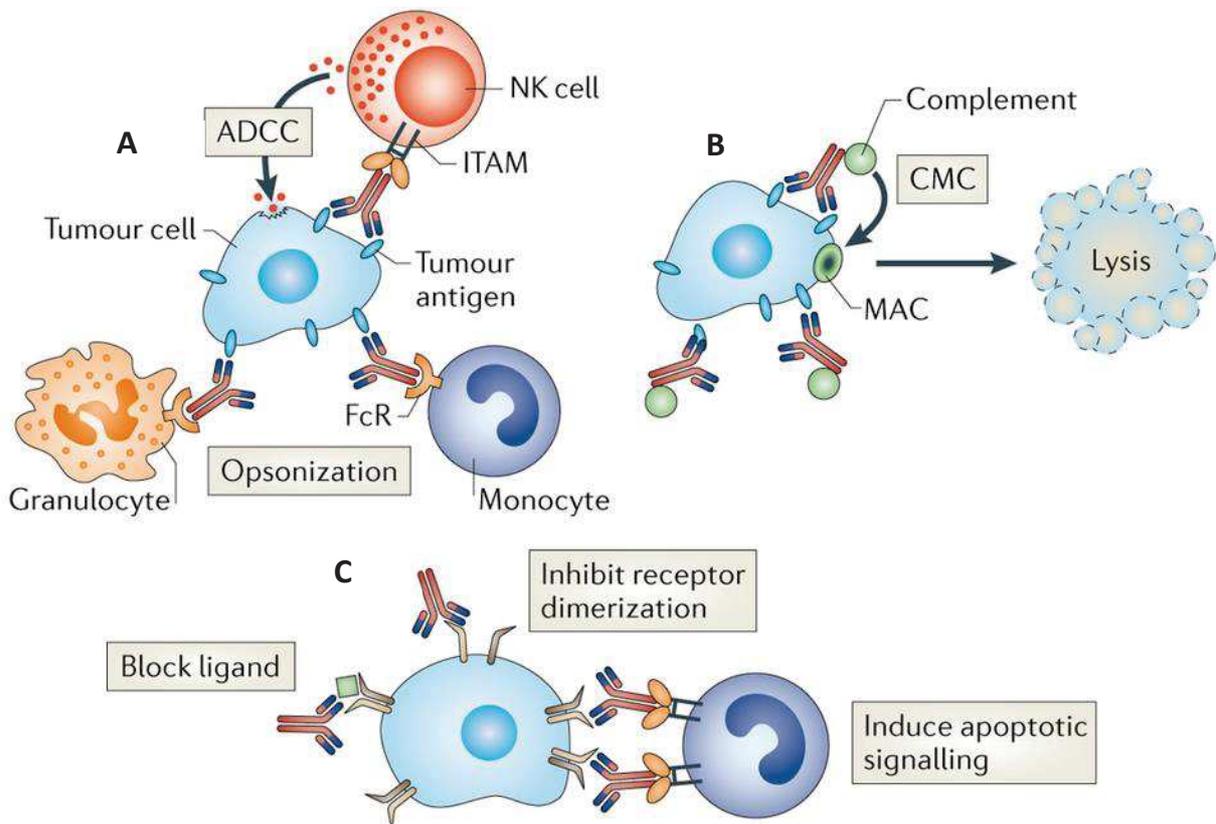


Figure 4 Les différents modes d'actions des anticorps monoclonaux : par recrutement des leucocytes de l'hôte (A) ; par recrutement de complément indépendant entraînant la lyse de la cellule ou CMC (B) et les champs d'actions du Trastuzumab en (C) avec entre autres l'inhibition de la dimérisation HER2/HER1,3,4 spécifique à cet AcM. (Image modifiée de Weiner, G.J., Nat. Rev. Cancer, 2015, 15, 361-370)

1.1.3 Conclusion

Comme nous avons pu le voir, l'anticorps monoclonal est un excellent outil pour cibler les cellules tumorales. Dès les années 80, il fut imaginé que ces AcMs pouvaient servir de vecteur de transport de drogues chez l'animal. Lorsqu'un anticorps est lié à une drogue on parle alors d'anticorps conjugué à un médicament (*ADC pour Antibody-drug-conjugates en anglais*). Cette conjugaison de drogue ou tête de pont cytotoxique (*cytotoxic warhead en anglais dans la littérature*) et d'anticorps est composé de trois parties : l'anticorps qui est hautement spécifique (souvent un AcM ayant déjà été approuvé par la FDA ou l'EMA ciblant un certain

type de tumeur) la molécule cytotoxique est utilisée en chimiothérapie ou en thérapie ciblée et est liée à l'anticorps via un lien nommé *linker*. L'anticorps peut transporter plus d'une molécule comme résumé sur la **Figure 5**.

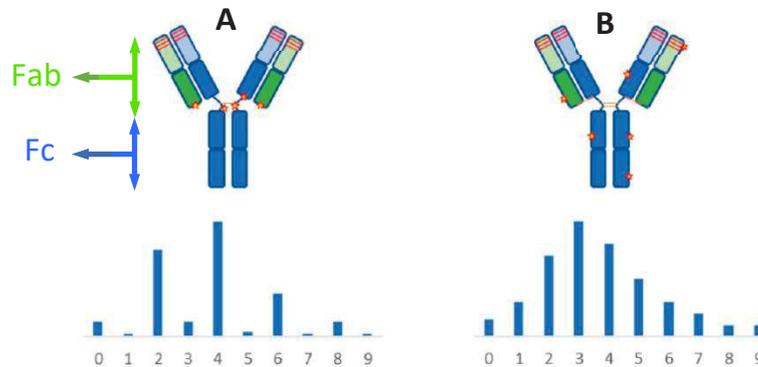


Figure 5 Lieu de réaction permettant d'obtenir des liaisons covalentes entre les cystéines réactives (A), les lysines (B) et les molécules thérapeutiques. Pour chaque méthode, le ratio AcM/médicament présent sur chaque anticorps. (De Leung, D. et al., *Antibodies*, 2020, 9, 2)

Le premier ADC approuvé par la FDA est le gemtuzumab-ozogamincin (Wyeth) en 2000. La stratégie utilisée débute par la sélection de l'anticorps de référence pour un certain cancer, si nous prenons le cas du cancer du sein HER2 positif, l'anticorps utilisé sera le trastuzumab. Nous avons vu précédemment que cet AcM pouvait être internalisé dans la cellule. Une drogue cytotoxique liée à cet anticorps se trouverait alors directement dans le cytoplasme et pourrait perturber l'activité normal de l'ADN de cette cellule et ainsi, *in fine* la tuer. Ce principe bien que très simple demande une connaissance parfaite de la tumeur, de l'anticorps et du lieu de conjugaison de la molécule tumoricide. Ce problème de conjugaison peut diminuer l'affinité d'un anticorps¹⁹ surtout au niveau du linker qui est conjugué à sa partie Fab²⁰. Concernant la manière de conjuguer la molécule et le AcM, les ADCs de première génération utilisent des linkers clivables de type hydrazone réagissant avec n'importe quelle lysine de l'AcM. Ce type de linker peut se cliver à tout moment lorsque mis en circulation dans les vaisseaux sanguins. De plus, l'effet CDC discuté précédemment est fortement réduit, l'intérêt d'utiliser des anticorps a été longuement discuté. Une seconde génération d'ADC a vu le jour afin d'éviter tout relargage pouvant être cytotoxique pour le patient. Des linkers non clivables (type thioether) et des linkers clivables via protéase ont été imaginés (liste des linkers en **Figure 6**) augmentant ainsi l'effet CDC des AcMs. Une dernière génération, plus contrôlée que la précédente, a permis par ingénierie biochimique de changer la chaîne peptidique du Fc en

incorporant des cystéines²¹. Ces thiols ont pour rôle de contrôler la conjugaison des drogues à des lieux définis, en nombre défini et par chimie définie : linker pouvant être clivé par enzymes pour les cas de dipeptides, pont disulfure ou par conjugaison par addition de Michael de maléimide.

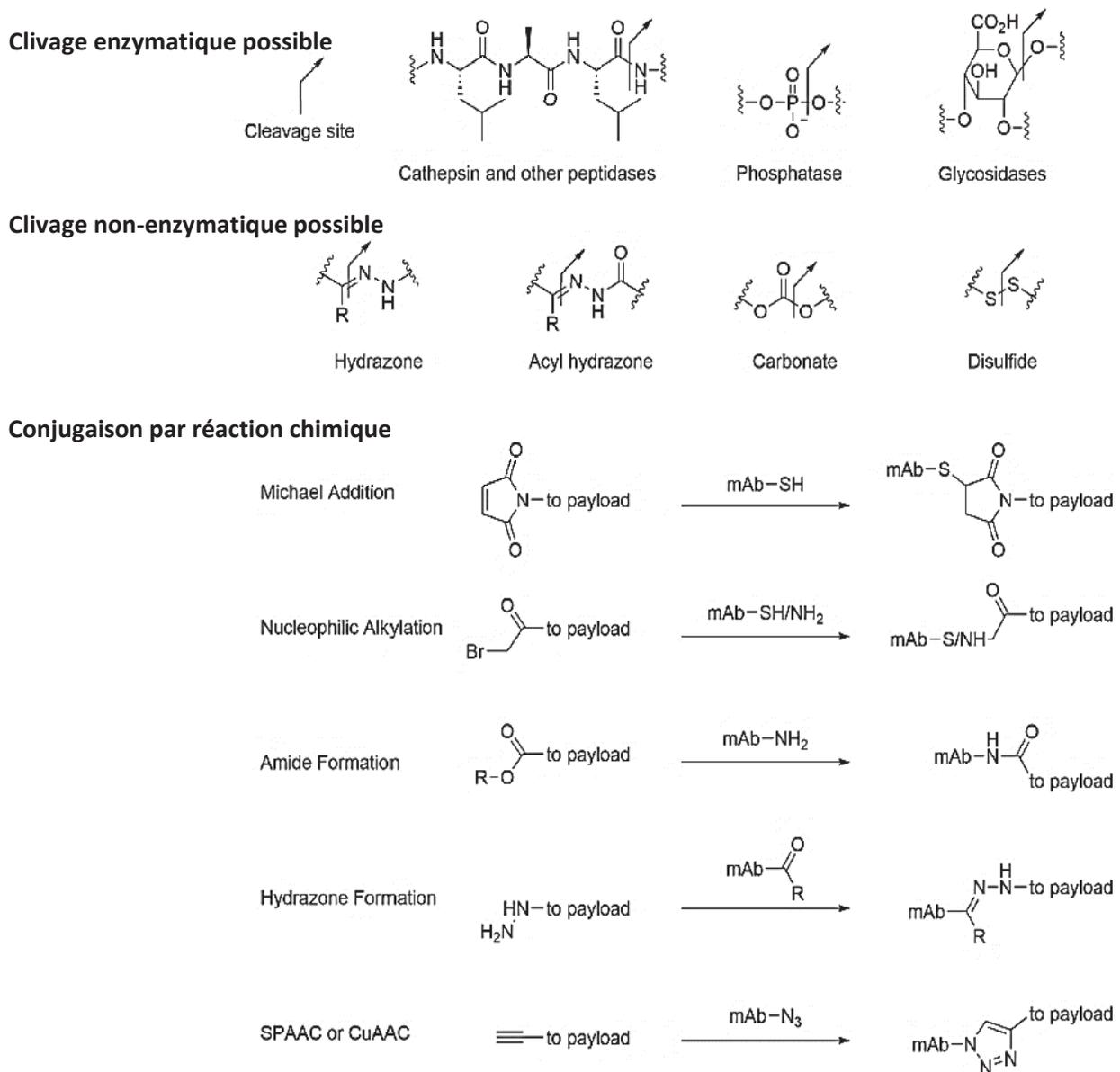


Figure 6 Listes des méthodes de bifonctionnalisation et les réactions chimiques de conjugaison associées et les clivages possibles. Payload étant la drogue ou une autre molécule pouvant être transportée. (De Antibodies, 2020, 9 ,2)

2 L'imagerie moléculaire : une technologie au service de la clinique

Nous avons vu jusqu'à présent, la complexité d'utilisation et le caractère vectoriel des anticorps monoclonaux. Toujours dans un souci de médecine personnalisée, visualiser pour chaque patient la progression des tumeurs est un excellent moyen de savoir s'il faut continuer le traitement, augmenter le traitement ou si c'est le bon moment de traiter le patient. Pour cela, les anticorps peuvent être d'excellentes plateformes théranostiques c'est-à-dire utilisés pour du diagnostic ou du traitement tumoricide. Nous allons maintenant aborder les aspects d'imagerie utilisés pour le diagnostic du cancer en commençant par un historique dont le résumé est présenté sur la **Figure 7**.

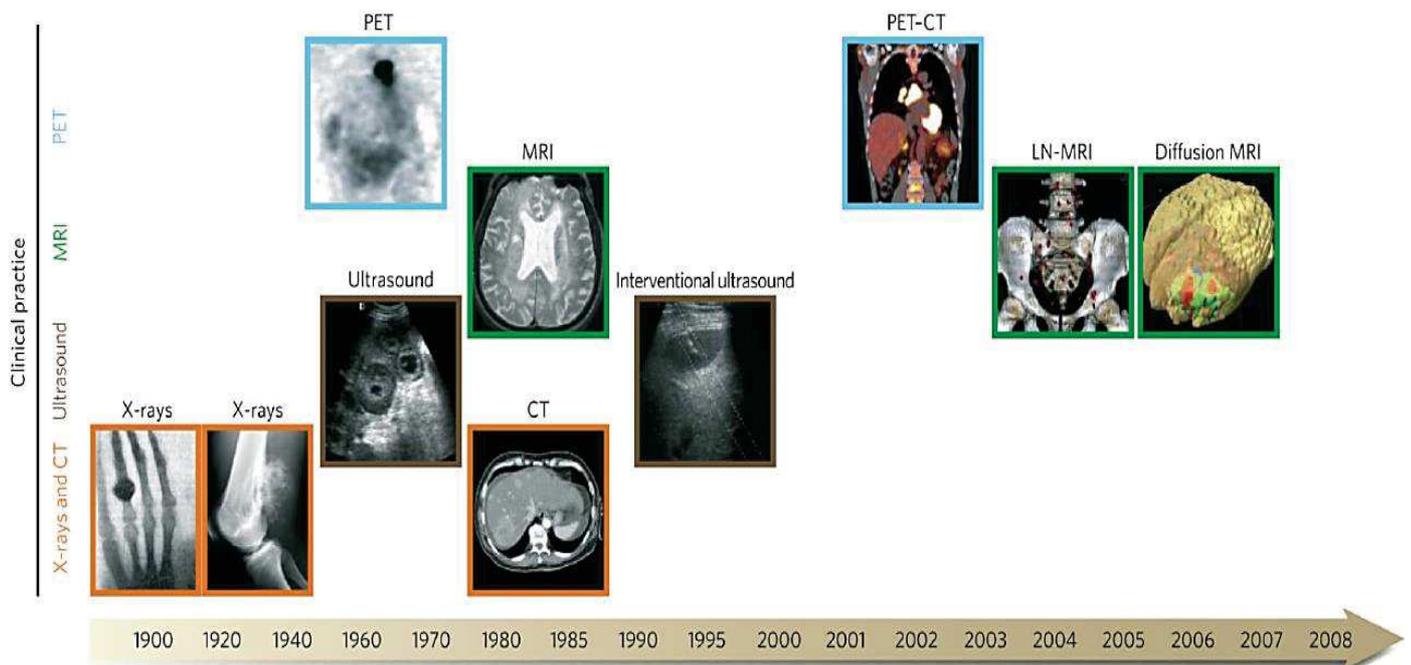


Figure 7 Exemple d'imagerie d'os pour les rayons X, du cerveau pour l'IRM, du tronc humain en CT-Scan, cancer du sein visualisé par TEP et de tissus mous par ultrasons.

Comprendre et visualiser ce qu'il se passe dans le corps humain sans intervenir chirurgicalement est devenu indispensable pour les essais cliniques et les pratiques médicales. De nos jours, la variété des systèmes d'imagerie permet au praticien de choisir en fonction du patient et de sa pathologie la technique la mieux adaptée. On peut obtenir des informations uniquement morphologiques grâce aux rayons X, aux ondes sonores et à la résonance magnétique nucléaire. L'outil se nomme alors radiographie conventionnel ou

tomodensitométrie (CT-scan pour *Computed Tomography scan* en anglais) et échographie respectivement. Toutes ces informations rendront le diagnostic toujours unique et propre à chaque patient. Prenons le cas de l'IRM, malgré une répétition possible des examens d'un patient via IRM il existe un manque d'évaluation direct de la densité des tissus. Il est particulièrement difficile de distinguer directement les os et les poumons. Les études pour améliorer cette cartographie n'ont pas encore été approuvées par la FDA²².

Pour une information fonctionnelle, on utilisera l'imagerie nucléaire ou moléculaire. L'imagerie moléculaire est la « *visualisation, la caractérisation et la mesure de processus biologiques aux niveaux moléculaire et cellulaire chez l'homme ou dans un autre organisme vivant. Les agents d'imagerie moléculaire sont des sondes utilisées pour visualiser, caractériser et mesurer les processus biologiques dans les systèmes vivants.* », définition donnée par la Société de Médecine Nucléaire et d'Imagerie Moléculaire, la SNMMI, ou *Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* en anglais ("About Nuclear Medicine & Molecular Imaging." SNMMI, www.snmmi.org/AboutSNMMI/Content.aspx?ItemNumber=6433). Deux techniques coexistent : la tomographie par émission monophotonique (TEMP) et la tomographie par émission de positons (TEP). Ces technologies permettent de quantifier l'information physiologique, avec haute résolution et un signal élevé par rapport aux tissus sains de l'organisme. Afin d'aider au mieux au diagnostic, les imageries nucléaires sont souvent faites en parallèle d'imagerie CT ou IRM, on parle alors de TEP/TDM ou TEMP/TDM et de TEP/IRM.

2.1.1 L'imagerie nucléaire en oncologie

L'imagerie nucléaire est une méthode permettant un diagnostic non invasif. Ce choix est déterminé par l'utilisation de traceur/vecteur biologique radiomarqué. Par radiomarquage, on sous-entend l'utilisation d'un isotope radioactif que l'on choisit en fonction de son type d'émission, sa durée de vie et de sa chimie. Cet isotope radioactif est préalablement produit par réaction physique, puis complexée à une molécule vectrice qui sera injectée à une souris pour des tests pré-cliniques, ou chez l'homme en clinique. L'accumulation de radioactivité va donner un signal permettant de visualiser la cible, souvent des tumeurs. Cette accumulation n'est pas automatique, c'est parce que l'on choisit des vecteurs spécifiques qu'elle advient. Tout isotope ne peut donner une image nucléaire, c'est pourquoi on classe l'imagerie

nucléaire en deux catégories : la TEMP qui exploite les isotopes émetteurs de photons (γ) ou la TEP pour les isotopes émetteurs de positons (β^+).

2.1.1.1 L'imagerie TEMP

L'imagerie médicale par émission monophotonique utilise des γ d'énergie entre 100 et 300 keV émis par les radionucléides lors de leur décroissance. Pour identifier la direction d'arrivée des photons, on utilise des collimateurs. Les radionucléides utilisés sont le Technetium-99m, l'Iode-125, l'Indium-111 pour ne citer qu'eux. Le technetium-99m (^{99m}Tc , γ (89%) 141 keV, $T_{1/2} = 6$ h) est le plus présent en clinique. Il est disponible sous forme de générateur Molybdène/Technetium que l'on peut utiliser pendant une semaine avec une élution quotidienne. Cela offre un vrai avantage dans l'organisation des services. Sa demi-vie intéressante en fait un candidat de choix pour des études rapides et peu coûteuses. Pour radiomarquer des anticorps pour du TEMP, il est préférable d'utiliser l'indium-111 dont la période radioactive est plus longue et qui décroît par capture électronique. Lors de cette décroissance, il arrive sur un état excité de son fils le Cd-111. Il émet alors dans 90% des cas un photon de 171 keV et dans 94% des cas un photon de 245 keV. Si on reprend l'exemple du Trastuzumab, il existe actuellement une étude clinique dans laquelle il est conjugué avec de l'In-111 via le chélatant DTPA (acide diéthylène triamine pentaacétique)²⁴. Ce ligand est conjugué au vecteur biologique, ici l'anticorps, par conjugaison chimique impliquant une fonction *p*-isothiocyanatobenzyl réagissant avec une amine libre de l'AcM (**Figure 8**). L'anticorps possédant alors des fonctions chimiques chélatantes, il est possible après réaction avec du $^{111}\text{InCl}_3$ de radiomarquer l'ensemble, formant la sonde d'imagerie nucléaire. Les images à trois jours post-injection permettent de visualiser de nouvelles lésions tumorales chez la majorité des patients testés. De plus, cet outil permet par adéquation du temps de demi-vie de circulation d'un anticorps de visualiser les effets sur le patient du début d'une injection jusqu'à métabolisation complète de l'AcM.

Pour conclure, l'imagerie TEMP est une bonne méthode de diagnostic. Cependant, dues aux limitations physiques des collimateurs du détecteur, on utilise qu'un photon sur 100 ce qui la rend moins sensible que le TEP.

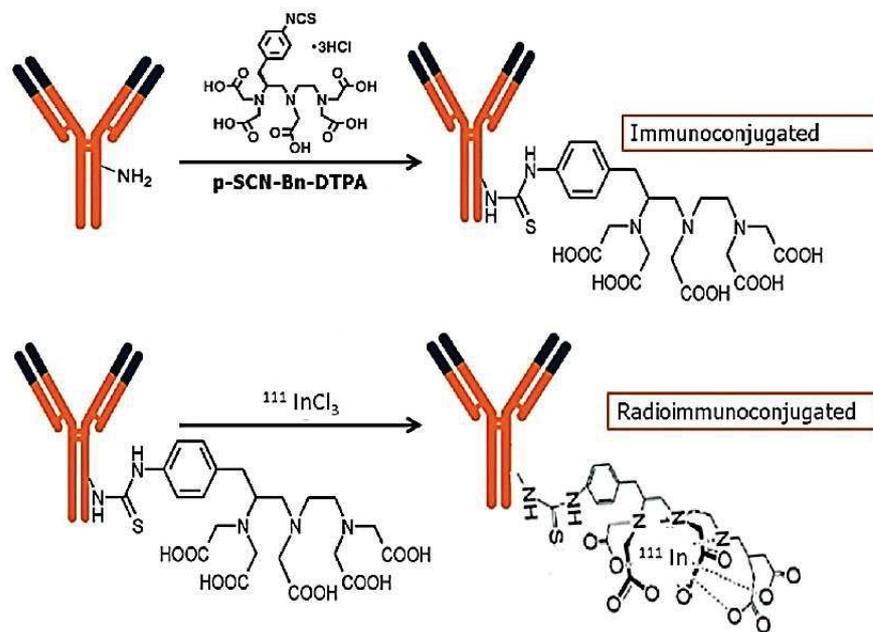


Figure 8 Formation de l'anticorps conjugué au ligand puis radiomarquage pour donner le radioimmunokonjugué correspondant²³.

2.1.1.2 L'imagerie PET

2.1.1.2.1 Vue d'ensemble

En tomographie par émission de positons (TEP), on utilise des radionucléides émetteurs de positons (émetteurs β^+). Le positon est l'antiparticule de l'électron. Une fois émis, il va s'annihiler avec un électron du milieu après avoir été ralenti dans la matière (le patient). Cette annihilation donne naissance à 2 photons de 511 keV qui vont partir à 180° l'un de l'autre (**Figure 9**)²⁴.

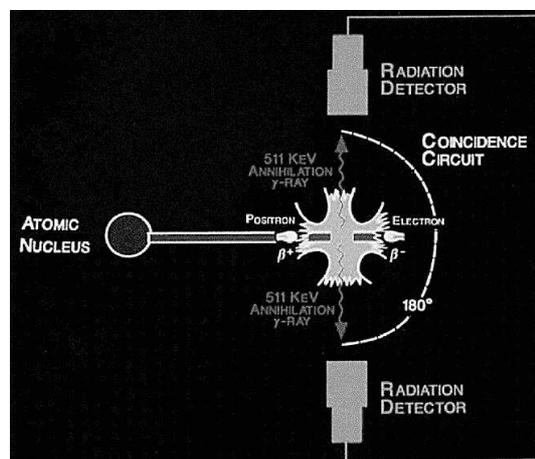


Figure 9 Schéma simplifié d'une désintégration d'un émetteur β^+ et de la réaction d'annihilation résultante.

Pour faire de l'imagerie TEP, on va tirer parti de cette émission corrélée de 2 photons d'énergie connue et colinéaires. Pour cela, on place une couronne de détecteurs autour du patient qui aura pour fonction de mesurer les photons et de faire des coïncidences temporelles²⁶ pour reconstituer les paires. Il faut cependant faire attention car il existe plusieurs types d'évènements qui ne sont pas liés à la désintégration d'un positon mais dont la signature dans la couronne de détecteur est la même (**Figure 10**)²⁵. Il y a donc un traitement numérique des données à faire afin de corriger les images de ces effets. Ce champ de recherche est toujours très actif.

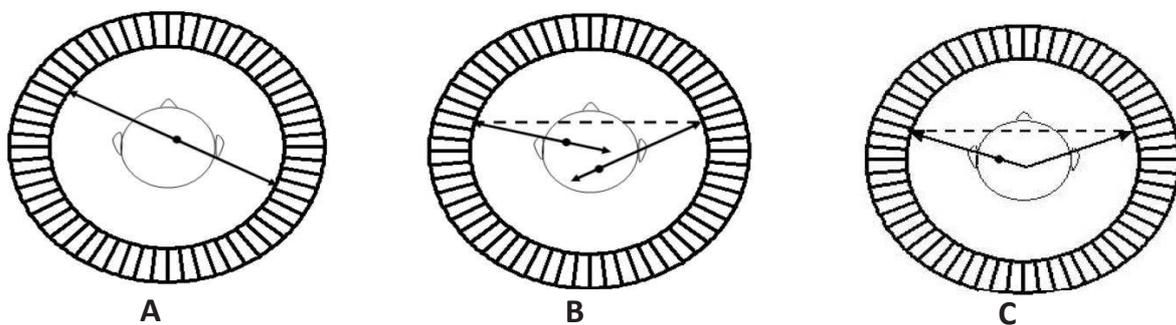


Figure 10 Les évènements générés par deux photons après annihilation, l'évènement physique réel (A), les évènements accidentels ou aléatoires (B) ainsi que le positionnement erroné dû à l'interaction de Compton d'un des photons (C) (Image de Kumar. U. et al. J. Med. Phys., 2006, 31, 13-21)

2.1.1.3 Les limitations du TEP

Les limitations du scanner TEP sont la résolution spatiale qui dépend des scintillateurs composant le module de détection et la distance parcourue par le positon entre son émission et son annihilation. Pour les producteurs de scanner TEP, il est clairement établi que la précision de la résolution spatiale est régie par la taille de chaque détecteur, individuellement. La distance parcourue est énergie dépendante, la particule élémentaire doit parcourir une certaine distance avant de perdre suffisamment d'énergie et d'établir la réaction d'annihilation, cette distance est appelée portée des positons (*Positron Range* en anglais). Les caractéristiques des bêtas+ émis par un radionucléide sont caractéristiques de ce dernier. Chaque radionucléide aura donc une portée des bêtas+ différente et donc un impact sur l'image différent. Plus l'énergie des bêtas+ est importante, plus la portée sera importante et plus l'impact sera fort sur l'image.

Les émetteurs les plus utilisés en imagerie TEP et leur caractéristiques physiques sont présentées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 Liste non exhaustive des radionucléides utilisés en imagerie TEP. La demi-vie, l'énergie max et moyen (mean) ainsi que le taux d'embranchement (BR) des bêtas+ émis γ sont figurés. Les photons (gamma) émis lors de la décroissance du noyau sont figurés avec leurs énergies propres. Enfin, la distance parcourue max et moyen pour chaque positon est représentée.

	Half-life	β^+ Emission (MeV)			γ + Emission (keV)		Positron range (mm)	
	(h)	Max.	Mean	BR (%)	Photon	I (%)	Max.	Mean
F-18	1.83	0.63	0.25	96.7	511	193	2.1	0.6
Cu-64	12.7	0.65	0.28	17.6	511 1350	35 0.6	2.2	0.7
Ga-68	1.03	1.90	0.84	87.7	511	178	8.4	3.1
Zr-89	78.4	0.90	0.39	22.7	511 909	45 99	3.4	1.1
I-124	100.2	2.14	0.97	10.7	511	23	10.0	4.4
		1.53	0.69	11.7	602 722 1699	60 10 11	7.1	2.8

La distance parcourue par les positons est définie par une règle physique dépendant de la densité du milieu²⁸:

$$R_{\max} \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^2} \right] = \begin{cases} 0.412E_{\beta}^{1.265-0.0954 \ln(E_{\beta})} & 0.01 \leq E_{\beta} \leq 2.5 \text{ MeV} \\ 0.530E_{\beta} - 0.106 & E_{\beta} > 2.5 \text{ MeV} \end{cases}$$

Cette loi montre que l'énergie du bêta (quel que soit sa charge) a une influence sur la portée des positons. L'équipe de Michael E. Phelps²⁶ a démontré l'impact que ces énergies pouvaient avoir sur l'image en disposant des radionucléides, tels que le Cuivre-64 ou le Fluor-18, dans un milieu équivalent à des tissus (principalement de l'eau).

2.1.2 Conclusion

En résumé, pour le Fluor-18, radionucléide le plus utilisé en imagerie médicale TEP : il émet un positon d'énergie max de 0,63 Mégaélectronvolt (MeV) et son parcours dans un tissu se trouve être dans une gamme de 2 à 3 mm. Cette plage de parcours décidera du degré d'erreur sur la localisation spatiale. Typiquement on considère que l'erreur entre l'image observée et

la réalité est de 0,6 mm. Pour conclure, la détection des coïncidences dans le scanner TEP permet de mesurer quantitativement des paramètres physiologiques comme le débit sanguin, le métabolisme et la densité des récepteurs ciblés dans le cas de conjugaison d'un radionucléide avec un anticorps ou un médicament. Le comptage d'événement après correction d'atténuation grâce au couplage TEP et CT-scan permet de connaître la concentration absolue en radiotraceur.

3 Différents isotopes radioactifs utilisés

3.1.1 Généralités

L'ImmunoTEP ou anticorps radiomarqué résulte de la fusion de disciplines telles que la biologie cellulaire et moléculaire, la pharmacologie, la physique nucléaire et médicale, la médecine, la chimie, l'informatique et la bio-informatique. L'immunothérapie combinée à l'imagerie tomographique mêle tout ce qu'on a vu jusqu'à présent au service du diagnostic en oncologie. Néanmoins, ces études ne peuvent se faire sans radionucléide. Pour produire un isotope radioactif, il est nécessaire d'utiliser des réactions nucléaires comme la fission, pour produire des neutrons dans un réacteur nucléaire ou une réaction dite de transmutation via un faisceau de protons accéléré dans un cyclotron. Pour produire des émetteurs de positons, noyaux qui sont riches en protons, on utilise préférentiellement des accélérateurs comme les cyclotrons. Ces cyclotrons sont des installations conséquentes en taille, en coût et en main d'œuvre. Cela dit, ils sont disponibles commercialement pour tout laboratoire de recherche en radiopharmaceutique chez *Siemens*, *General Electric*, *ACS* et *IBA* pour ne citer qu'eux. Pour faire un faisceau de proton, de l'hydrogène est injecté dans une source d'ions qui permet d'obtenir une espèce chargée en sortie (H⁻ ou H⁺) selon la technologie choisie. Ces particules chargées sont ensuite soumises à un champ magnétique qui va les faire tourner et un champ électrique qui va les accélérer. Comme les particules tournent, elles passent à chaque tour dans la zone accélératrice où se trouve le champ électrique. C'est ainsi que tour après tour l'énergie des protons augmentent. Quand l'énergie souhaitée est atteinte, les particules sont extraites et dirigées vers la cible pour faire la réaction nucléaire souhaitée (**Figure 11**). Typiquement les cyclotrons médicaux utilisent des faisceaux jusqu'à une énergie de 70 MeV.

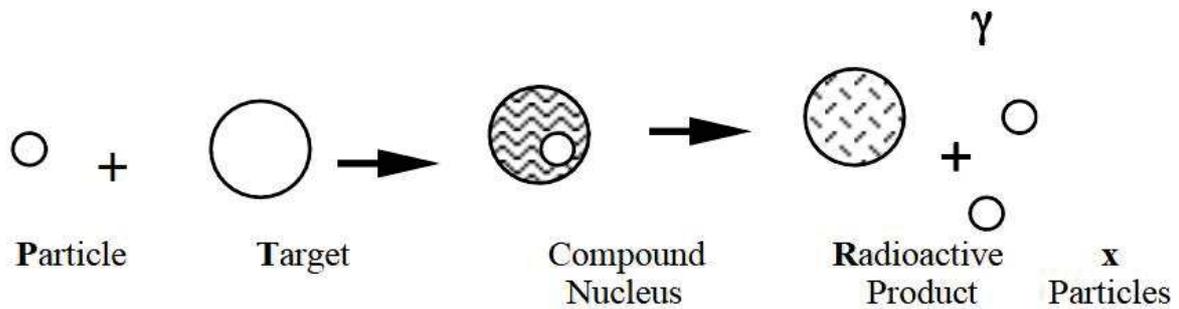


Figure 11 Schéma d'une réaction physique d'une particule rencontrant le noyau d'une cible pour former un radionucléide se désintégrant par émission de particules.

L'activité (nombre de désintégration par seconde, en Bq) d'un radionucléide donnée produite à l'aide d'un accélérateur est proportionnelle au nombre de noyaux cibles qui composent la cible (son épaisseur), au flux de projectiles que l'on envoie sur la cible (l'intensité en μA) et à la durée d'irradiation. Elle est aussi proportionnelle à une grandeur physique qui est la section efficace (σ - en barns) et qui traduit la probabilité que cette réaction particulière ait lieu. Traditionnellement, le Fluor-18 est le radionucléide le plus produit pour le radiomarquage de médicaments et d'études *in vivo*, il nécessite une cible d' H_2^{18}O enrichie en Oxygène-18. Pour les hôpitaux, des générateurs de Gallium-68 permettent par élution d'obtenir du Gallium-68 propre et prêt à l'emploi. Ces nucléides possèdent un temps de demi-vie ($T_{1/2}$) court, 109.77min et 67.71min respectivement. Ces temps de demi-vie ne sont pas adaptés aux temps de distribution des anticorps monoclonaux dans l'organisme. Il faut plusieurs jours à l'anticorps pour qu'il puisse atteindre sa cible, cela est due à une pharmacocinétique très longue *in vivo*²⁷. Les radionucléides les plus utilisés sont alors le Cuivre-64, le Zirconium-89 et l'Iode-124 (**Tableau 2**).

3.1.2 Historique et productions des isotopes

3.1.2.1 Le cuivre-64

Le Cu-64 fut très utile durant l'émergence de l'immunoTEP car il était déjà disponible et ses propriétés étaient alors bien connues. Cet isotope peut être produit par un cyclotron biomédical via bombardement d'un faisceau de proton (15,5 MeV) sur une cible en Nickel-64 enrichi (>95%)²⁸. Cette transmutation a un haut rendement et permet après purification par utilisation de colonne échangeuse d'ions d'éluer du $[^{64}\text{Cu}][\text{CuCl}_2]$. Contrairement au Fluor-18, le Cuivre-64 étant un radiométal, il est nécessaire de le complexer à un ligand, le plus connu étant le DOTA. L'avantage est de pouvoir faire des liaisons qui ne sont pas covalentes ce qui permet une versatilité et limite les contraintes d'utilisation. En effet, le DOTA, pour l'acide tétraazacyclo dodadécane tétraacétique, ne possède pas de fonction chimique permettant la conjugaison avec tout bio-vecteur, il faut le fonctionnaliser. Schématiquement, une sonde en immunoTEP est décrite en **Figure 12** ainsi que les fonctions chimiques les plus utilisées. Le radiométal peut être complexé avant ou après la bioconjugaison. La complexation du métal peut nécessiter une température élevée suivant le ligand utilisé. Si la température est supérieure à 37°C, on peut dégrader l'anticorps. C'est pourquoi la méthode décrite ci-dessous est intéressante.

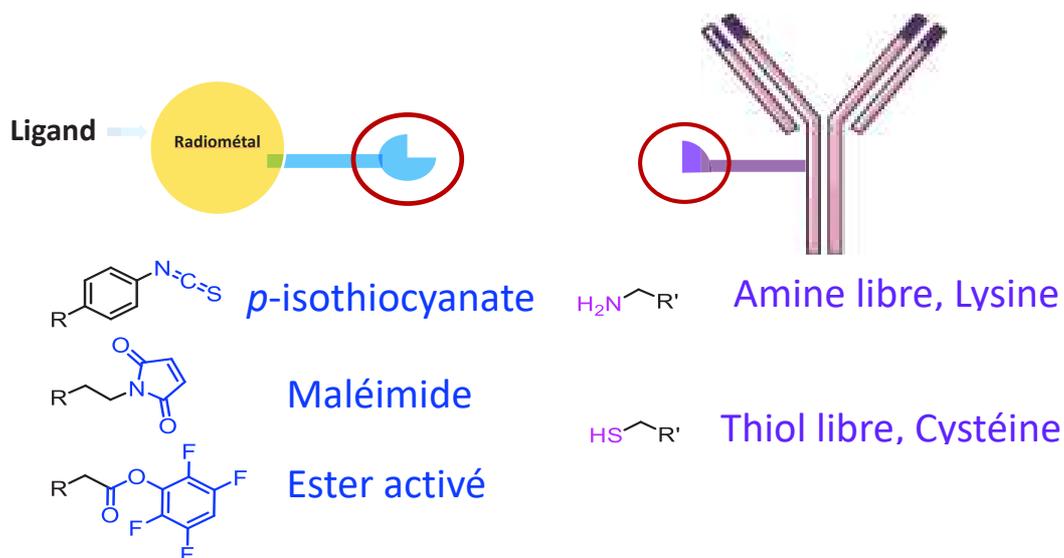


Figure 12 Schéma simple d'une bioconjugaison d'un ligand complexant un isotope métallique radioactif et de sa partie bifonctionnalisée en bleu et d'un biotraceur avec la fonction chimique qui réagira.

En pré-clinique, des cibles d'anticorps ont été étudiées avec le Cu-64, néanmoins, son temps de demi-vie de 12,7 h ne permettait pas de voir les résultats de la thérapie²⁹.

3.1.2.2 L'iode-124

L'iode-124, autrefois appelé contaminant indésirable lors de production d'iode-123³⁰, est un autre nucléide de diagnostic très utilisé. Il peut être aujourd'hui produit par réaction de transmutation (p,n) d'un faisceau de proton (12,6 MeV) ciblant du dioxyde de Tellure-124 enrichi ($^{124}\text{TeO}_2$, 89 - 99%). Ce dioxyde est déposé sur une plaque composée majoritairement de platine qui servira de support, représentée sur la photographie en **Figure 13**. La purification se fait par distillation à sec permettant d'obtenir l'I-124 seul et dans une solution NaOH (20mM) pour une utilisation en radiochimie (PerkinElmer, *Product Specifications for Supply*).

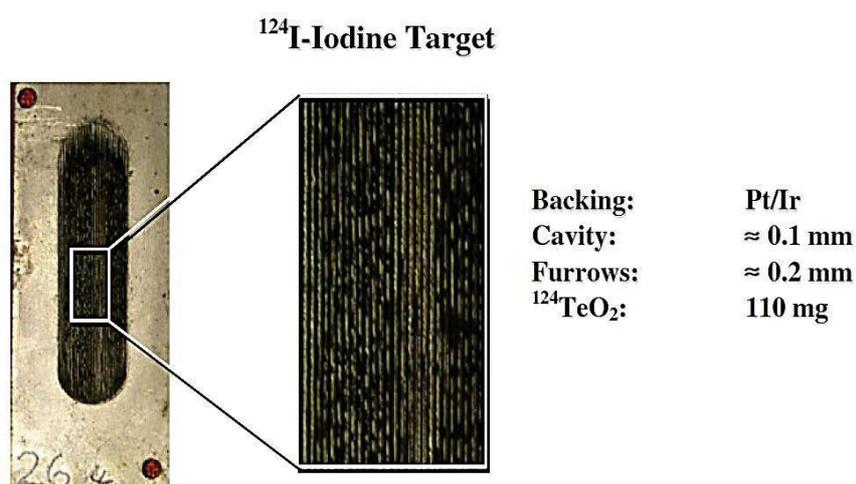


Figure 13 Ciblerie utilisée par l'hôpital d'Essen, Allemagne dans le cyclotron CV-28 pour leur utilisation académique.

Le ^{124}I avec son temps de demi-vie de 100h, a d'abord servi à marquer de petites molécules pour déterminer la prolifération des cellules cancéreuses du cerveau³¹. Concernant l'immunoTEP, dès 1987, l'équipe de Mather S. J et Ward B. G.³² décrivait une méthode de conjugaison du radionucléide par oxydation des tyrosines composant l'AcM. Cette méthode nécessite l'utilisation du bromo-succinimide comme cela se ferait dans le cadre d'une iodation oxydative en chimie organique. Ce radiomarquage fut utilisé pour la première étude sur l'humain en 1991 en marquant le HMFG1, un AcM murin ciblant les néoplasmes épithéliaux

du cancer du sein³³. Des premières images immunoTEP ont été faites et sont reproduites en **Figure 14**.

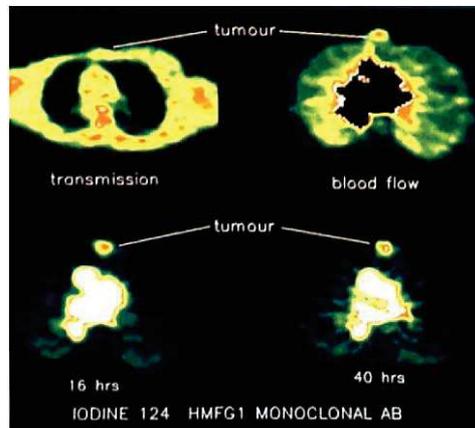


Figure 14 Imagerie à T+15h et T+40h post-injection d'un patient atteint du cancer du sein. On observe une accumulation de l'activité au niveau de la tumeur après 40h.

Aujourd'hui, lorsqu'on souhaite marquer une molécule ou un vecteur biologique avec un isotope radioactif à l'iode, la méthode la plus utilisée en radiochimie est la conjugaison par substitution électrophile par Iodogen^{®34}. Brièvement, la 1,3,4,6-tétrachloro-3a,6a-diphénylglycoluril permet l'incorporation spontanée d'iode en -ortho de groupement tyrosyle des protéines. Cette réaction se fait³⁵ :

- Par solubilisation du réactif dans le chloroforme, son caractère insoluble dans l'eau permet un *work-up* rapide après 10-15 minutes de réaction
- Purification par décantation de phases aqueuses et organiques
- Les réactions parasites sont négligeables

Si on revient sur les modes de désintégrations, la capture électronique représente 87,3% et 22,7% pour le bêta⁺³⁶. Lors de la décroissance de ce noyau il y a aussi émission d'électrons de basse énergie Auger³⁷. L'iode-124 est ainsi un radionucléide utilisé en diagnostique contre le cancer de la thyroïde. Cependant la diversité et la complexité des émissions dues à sa désintégration est source d'erreur de coïncidence³⁸. En effet, on peut énumérer outre les deux photons à 511 keV créés lors de la désintégration, des photons de 603 keV (60%), 723 keV (10%) et 1690 keV (11%). Rien que pour le cas de la détection à 511 keV, dans 50% des cas,

elle se fait en même temps que le 603 keV. La chance de créer un faux positif dans la coïncidence (vu en imagerie TEP) est alors élevée malgré des améliorations sur la plage de détection des cristaux, corrections du temps morts etc³⁹. Il y a aussi une importante irradiation du patient et du personnel à cause de ces photons.

3.1.3 Les objectifs

Le besoin croissant de trouver un radio-isotope plus approprié pour l'imagerie à base d'anticorps a été le moteur de l'augmentation récente de la recherche sur l'imagerie à base de Zirconium-89, menée par Elisabeth de Vries et de Guus van Dongen aux Pays-Bas, entre autres. En effet, le Zirconium-89 présente des caractéristiques physiques favorables pour l'imagerie à base d'anticorps, avec une demi-vie de 78,4 h et une énergie relativement faible de 395,5 keV. Cette demi-vie physique est mieux adaptée aux produits à base d'anticorps que celle du Cuivre-64, notamment en clinique. Elle est moins coûteuse à produire, plus stable in vivo, et s'accumule dans les tumeurs bien plus efficacement que l'Iode-124. Malgré l'émission de photons à 900 keV entraînant une dose élevée au patient et au personnel, cet émetteur de positons relativement peu utilisé il y a 10 ans est devenu un choix populaire. C'est ce que nous allons voir dans la prochaine partie.

4 Bibliographie

1. Smith, M. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene*, **2003**, 22, 7359–7368
2. Gilman, A. Therapeutic applications of chemical warfare agents. *Fed. Proc.*, **1946**, 5, 285–292
3. Ramirez, D. A., Collins, K. P., Aradi, A. E., Conger, K. A. & Gustafson, D. L. Kinetics of Cyclophosphamide Metabolism in Humans, Dogs, Cats, and Mice and Relationship to Cytotoxic Activity and Pharmacokinetics. *Drug Metab. Dispos.*, **2019**, 47, 257–268
4. Rettig, W. J. & Old, L. J. Immunogenetics of Human Cell Surface Differentiation. *Annu. Rev. Immunol.*, **1989**, 7, 481–511
5. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **1975**, 256, 495–497
6. Sl, M., Mj, J., La, H. & Vt, O. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1984**, 81, 6851–6855
7. Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. et al. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*, **1988**, 332, 323–327
8. Mahler, S. M., Marquis, C. P., Brown, G., Roberts, A. & Hoogenboom, H. R. Cloning and expression of human V-genes derived from phage display libraries as fully assembled human anti-TNF α monoclonal antibodies. *Immunotechnology*, **1997**, 3, 31–43
9. Susan L Smith, J. *Trans. Coord.*, **1996**, 6, 109-121
10. Singh, S. et al. Monoclonal Antibodies: A Review., **2018**, 13, 85-99
11. Reichert, J. M. Antibodies to watch in 2017. *mAbs*, **2016**, 9, 167–181
12. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.*, **2010**, 10, 317-27
13. Old, L. J., et al., *Clin. Cancer Res.*, **2003**, 9, 1639-1647
14. Li, C. et al. Antibody-based tumor vascular theranostics targeting endosialin/TEM1 in a new mouse tumor vascular model. *Cancer Biol. Ther.*, **2014**, 15, 443–451
15. Weiner, G. J. Rituximab: Mechanism of Action. *Semin. Hematol.*, **2010**, 47, 115–123
16. Melero, I., Hervas-Stubbs, S., Glennie, M. et al. Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy., *Nat. Rev. Cancer*, **2007**, 7, 95–106
17. Kumar, R. & Yarmand-Bagheri, R. The role of HER2 in angiogenesis. *Semin. Oncol.*, **2001**, 28, 27–32
18. Hudis, C. A., *N. Engl. J. Med.*, **2007**, 357, 39-51

19. Junutula, J. R. et al. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nat. Biotechnol.*, **2008**, 26, 925–932
20. Francisco J. A., et al., *Clin. Cancer Res.*, **2004**, 20, 7063-7070
21. Dimasi, N. et al. Efficient Preparation of Site-Specific Antibody–Drug Conjugates Using Cysteine Insertion. *Mol. Pharm.*, **2017**, 14, 1501–1516
22. Ehman, E.C., Johnson, G.B., Villanueva-Meyer, J.E., Cha, S., Leynes, A.P., Larson, P.E.Z. and Hope, T.A., PET/MRI: Where might it replace PET/CT?. *J. Magn. Reson. Imaging*, **2017**, 46, 1247-1262
23. Patrick J. P., Marjolijn N. L., Jourik A. G., Winette T.A., M. Alexander K., Sharon J., Jos G.W. Kosterink, Dirk J. V., Sleijfer D.T., *J. of Clin. Onc.*, **2006**, 24, 2276-2282
24. Timothy J. M. , Sally W. S., and Michael J. W. J., *Chem. Educ.*, **1994**, 71, 830
25. Shukla, A. K. & Kumar, U. Positron emission tomography: An overview. *J. Med. Phys.*, **2006**, 31, 13
26. Katz, L. & Penfold, A. S. Range-Energy Relations for Electrons and the Determination of Beta-Ray End-Point Energies by Absorption. *Rev. Mod. Phys.*, **1952**, 24, 28–44
27. Zeglis, B. M. & Lewis, J. S. A practical guide to the construction of radiometallated bioconjugates for positron emission tomography. *Dalton Trans.*, **2011**, 40, 6168–6195
28. McCarthy, D. W. et al. Efficient production of high specific activity ⁶⁴Cu using a biomedical cyclotron. *Nucl. Med. Biol.*, **2007**, 24, 35–43
29. Paudyal, P. et al. Imaging and biodistribution of Her2/neu expression in non-small cell lung cancer xenografts with ⁶⁴Cu-labeled trastuzumab PET. *Cancer Sci.*, **2010**, 101, 1045–1050
30. Palmer DW, Rao SA. A simple method to quantitate iodine-124 contamination in iodine-123 radiopharmaceuticals. *J Nucl Med.*, **1985**, 26, 936-940
31. Blasberg, R. G. et al. Imaging Brain Tumor Proliferative Activity with [¹²⁴I]Iododeoxyuridine. *Cancer Res.*, **2000**, 60, 624–635
32. Mather SJ, Ward BG. High efficiency iodination of monoclonal antibodies for radiotherapy. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Soc. of Nucl. Med.*, **1987**, 28, 1034-1036
33. Wilson, C.B., Snook, D.E., Dhokia, B., Taylor, C.V.J., Watson, I.A., Lammertsma, A.A., Lambrecht, R., Waxman, J., Jones, T. and Epenetos, A.A., Quantitative measurement of monoclonal antibody distribution and blood flow using positron emission tomography and ¹²⁴I iodine in patients with breast cancer. *Int. J. Cancer*, **1991**, 47, 344-347
34. Visser, G. W. et al. Optimal Quality ¹³¹I-Monoclonal Antibodies on High-Dose Labeling in a Large Reaction Volume and Temporarily Coating the Antibody with IODO-GEN. *J. Nucl. Med.*, **2001**, 42, 509–519
35. Réactif de iodination Pierce™

36. Jiri Stepanek, Börje Larsson & Regin Weinreich, *Auger-Electron Spectra of Radionuclides for Therapy and Diagnostics, Acta Oncologica*, **1996**, 35, 863-868
37. Weinreich, R. et al. *I-124 and its applications in nuclear medicine and biology*, **1998**
38. Grewal, R. K., Lubberink, M., Pentlow, K. S. & Larson, S. M. *The Role of Iodine-124-Positron Emission Tomography Imaging in the Management of Patients with Thyroid Cancer. PET Clin.*, **2007**, 2, 313–320
39. Lubberink, M. & Herzog, H. *Quantitative imaging of ¹²⁴I and ⁸⁶Y with PET. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.*, **2011**, **38**, 10

Chapitre 2 : Le Zirconium-89

1 Généralités

Lorsque l'on cherche « *ImmunoTEP* » sur *Web of Science*, 103 papiers traitent du Zirconium-89 sur une totalité de 284 publications, soit 36%. Ce chiffre conséquent est dû aux caractéristiques physico-chimiques de ce dernier qui sont intéressantes. Depuis ces 20 dernières années, une partie non négligeable de la recherche en organométallique se consacre à la recherche de catalyseur au Zirconium(+IV) ce qui développa un bon nombre de fonctions chimiques propres à ce dernier. En ce sens, la chimie du Zirconium-89 a connu un vif intérêt en imagerie médicale, c'est-à-dire dans la recherche d'un ligand bifonctionnel du Zirconium-89 en vue du radiomarquage de biovecteur. Le ^{89}Zr possède un temps de demi-vie de 78,4h (ou 3,27 jours) qui est bien adapté à la pharmacocinétique d'un anticorps monoclonal *in vivo*. Le Zirconium-89 est un nucléide qui se désintègre par émission β^+ (23%) et par capture électronique (EC, 77%) en Yttrium-89 métastable (**Figure 15**). L'énergie moyenne du positon émis étant moyennement faible (396 keV), son parcours moyen est de 1,2 mm et la résolution spatiale pour de l'imagerie TEP est peu affectée¹. L'atome fils de la désintégration du Zr-89 est un isotope de l'Yttrium possédant un $T_{1/2}$ de 15,7 s qui se désintègre par émission de gamma (γ) d'énergie élevée (909 keV) en Yttrium-89 naturel.

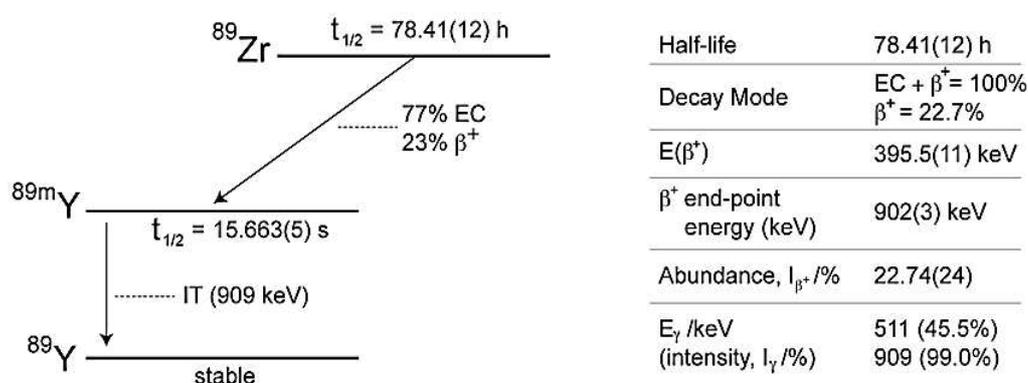


Figure 15 Schéma de désintégration du Zr-89 et tableau récapitulatif des informations importantes de cet isotope.

1.1 Les productions de Zr-89

La première production du Zirconium-89 a été réalisée par l'équipe de Link J.M. en 1986². Ils ont démontré qu'il était possible de produire du ⁸⁹Zr par bombardement d'une feuille d'Yttrium par réaction de transmutation (p,n) via un faisceau de protons à une énergie de 13 MeV. L'Yttrium utilisé est de l'Yttrium naturel car ce dernier est mono-isotopique et composé uniquement de ⁸⁹Y. Cela a pour conséquence une haute sélectivité dans les transmutations possibles diminuant le nombre d'impuretés radioisotopiques co-produites. La purification qu'ils ont mis en œuvre fut par double extraction via la 4,4,4-trifluoro-1-(2-thienyl)-1,3-butanedione ou TTA dans du xylène afin d'extraire le Zr-89 de la feuille. De cette phase organique fut extrait en phase aqueuse le nucléide par un mélange HNO₃/HF. Néanmoins dans ce mélange se trouvait une grande quantité d'entités métalliques cationiques c'est pourquoi ils ont utilisé une résine échangeuse d'anion pour capturer le Zr(+IV). Après rinçage à l'acide fluorhydrique, l'activité produite est finalement récupérée par élution à l'acide chlorhydrique 1M/oxalate 0,01M avec une pureté annoncée de 99.9% et un rendement radiochimique global allant de 25% à 80%. Cette première méthode fut confirmée 4 ans plus tard par l'équipe de Dejesus et Nickles³. Brièvement, leur méthode consistait en l'extraction du zirconium radioactif par du dibutyl phtalate 0.03M (DBP) d'une feuille d'Yttrium-89 (épaisseur 0,127 mm et 0,6 mm) bombardée par un faisceau de proton durant 2h (10 μA) à une énergie de protons incidents de 10 à 11.4 MeV. La solution organique comprenant du [⁸⁹Zr][Zr(DBP)] est lavée à l'acide sulfurique 1M pour éliminer l'Yttrium-89 avant que le radionucléide, sous forme [⁸⁹Zr][Zr(F₈)]⁴⁻ soit récupéré dans une solution d'HF 4M. La colonne utilisée est une Dowex 1 x 8 Cl⁻ qui va piéger le ⁸⁹Zirconium-IV à la surface des résines, après élution à l'HCl à différentes concentrations, le Zirconium-89 est récupéré avec un rendement bien supérieur à la méthode de Link, J.M, de 84%. Il est notamment possible de produire du Zirconium-89 par réaction (d,2n) c'est-à-dire par l'utilisation d'un faisceau de deutéron de 16 MeV comme décrit l'équipe de Zweit J. en 1991. Leur méthode consiste à bombarder des granulés d'Y-89_{nat.}. Ils indiquent un rendement de purification radiochimique de 80%.

Si on s'intéresse à nouveau à la production par transmutation (p,n), Meijs WE et son équipe ont utilisé un autre type de ciblerie⁴. En effet, par électrodéposition, il est possible de déposer de l'Yttrium sur une pièce de cuivre, la pièce de cuivre servant de support et permettant notamment de refroidir le système en passant un courant d'eau sur l'arrière de la pièce. En effet, le faisceau de protons de 14 MeV (100 µA, 1h) qu'ils ont utilisé était stoppé par cette couche de cuivre et donc l'eau ne risquait pas d'être activée. C'est la première fois qu'il a été capable dans un cyclotron biomédical de produire une activité >8 GBq. On peut retrouver un historique des études nous ayant servi comme base dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 Historique des productions, des types de purifications et le rendement de purification correspondant

Type de cible	Equipe	Type de colonne / purification	% récupéré
Feuille d'Yttrium	Link <i>et al.</i> 1986	Extraction au TTA + Dowex 1x8 échange anion (Cl-)	25% - 80%
Feuille d'Yttrium	Dejesus et Nickles 1990	Extraction au DBP	84%
Yttrium déposé sur pièce de Cuivre	Meijs <i>et al.</i> 1994	Dowex 2X-8 / Colonne hydroxamate	98%
Yttrium déposé sur pièce de cuivre	Verel <i>et al.</i> 2003	Colonne hydroxamate	97%
Pastille Y ₂ O ₃	Kandil <i>et al.</i> 2007	Dowex 50W-X8 (forme H) extrait au TPPO	97,5%
Feuille d'Yttrium	Holland <i>et al.</i> 2009	Résine hydroxamate et/ou Sep-pak QMA échangeuse d'anion	99,5% (100%)
Feuille d'Yttrium	Zhang <i>et al.</i> 2011	Résine hydroxamate	95,5%
Feuille d'Yttrium	Wooten <i>et al.</i> 2013	Résine hydroxamate	97%
Yttrium déposé sur pièce de Niobium	Lapi <i>et al.</i> 2017	Résine hydroxamate	93,8% - 100%
Yttrium pressé	Guérin <i>et al.</i> 2018	Résine hydroxamate	76,6 - 85,4%

1.2 La purification

Meijs et ses collaborateurs ont été les premiers à mettre en avant les caractères physico-chimiques du Zirconium pour sa séparation des autres métaux. Simplement, en utilisant un agent oxydant comme le peroxyde d'hydrogène, il est possible d'oxyder à l'état d'oxydation +IV tout le Zirconium présent afin de le retenir plus facilement sur la colonne. Concernant la colonne, ils ont fonctionnalisé les groupements carboxyles d'une résine commerciale *Accel* par couplage de type peptidique. En excès, un agent de couplage 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDAC) est solubilisé dans de l'eau déionisée avec la résine puis il est possible de faire réagir une hydroxylamine sur les acides carboxyliques⁵ dont la réaction chimique mise en œuvre se trouve en **Figure 16**.

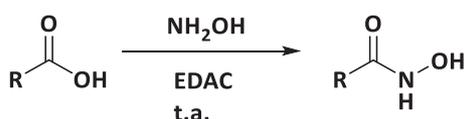


Figure 16 Fonctionnalisation d'une fonction carboxylique sur un support R. Pour 1 g de résine *Accel*, EDAC (2 mmol), NH₂OH (2 mmol), t.a., 2h

Pour comprendre le choix de la fonctionnalisation avec des fonctions hydroxylamines, il faut remonter jusqu'en 1965 où des premières évaluations démontraient une bonne stabilité d'un complexe basé sur la complexation du Zirconium naturel et de l'acide benzhydroxamique (10¹ M, 10⁻¹ M et 10⁻² M) en milieu très acide (pH=0)⁶. Ceci a été confirmé par l'équipe de Barocas A. lorsqu'ils ont comparé les constantes de stabilités déterminées par titration au KOH de différents cations métalliques⁷. Ces observations de 30 ans en arrière ont été mises en pratique par élution d'une solution d'HCl à 3M servant à solubiliser le dépôt d'Yttrium au préalable à son élution sur cette résine. Ils ont démontré que cette colonne séparait efficacement le Zr-89 des autres cations comme l'Yttrium-89, l'Yttrium-88, le Zinc-65, le Cobalt-56 ainsi que le Vanadium-48. Tous ces cations sont issus de la réaction de transmutation (p,xn) des impuretés du dépôt (⁵⁶Fe, ⁴⁸Ti et ⁶⁵Cu).

Le nucléide d'intérêt est alors élué en utilisant une solution d'acide oxalique (1M, 6 - 10 mL) qui permet une transchélation de 95%, toujours d'après Meijs⁴. Dans ce papier, ce sont les premiers à s'être réellement intéressés à la production d'un autre radioisotope du Zirconium, le ⁸⁸Zr ($T_{1/2}$: 83,4 j, CE 100% et E_γ : 392,87 keV) formé par la réaction ⁸⁹Y(p,2n)⁸⁸Zr. Cet isotope se forme lorsque l'énergie du faisceau de proton excède les 13,1 MeV (énergie seuil). En effet, comme on peut le voir sur la courbe en **Figure 17** représentant la section efficace de production du Zirconium-89 et du Zirconium-88 en fonction de l'énergie incidente des protons. En dessous de 13 MeV, seule la réaction produisant du Zirconium-89 est possible tandis qu'au-delà de 13 MeV, le Zirconium-88 commence à être produit en parallèle du Zirconium-89 réduisant la pureté finale du produit.

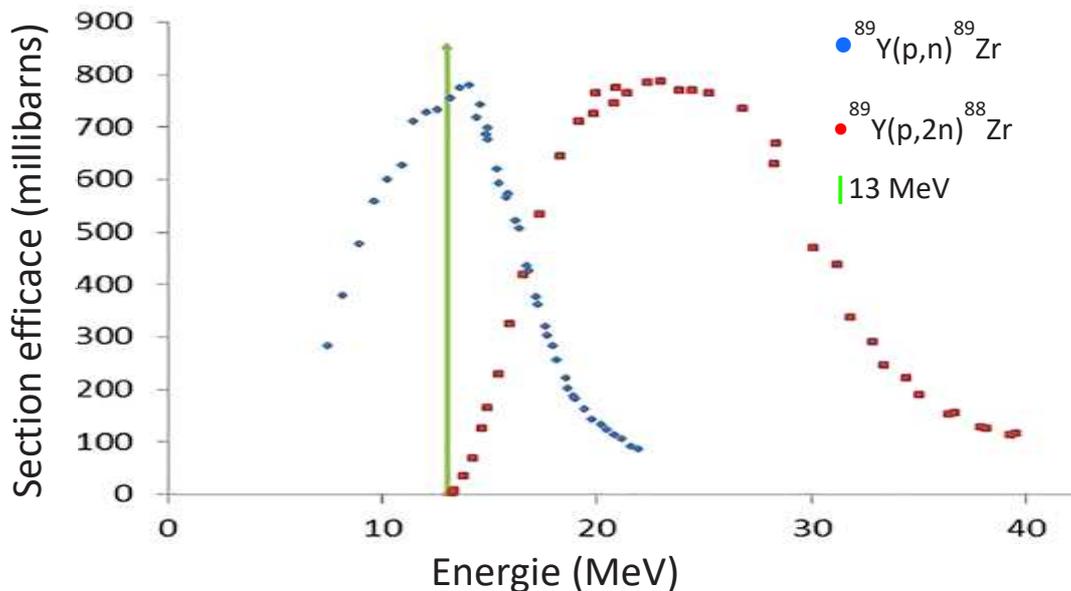


Figure 17 Courbe représentant la section efficace de production de Zr-89 et Zr-88 associées à l'activation par proton de l'Y-89. La ligne verte correspond à la limite de 13 MeV à ne pas dépasser pour réduire un maximum la production du Zr-88¹⁹.

1.3 Caractéristiques du Zirconium

Le ⁸⁹Zr et le ⁸⁸Zr possèdent les mêmes propriétés physico-chimiques. Ceci implique que lors de l'étape de complexation en vue de l'immunoTEP, dans l'organisme se trouveraient *in fine* tous les isotopes du Zirconium. Le Zr-88 pose un certain nombre de soucis : son long temps de demi-vie rend difficile toute utilisation chez l'Homme si il est présent à plus de >0,01%. Le

gamma émis lors de sa désintégration peut poser des problèmes de corrélations lors de la reconstruction des paires et affecter la résolution en imagerie TEP. Pour conclure avec ces travaux, l'équipe Meijs a démontré que l'utilisation d'une résine fonctionnalisée de type hydroxylamine était la méthode de choix pour séparer le Zirconium radioactif, et non radioactif, des autres cations avec un rendement de purification radiochimique >98%. Il a fallu attendre 2009 pour que l'équipe de Holland J. P définisse clairement une méthode permettant de produire et de purifier le Zirconium-89 en s'inspirant de Meijs et son équipe⁸. Leur méthode consistait à produire un faisceau de protons de 15 MeV (2 à 3 h, 15 μ A) d'énergie, afin d'irradier une feuille de ⁸⁹Y (0,1 mm d'épaisseur, 100% de pureté affichée). Avec leur énergie, ils indiquent l'absence de formation d'Yttrium-88 ($T_{1/2}$: 106,65 j ; ⁸⁹Y(p,pn)⁸⁸Y) et de Zirconium-88 (en dessous de la limite de détection). Ce qu'ils affichent comme résultat est obtenu par spectrométrie gamma à 16 h après la fin du bombardement (EOB). Il faut savoir qu'à ce temps d'analyse spectrométrique, il est difficile de déterminer la quantité de Zirconium-88 puisqu'on se trouve dans la zone de haute production de ⁸⁹Zr d'après la **Figure 17**. Ce type d'études se fait habituellement à T + 10 périodes. Néanmoins, ils ont démontré, par une méthode de fonctionnalisation de résine commerciale *Waters Accell Plus CM échangeuse faible de cations*, que par une étape d'activation d'ester avant l'addition et l'élimination de l'hydroxylamine, on augmentait la surface fonctionnalisée ce qui engendre une augmentation du taux de récupération du radionucléide. Brièvement, en activant les carboxylates des résines par le 2,3,5,6-tétrafluorophenol (TFP, excès) à l'aide d'un équivalent d'EDAC/quantité de TFP en milieu peu acide (pH 6 environ). L'ester tétrafluoré activé est alors converti par ajout d'hydroxylamine à pH 5. Les avantages de cette méthode sont qu'elle peut se faire facilement au sein de n'importe quel laboratoire de chimie et que la résine afficherait une haute efficacité sur une période supérieure à un an. Elle ne nécessite qu'une activation, 1h avant son utilisation. Pour résumer, leur méthode consiste à passer au travers de la résine hydroxamate activée une solution d'HCl 6M contenant l'actif dans 1,25% v/v de H₂O₂. Après rinçage, le Zirconium-89 est finalement élué avec 4 x 0,5 mL d'acide oxalique 1M (99% de l'activité se trouvant sur la résine est alors récupérée) et 1mL (0,40% de l'activité) d'acide oxalique 1M pour récupérer une solution de [⁸⁹Zr][Zr(C₂O₄)₄]⁴⁻. Depuis 2014, Pandey, M. K. travaille sur la production et la purification du Zirconium-89 en utilisant une solution de nitrate d'Yttrium (Y(NO₃)₃.6H₂O) >99.99% pure. L'intérêt d'une telle méthode est de permettre aux cyclotrons biomédicaux servant à la production de ¹⁸F d'élargir leurs horizons en permettant d'utiliser les

systèmes de ciblerie liquide. Simplement, la transmutation sur cible solide de Zirconium-89 requiert un système permettant de manipuler, solubiliser et chauffer pour récupérer l'activité sur la feuille ou les granulés précédemment discutés. Pandey M. K. et al. ont mis en évidence que lors de l'irradiation d'une solution nitrée, il y avait une forte production de gaz due à la radiolyse de l'eau entraînant la production de NO₂, H₂, O₂ et Cl₂. Ils ont pu gérer cette production de gaz en diluant la solution de nitrate d'Yttrium⁹. Ils ont notamment mis en évidence une nouvelle méthode d'éluion du ⁸⁹Zr sur la résine *hydroxamate* en utilisant une solution de phosphate, 1,2M K₂HPO₄/KH₂PO₄ à pH 3,5. En éluant avec un petit volume (4 x 0,5 mL) ils ont déterminé une efficacité de 91,7 ± 3,7%¹⁰. Par ailleurs, dans une étude datant de 2018, l'équipe de Bénard F. a pu faire la comparaison directe entre la transmutation du ⁸⁹Y en solution et sur feuille. Au bout d'une heure d'irradiation à 14,6 µA, la production en ⁸⁹Zr dans la solution est de 8,3 ± 7,88% de la production totale par rapport au support solide¹¹. Malgré tout, cette étude a permis d'apporter une nouvelle méthode d'éluion permettant après neutralisation du pH de radioconjuguer des anticorps monoclonaux et d'en faire des images TEP comparatives visibles en **Figure 18**.

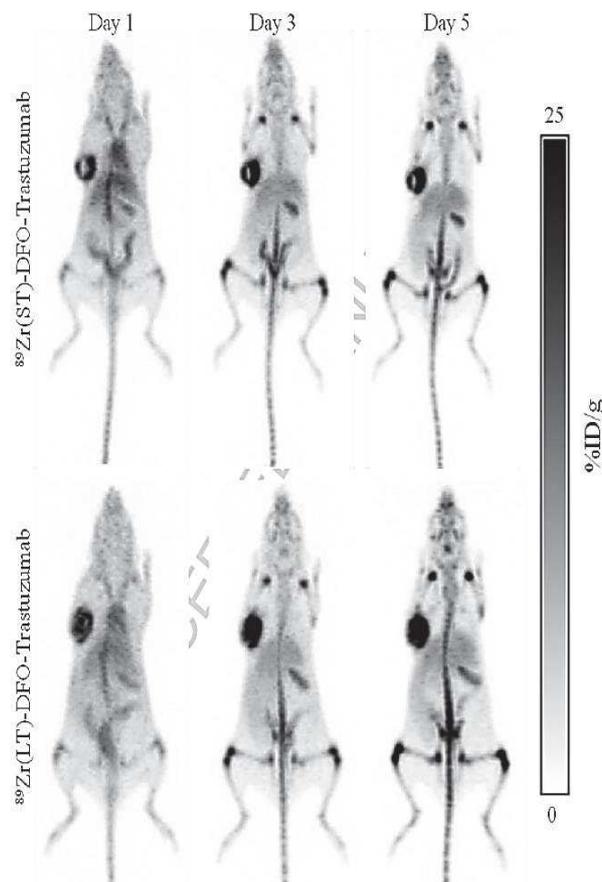


Figure 18 Imagerie TEP du DFO-Trastuzumab radiomarqué au Zirconium-89 provenant de la cible solide et liquide. (Photo tirée de Dias, G. M., et al., Nucl. Med. Biol., 2018, 58, 1-7)

1.4 L'activité molaire apparente

Une information importante est l'activité molaire apparente (AMA). Ce terme fait référence aux radionucléides synthétisés présents à l'état de trace, pour une certaine quantité d'atome père (Yttrium-89 pour le Zirconium-89 par exemple) avec une réaction p,n. L'intégralité de la couche électrodéposée n'étant pas transmutée, on évoque alors une quantité de Zr-89 produite de l'ordre de la picomole, ou de la nanomole. La quantité de ^{89}Zr est reliée à l'activité par l'équation suivante¹² :

$$n \text{ (mole)} = \text{Activité (Becquerel)} \times T_{1/2} \text{ (seconde)} \times 2,4 \times 10^{-24}$$

L'activité mesurée est directement liée à la quantité de matière produite lors du bombardement. C'est ainsi que depuis 2001, l'IUPAC (pour *International Union of Pure and Applied Chemistry* en anglais) a déterminé la règle suivante pour l'Activité Spécifique « *Pour un radionucléide donné, l'AMA est l'activité d'une matière divisée par la masse ou le volume de cette matière.* » (IUPAC, Nomenclature for Isotope, Nuclear and Radioanalytical Techniques, daté du 12 Janvier 2001). Dans la plupart des papiers relatant de production d'isotope, l'AMA était donnée en Bq/g (GBq/ μg , MBq/mg, etc.) et implique que l'activité mesurée n'est pas due à un autre isotope. Cela demande donc de vérifier la présence d'autres isotopes par spectrométrie gamma. Néanmoins, les méthodes de détermination d'Activité Spécifique pour les radiométaux sont souvent les mêmes : utilisation d'un vecteur ou ligand. Une méthode utilisée est celle décrite pour le titrage de Cu-64 par l'acide 1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane-1,4,8,11-tétraacétique (TETA)¹³.

Brièvement, des solutions de concentration connues d'un ligand spécifique du radiométal d'intérêt sont diluées précisément jusqu'à une concentration du ng.mL^{-1} . En prélevant un certain volume fixe de chaque aliquote préparé il est possible d'en déduire la masse puis la quantité de mol. À ces mêmes volumes fixes, en y déposant une activité connue et constante, on peut déduire le pourcentage de ligands chélatés. En pratique, on dépose une quantité, au bon pH, temps et température de complexation nécessaire et connue, sur une plaque TLC en utilisant un solvant capable d'éluer le complexe. L'équipe de McCarthy utilisait un mélange 1 : 1 Méthanol : Acétate d'Ammonium pour faire migrer le Cuivre-64 complexé par le TETA et le

cuivre libre. Lorsque la concentration en ligand diminue on s'attend à ce que la quantité de cuivre complexé diminue. Pour cela, on utilise couramment une Radio-TLC qui permet de scanner l'activité sur toute une feuille CCM. On peut ainsi déterminer une courbe comme en **Figure 19**.

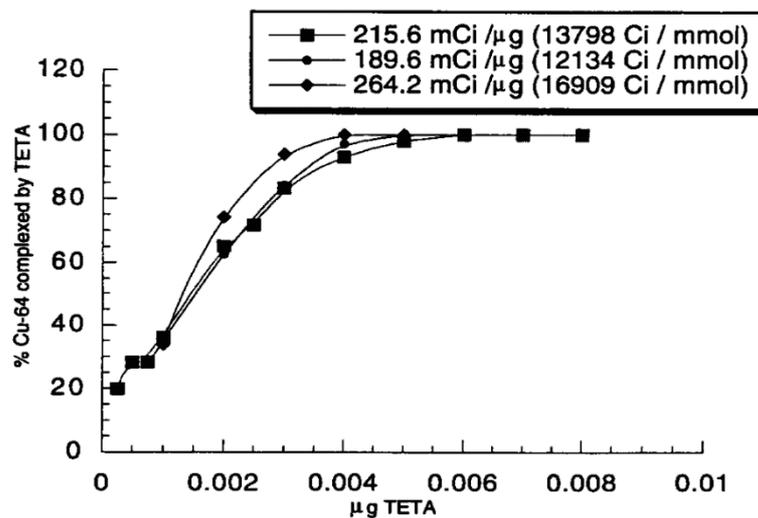


Figure 19 Détermination de l'Activité Molaire Apparente (en mCi/µg ou Ci/mmol) du Cuivre-64 par titrage au TETA, activité mesurée par Radio-TLC (Bioscan, Washington, DC) pour trois productions différentes¹³.

Cette méthode a été standardisée par l'équipe de Holland en 2009 pour déterminer l'AMA du Zirconium-89. En effet, on retrouve le même principe que pour le Cuivre-64 mais en utilisant comme ligand pour chélater le Zr : la Desferrioxamine-B. L'éluant utilisé est une solution de DTPA.

Dans cette partie, nous avons établi l'historique des différentes méthodes de production ainsi que les moyens mis en œuvre pour la transmutation de l'Yttrium naturel en Zirconium-89. Dans cette partie, nous adapterons les méthodes à ce qui nous convient le mieux par rapport au Cyclotron CYRCé et au moyen de transport de la cible choisi entre l'accélérateur et le module de purification.

2 Matériels et méthodes pour la production de ⁸⁹Zr

2.1 Introduction

Selon l'isotope que l'on choisit de produire, la cible peut être soit un gaz, soit un liquide, soit un solide. Dans tous les cas, le milieu irradié doit être transféré dans une cellule chaude pour isoler le produit radioactif. Si, dans le cas d'un liquide ou d'un gaz, le transfert de matières radioactives est facile à mettre en œuvre, pour les cibles solides, certains défis sont à relever. Des systèmes commerciaux ou artisanaux ont été mis au point ces dernières années, mais la plupart d'entre eux nécessitaient une grande surface au sol, un ensemble de cibles dédiées et un système de transport. La plupart de ces systèmes sont basés sur une ligne de faisceau "externe" qui occupe entièrement un port de sortie du cyclotron. D'autre part, des systèmes de cibles solides et compacts ont été développés, permettant d'installer plusieurs cibles sur le même port. Ces cibles solides compactes peuvent être utilisées pour la production à petite et moyenne échelle d'une grande diversité d'isotopes dont le Cu-64 à CYRCé et depuis cette thèse, le Zirconium-89. Le principal inconvénient est la nécessité d'une intervention humaine pour charger, décharger et transporter la cible.

Concernant les cibles, les pastilles sont principalement des oxydes d'Yttrium dont le diamètre est connu et sont maintenues dans une structure en métal de Niobium ou d'Aluminium. Les capsules peuvent aussi accueillir des feuilles d'Yttrium. La plupart des feuilles sont produites à partir de lingots d'Yttrium destinés à être utilisés dans des procédés de revêtement et de dépôt chimique en phase vapeur (CVD) ou de dépôt physique en phase vapeur (PVD) de couches minces. Ces lingots d'Yttrium permettent notamment de produire des feuilles minces de très haute pureté (+99,9%) par évaporation thermique induite par faisceau d'électrons (E-Beam), évaporation organique à basse température, par dépôt de couches atomiques (ALD), par dépôt organométallique et chimique en phase vapeur (MOCVD). Avec les oxydes d'Yttrium, on utilise la méthode de presse dans laquelle la poudre d'oxyde d'Yttrium Y_2O_3 est insérée et pressée en pastilles de 6 ou 13 mm de diamètre dont l'épaisseur varie entre 0,3 et 0,5 mm. La pression maximale appliquée peut atteindre les 18000 psi. Les pastilles formées sont encapsulées. Pour les irradiations un dégradeur en Aluminium ou Niobium est souvent mis en place.

2.2 Le choix de la cible

Le cyclotron CYRCé (Cyclotron pour la Recherche et l'Enseignement, **Figure 20**)¹⁴ est installé à l'IPHC (Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien) pour le développement de nouvelles molécules radiomarquées basées sur la recherche et la production de radio-isotopes pour les diagnostics et les traitements médicaux.



Figure 20 Photographie datant de l'installation du TR24 à Strasbourg.

Le cyclotron TR24 produit et commercialisé par ACSI (Canada) délivre un faisceau de protons de 18 à 24 MeV¹⁵ sur deux ports d'extraction simultanément avec une intensité allant de quelques nA à 500 μ A. L'installation produit d'ores et déjà du ¹⁸F et ⁶⁴Cu. Comme nous avons vu précédemment¹⁶, la cible de la production de Cu-64 est composé d'un support en or- disque de 25 mm de diamètre, 2 mm d'épaisseur) sur lequel est électrodéposé du nickel-64 de haute pureté (matériau cible). Afin d'insérer automatiquement la pièce préparée à l'intérieur de la cible solide, un chargeur de pièce dédié a été développé. Après chaque irradiation par faisceau, une nouvelle pièce est insérée dans la cible solide à partir du chargeur (**Figure 23**). La présence d'une nouvelle cible est contrôlée à distance.

2.2.1 La pièce cible pour la production de Zirconium-89

Dans le cas de la production en Zirconium-89, avant mon arrivée, le laboratoire avait cherché la meilleure méthode de déposition sur une pièce. Après différents échecs, nous avons souhaité travailler avec un centre reconnu sur les traitements de surfaces : le CITRA (*Centre d'Ingénierie en Traitements et Revêtements de surface Avancés*, 16 rue Atlantis 87068

LIMOGES Cedex). Le CITRA possède une machine permettant d'accéder à un vide de type PVD (*Physical Vapor Deposition* ou Dépôt Physique de Vapeur). Le principe de cette machine est décrit en **Figure 21**.

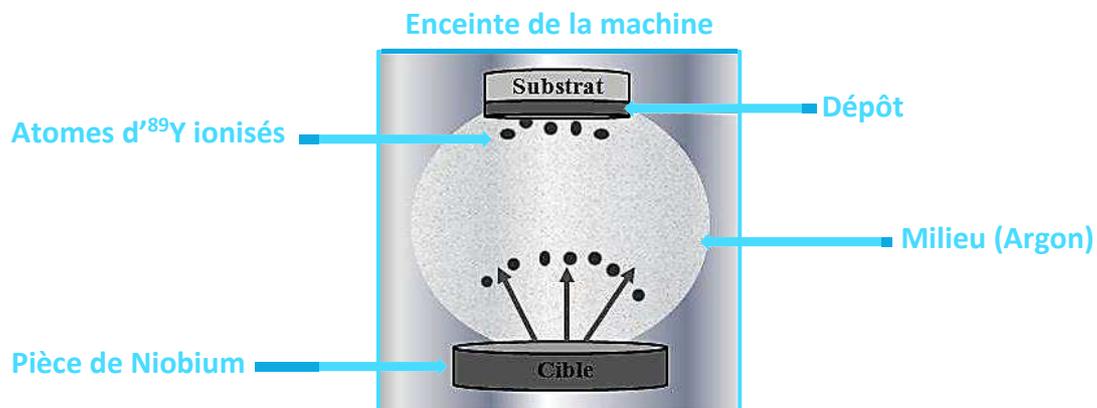


Figure 21 étape 1 : enceinte mise sous vide poussé, un gaz plasmagène (typiquement de l'argon) y est introduit, **étape 2** : une décharge plasma est alors créée par polarisation négative d'une cible d'Yttrium-89 et **étape 3** : les atomes du gaz ionisés vont bombarder la cible et la pulvériser pour que les atomes alors arrachés viennent se déposer sur le substrat.

Grâce à cette méthode, 10 pièces de Niobium ont été confectionnées (25 mm de diamètre pour une épaisseur de moyenne de 1.88 mm) avec un dépôt d'Yttrium_{naturel} (l'épaisseur varie entre 14,5 μm à 157 μm). La cible est considérée comme une couche mince et le rendement optimal de production de Zr-89 est atteint pour une énergie des protons de 13 MeV (maximum de la section efficace pour la réaction $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$). Comme TR24 ne permet l'extraction des faisceaux de protons qu'à une énergie supérieure, un dégradeur en aluminium est utilisé afin d'obtenir une énergie de protons <13 MeV sur la cible. Le dépôt d'énergie se produit au centre de la pièce qui est refroidie par un flux d'eau à 20°C (3 L/min).

2.2.2 Système de transport

Une navette (**Figure 22 (A)**) a été conçue pour : attraper et transporter la cible irradiée de la casemate à la cellule chaude ; prévenir la contamination du disque pendant le transport ; servir de réacteur chimique étanche pour dissoudre le dépôt irradiés de la cible. La navette est composée d'un système mécanique auto-déclenché par la pièce elle-même lorsque celle-ci tombe de la cible. Des canaux et des entonnoirs en plastique doivent être adaptés pour guider la pièce de la cible à la navette et aussi pour présenter le côté droit de la pièce. Lorsque ce côté est présenté et le levier actionné, la pièce est ainsi piégée (**Figure 22 (B)**).

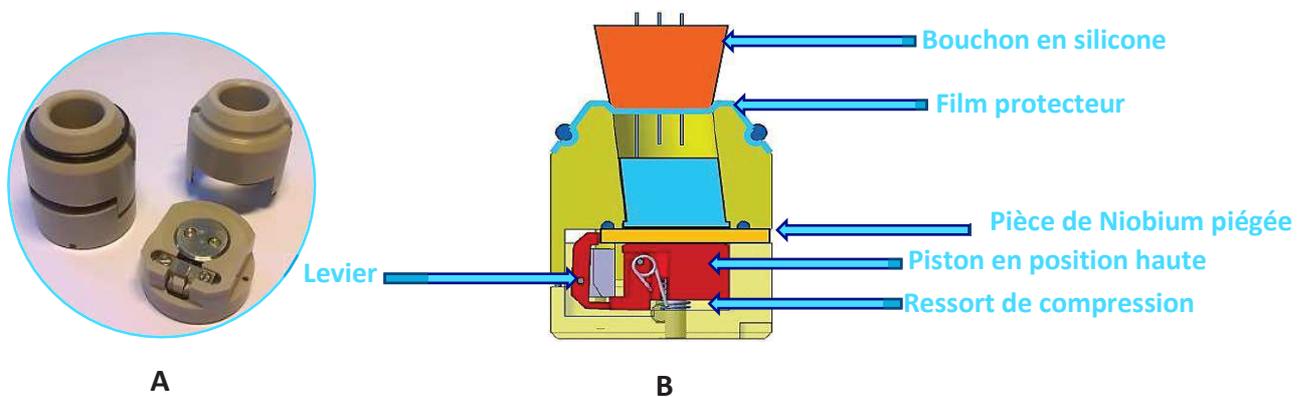


Figure 22 (A) Photographie de la navette montée et démontée **(B)** lorsque le disque entre dans la fente de la navette, il frappe un levier au bas de la navette qui libère un piston qui presse le disque sur le joint intérieur. Un film empêche la contamination de la cible pendant le transport ainsi que la contamination éventuelle du tuyau de transport. La force du ressort de compression permet de bloquer fermement la cible en position haute.

Une station d'amarrage (**Figure 23**) de la navette est située sous la cible du cyclotron. Son premier objectif est de positionner avec précision la navette afin de guider la pièce irradiée vers la fente d'entrée de la navette. Sa deuxième fonction est d'envoyer pneumatiquement la navette vers la cellule chaude (*hot-cell*). Un actionneur pneumatique pousse la navette à l'intérieur de l'entrée du tuyau et la ferme pendant le transport. Lorsque l'actionneur atteint sa position supérieure, il commute automatiquement 2 bars d'air comprimé dans le tuyau, ce qui propulse la navette jusqu'à la cellule chaude. Une fois dans la *hot-cell*, la navette est utilisée comme réacteur chimique pour la dissolution de l'Yttrium. Un bouchon de silicone est inséré mécaniquement dans la partie supérieure de la navette afin d'assurer l'étanchéité du

réacteur (**Figure 22 (B)**). Le module peut recevoir la navette tout en assurant les conditions de sécurité liées à l'utilisation de la cellule chaude. Un système veillant au verrouillage est ainsi maintenu. Nous verrons dans une prochaine partie le système de purification car avant cela, il faut solubiliser l'Yttrium pour entamer une purification en phase liquide.

Hot-cell vue de l'intérieur

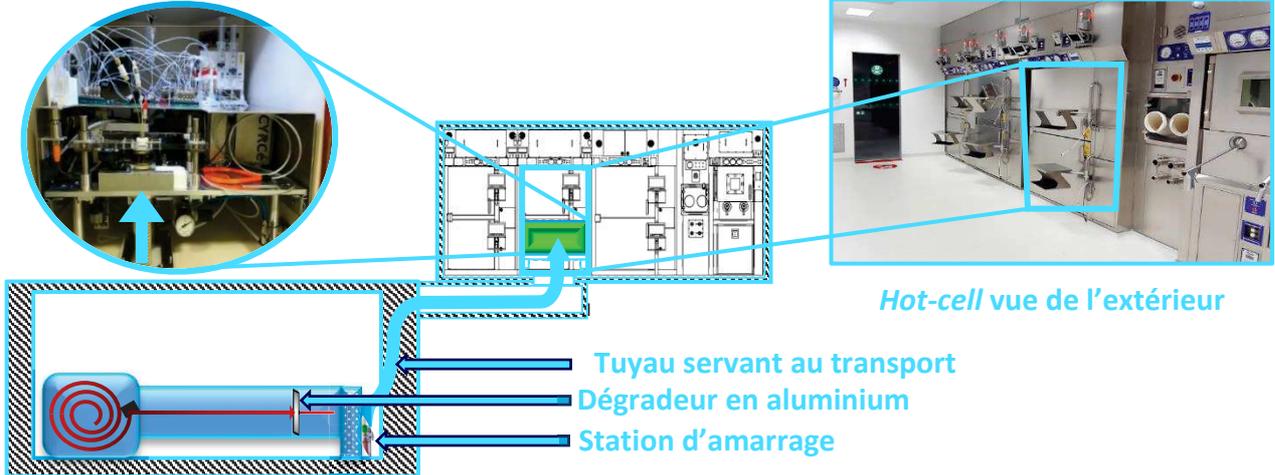


Figure 23 Schématisation du Cyclotron, le faisceau de proton en rouge passe au travers un dégradateur d'aluminium pour atteindre la cible. La station d'amarrage où la pièce est piégée dans la navette ainsi que le tuyau servant à déplacer le dépôt d'Yttrium vers la cellule chaude sont aussi présentés.

2.2.3 Solubilisation de la couche d'Yttrium

La première étape suivant la production de Zirconium-89 est la dissolution complète du dépôt d'Yttrium. D'après les méthodes décrites par les équipes figurant sur le **Tableau 3**, les volumes d'acide utilisés sont considérés comme trop conséquent pour notre matériel. En effet, le volume maximal de la navette avec le bouchon, si on l'utilise en tant que réacteur, est de 2,5 mL. L'utilisation de concentration molaire élevée en acide chlorhydrique entraîne une formation en gaz importante et nous avons comme contrainte le volume de la navette qui ne doit en aucun cas déborder. Une méthode douce appliquée sur une feuille d'Yttrium par l'équipe de González-Lepera¹⁷ et récemment utilisée par l'équipe de Kellog¹⁸ indique qu'une solution à 2 molaires d'acide chlorhydrique est suffisante. La seule méthode impliquant des pièces pulvérisées d'Yttrium-89¹⁹ indique un volume de 4 mL de HCl 2M. Avec un chauffage à 80°C il est possible de dissoudre la totalité du dépôt en 20 minutes. Ce volume reste supérieur au volume maximal que l'on peut admettre dans notre système, il était alors important de

tester cette méthode avec notre modèle de navette. Avec le système de chauffage à induction de la cellule chaude, j'ai pu tester la température minimale qui était nécessaire pour décapier la pièce. En atteignant une température de 60°C, un dégagement gazeux se produisait et l'acide chlorhydrique jaunissait. Cette température fut alors admise comme suffisante, il ne restait qu'à déterminer le temps de chauffe. Pour une pièce disposant d'un dépôt d'une épaisseur de 127,8 μm , après 20 minutes de chauffage, 99,5% de cette pièce a été dissoute et après un nouveau cycle de 10 minutes, la totalité de l'Yttrium a été solubilisée. J'ai constaté que la masse de la pièce ne variait pas après 10 minutes supplémentaires, soit 40 minutes au total. De plus, j'ai pu établir qu'une durée de chauffage de 30 minutes était suffisante. C'est pour cela qu'un test a été mené sur une seconde pièce (dépôt d'Yttrium = 125,92 μm d'épaisseur), au bout de 30 minutes à 60°C, 99,8% du dépôt a été dissout (**Figure 24**).

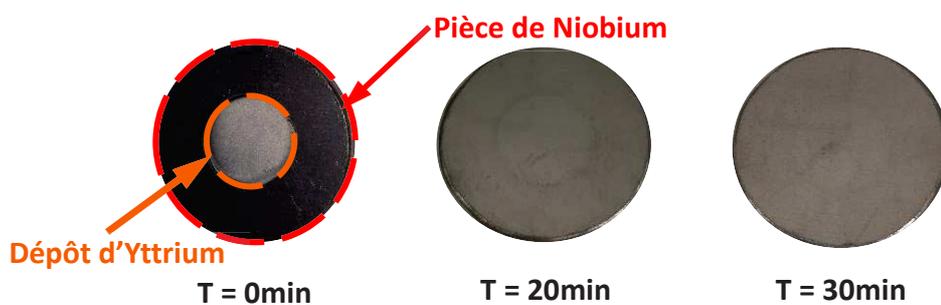


Figure 24 Test de solubilisation de la couche d'Yttrium, 60°C avec HCl 2M

Ces essais et ces manipulations sont nécessaires pour programmer un automate et/ou un logiciel de contrôle à distance. En effet, ne pouvant interagir directement avec la pièce une fois irradiée il est nécessaire d'en contrôler préalablement tous les paramètres.

3 La séparation chimique du Zirconium-89

3.1 La séparation par utilisation de résines

3.1.1 Préparation de la résine

Lorsque l'on se trouve en solution après dissolution de la cible, la séparation chimique via l'utilisation de phase solide (résines) est le principe communément utilisé. Il en est de même avec les radiométaux puisque pour séparer le Zirconium-89 de la quantité d'Yttrium-89 la méthode utilisée aujourd'hui emploie une résine dite *hydroxamate*. Sur le **Tableau 3** on peut voir qu'il n'en a pas toujours été ainsi mais cette méthode s'est imposée depuis qu'il y a nécessité d'obtenir une haute pureté. La fonction *hydroxamate* est encore aujourd'hui celle majoritairement utilisée. Au début de la thèse, cette résine était principalement produite par mes soins au sein du laboratoire via une fonctionnalisation des groupements carboxylates d'une autre résine commerciale, la Waters Accell Plus CM. C'est une résine échangeuse de cations faible qui propose une fonction chimique intéressante. En effet, Holland J. a démontré qu'il était possible de coupler à ces résines une fonction hydroxylamine via la méthode d'ester activé⁸. On peut résumer cette fonctionnalisation de la même manière qu'une réaction chimique (**Figure 25**) où le carboxylate réagit (0,35 mmol/g, pour 130 mg : 0,045 mmol) avec 5,7 éq. du chlorhydrate de 1-éthyl-3-diméthylaminopropyl carbodiimide (EDAC) et 3,43 équivalents du phénol qui servira de groupe partant pour l'étape d'après, le 2,3,5,6-tétrafluorophénol (TFP).

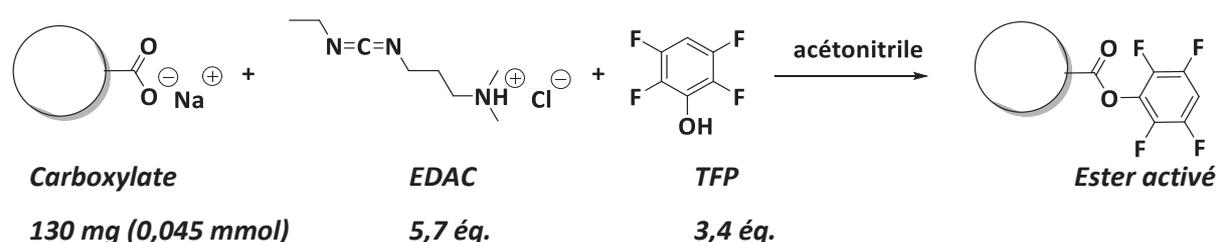


Figure 25 Préparation d'un ester activé sur une résine commerciale

Cette méthode de fonctionnalisation a été adaptée à des résines scellées dans des cartouches. En effet, afin d'éviter tout contact répétitif avec l'extérieur, pouvant entraîner une dégradation des réactifs et de la résine, j'ai fait le choix de fonctionnaliser jusqu'à trois cartouches de QMA simultanément via un système schématisé en **Figure 27**. En utilisant une pompe péristaltique, j'ai pu faire de la chimie sur des cartouches prêtes à l'emploi, c'est-à-dire avec des filtres et une silice déjà compactée dans ces cartouches. Par un cycle fermé, en disposant les réactifs dans les flacons, on peut laisser réagir durant le temps nécessaire afin d'être sûr de tout activer (au moins 4 h).

Une fois les 4 heures de cycle écoulées pour former l'ester activé, on peut suivre l'avancée de la réaction par simple test UV d'une goutte sortant du tuyau **B** (**Figure 26**). Lorsqu'il n'y a plus la présence d'un spot à l'UV, cela indique que tout le TFP a été consommé et on peut alors sécher les résines se trouvant dans les cartouches en débranchant le tuyau **A** (**Figure 26**). Par simple changement de flacon, on peut alors fonctionnaliser la résine avec une réaction d'addition élimination du groupe ester de TFP avec du chlorhydrate d'hydroxylamine (29 éq.) en résine d'hydroxamate. L'hydroxylamine est solubilisée dans du méthanol et le pH est contrôlé avec du NaOH 1M pour obtenir un pH de 5,3 – 5,4. Après 18 heures de cycle, la résine d'hydroxamate se trouvant dans les cartouches a été lavée avec de l'eau (cycle ouvert avec 25 mL d'eau, tuyau B plongé dans un flacon poubelle) et du MeCN (cycle ouvert avec 25mL d'acétonitrile, tuyau B plongé dans un flacon poubelle) avant d'être séchée.

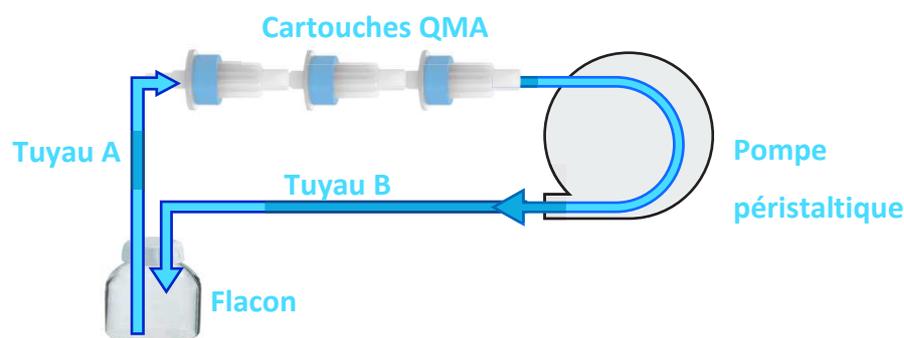


Figure 26 Schéma du montage utilisé pour fonctionnaliser les résines QMA dans des cartouches prêtes à l'emploi.

3.1.2 Résine commerciale

Pendant la thèse, Triskem International a commercialisé une nouvelle résine selon le même principe. Selon les données fournies par le fabricant²⁰, cette résine a une grande sélectivité pour le Zr dans une large gamme de concentrations de HCl (0,01 à 10M) et dans les solutions de HNO₃ avec des concentrations allant jusqu'à 5 M. En même temps, la résine a une faible affinité pour l'Yttrium, ainsi que pour le Fe(III) dans les solutions de HCl 1 à 6M d'où son efficacité pour séparer le Zirconium-89 de la cible irradiée. Le ⁸⁹Zr est alors élué de la résine avec une solution d'acide oxalique d'une concentration de 0,05 à 1 M dans un petit volume (0,5 à 1,5 mL). Ainsi, en utilisant cette résine, il est possible de s'épargner la fonctionnalisation maison d'une résine commerciale pour laquelle nous n'avons pas de moyen de connaître le rendement de fonctionnalisation.

3.1.3 Séparation à la main du Zirconium-89

Après 6h d'irradiation à 100 µA.h, la navette comportant la pièce est déposée dans le système à induction manuellement. On peut voir en (**Figure 27, A**) le système utilisé avec des tuyaux en PTFE qui transitent entre chaque bouteilles et flacons dont le trajet d'éluion est régi par les robinets. Pour résumer, la solution brute de ⁸⁹Zr est passée à travers la cartouche Accell Plus CM Plus fonctionnalisée via les robinets à 3 voies (**Figure 27, B**) en utilisant des seringues remplies d'air pour pousser les liquides. Après avoir rincé le flacon initial avec 2 x 2.5 ml d'HCl 2M, l'acide passe à travers la cartouche. Le [⁸⁹Zr][Zr(oxalate)₄]⁴⁻ a été obtenu en désorbant l'activité du Zirconium-89 de la résine de la cartouche avec 1 mL d'acide oxalique 1 M en poussant lentement la seringue. Afin d'obtenir du chlorure de ⁸⁹Zr, l'oxalate de ⁸⁹Zr qui a été désorbé de la résine de la cartouche hydroxamate a été passé à travers une cartouche Sep-Pak Light QMA activée (la cartouche a été activée au préalable par 6 mL de MeCN, 10 mL de NaCl à 0,9 % et 10 ml d'eau déionisée) via le robinet suivant. La cartouche a ensuite été lavée avec 40 ml d'eau déionisée et le chlorure de Zr-89 est élué avec 0,5 mL de HCl 1 M.

Cette première purification a validé :

- La fonctionnalisation par pompe péristaltique
- Rendement de purification de 82%, on peut alors entrer en phase de conception de l'automate
- L'activité restant se trouve principalement dans la résine hydroxamate, l'élution doit se faire plus lentement (manuellement, il est impossible d'atteindre un débit de 0,1 mL/min nécessaire à une bonne élution)

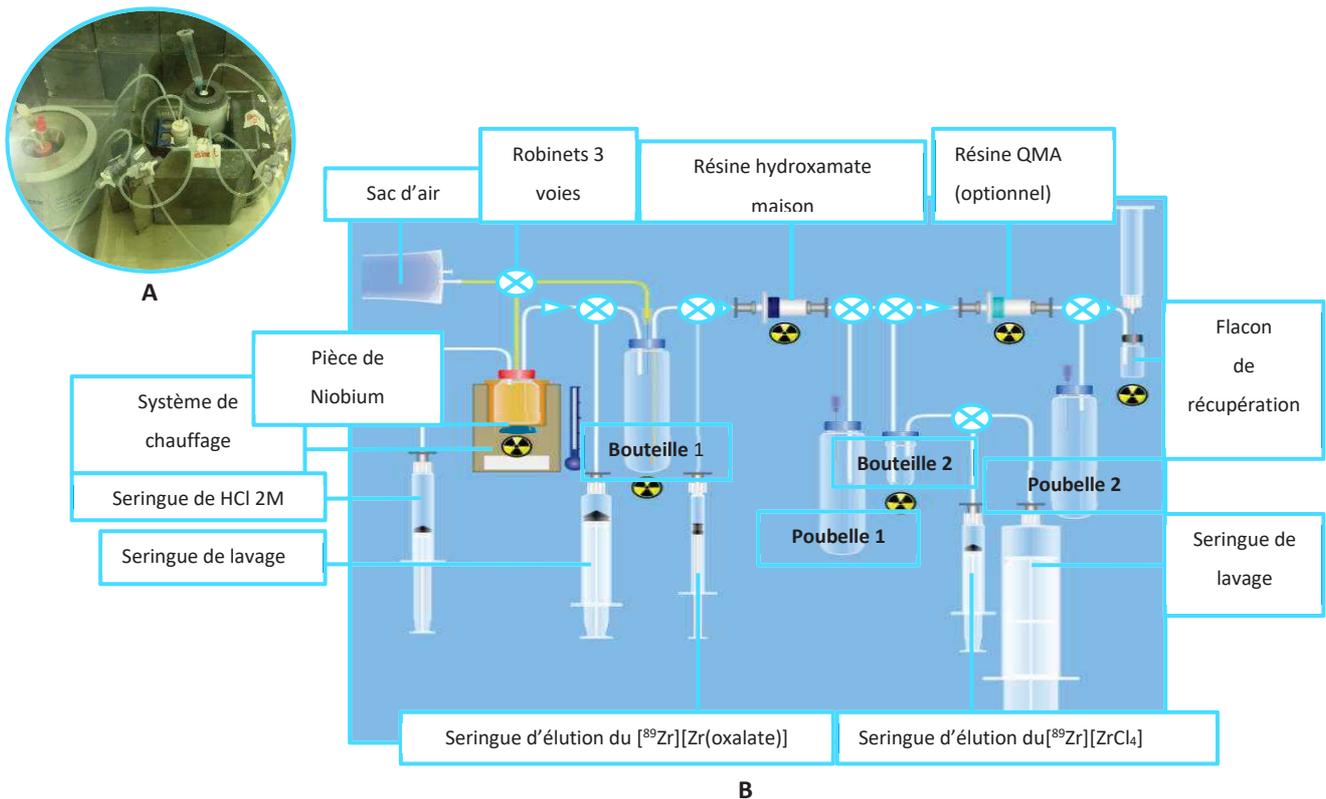


Figure 27 A. Photographie du montage sous plomb de la purification à la main. **B.** Schématisation qui servira de base pour l'automatisation de la séparation du Zr-89.

3.2 Vers une automatisation de la séparation

La première expérience de séparation du Zirconium radioactif étant satisfaisante, j'ai pu me lancer pleinement dans la mise en place d'un système semi-automatisé. Un module semi-automatisé a été conçu et construit pour produire à distance du $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}(\text{oxalate})_4]^{4-}$ ou du chlorure de Zirconium-89 à l'intérieur d'une cellule chaude (**Figure 28, A**). Le module a été construit à l'aide d'une boîte en aluminium disponible dans le commerce. Nous avons fait le choix d'utiliser une pompe péristaltique qui permet de contrôler le débit, le volume et le sens

d'écoulement des différents éluant et liquide de rinçage d'un tel montage. Tous ces liquides transitent à travers le système par des tubes en polytétrafluoroéthylène (PTFE) et par des aiguilles en polyétheréthercétone (PEEK) par action mécanique de la pompe. Afin de réduire l'exposition aux métaux susceptibles d'affecter l'activité spécifique finale du produit, tous les raccords de liquide et de gaz ont été assemblés à l'aide de connecteurs non métalliques. Tous les solvants sont chargés dans le module via des seringues. Le module est contrôlé par un ordinateur portable pour lequel un seul cordon d'alimentation est nécessaire. Les fonctions du module sont alors contrôlées par une interface utilisateur facile à programmer et permettant d'interagir en direct sur la séquence programmée (**Figure 28, B**). Pour résumer, après le chauffage, les 2 mL sont envoyés dans le flacon de collecte. 2 x 2,5 mL d'HCl 2M sont utilisés pour rincer intégralement la navette et transférer la solution dans le flacon de collecte.

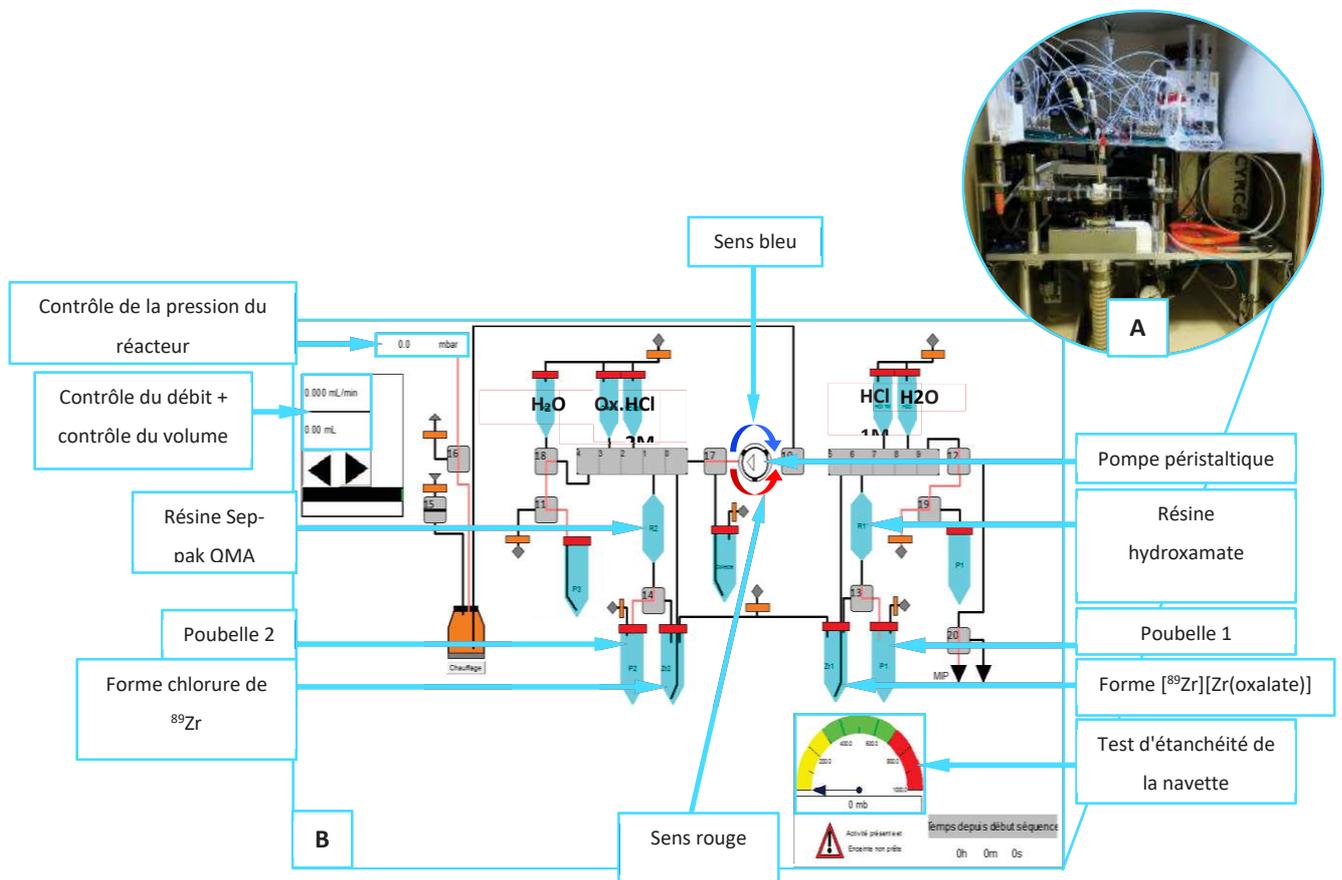


Figure 28: **A.** Photographie du module avec le tuyau d'arrivée de la navette visible. La forêt de tuyau en PTFE permettant de relier les seringues d'éluant ainsi que la boîte en plomb notée CYRCé où se trouvent les cartouches. **B.** Panneaux de contrôle de la chimie en cellule chaude.

La pompe péristaltique permet de déplacer le liquide dans le sens rouge ou bleu. Ainsi, du flacon de collecte, par le sens bleu, on élue les 7 mL à 1 mL/min sur R1 qui correspond à la résine hydroxamate. Par un rinçage à 3 mL/min d'eau déionisée on arrive à éliminer l'acide chlorhydrique. Grâce à un événement, on peut aussi faire passer de l'air pour sécher la résine. Une fois la résine séchée, l'acide oxalique (1 mL ; 0,3 mL/min) élue le Zr-89 jusqu'au flacon ZR1. A ce moment de la séparation, on peut choisir de transférer les 1mL vers le flacon de collecte puis vers la MIP. Afin d'obtenir la forme chlorée de ce ^{89}Zr ($^{89}\text{Zr}[\text{ZrCl}_4]$), les 1 mL peuvent passer dans le sens rouge vers R2 (1 mL/min) qui est la résine QMA. La poubelle 2 doit être suffisamment grande car on rince R2 avec 35 - 40 mL d'eau déionisée à 3 mL/min pour chasser tout l'acide oxalique. Après séchage (1 mL/min d'air durant 15 minutes), l'HCl 1M (0,5 – 0,8mL à 0,5 mL/min) élue le Zirconium-89 vers ZR2. On récupère l'activité en MIP via le sens bleu (**Figure 28**). Il est intéressant de noter qu'il y a un compteur d'activité positionné près des tuyaux qui permet de suivre l'activité se déplaçant entre la partie gauche et droite du montage (**Figure 28, B**). Cette méthode a confirmé que le peroxyde d'hydrogène n'était pas nécessaire. En effet, le H_2O_2 permet de solubiliser plus facilement les feuilles d'Yttrium et évite la formation de précipité noir. Dans nos cas, aucun précipité n'a été observé durant les productions. On retrouve les 7 principaux tirs et productions de Zirconium-89 dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 Résumé des productions faites par l'automate à CYRCé durant la thèse.

Date du tir	Intensité faisceau ($\mu\text{A.h}$)	Temps de tir	Activité produite théorique (MBq)	Masse d'Yttrium (mg)	Activité récupéré flacon (MBq)	Rendement (%)	Epaisseur dégradeur Alu (mm)
06/11/18	100	6h	1220	33,57	274	22,46	1,62
15/03/19	100	4h	1220	35,08	822	67,38	1,62
10/05/19	120	4h	2120	63,50	1529	72,12	1,62
02/07/19	100	1h	2110	56,13	1441	68,29	1,80
01/10/19	176	3h	2900	61,39	1826	62,97	2,00
10/12/19	200	4h	3450	56,13	2713	78,64	2,00
13/02/20	150	4h	2790	62,09	2200	78,85	2,00
16/07/20	150	4h	3080	61,74	1930	62,66	2,00
12/11/20	170	4h	2900	54	2330	72,75	2,00
03/12/20	170	4h	2585	59,64	1973	65	2,00

3.3 Préparations des deux formes de Zirconium-89

Nous savons que l'acide oxalique utilisé pour éluer le Zr-89 de la résine ZR ou de la résine fonctionnalisée entraîne des problèmes de décalcification des reins pour les souris (études pré-cliniques). L'acide oxalique 1M permet d'éluer du $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_8)_4]^{4-}$ aqueux. Au début de la thèse, la mise à disposition de deux formes telles que la forme tétrachlorée ou oxalate était le but primaire. La forme tétrachlorée est la forme la plus efficace lors d'une complexation entreprise avec la DOTA. Pour obtenir la forme tétrachlorée, une solution de $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{oxalate})_4]^{4-}$ dans de l'acide oxalique 1M peut être chargée sur une cartouche Waters Sep-pak Light QMA. Via des lavages à l'eau, il est possible d'éliminer l'acide oxalique de la cartouche et de récupérer le chlorure de ^{89}Zr avec une solution saline à 0,9% ou du $\text{HCl}_{(\text{aq.})}$ à 1M dans des volumes acceptables (<1 mL). Jusqu'à aujourd'hui, la seule méthode semi-automatisée proposant la formulation du Zirconium-89 en tétrachlorure datait de 2016¹⁷. Les trois premières productions nous ont permis d'obtenir la forme tétrachlorure de ^{89}Zr mais depuis, la forme oxalate est préférée notamment dans les laboratoires que l'on fournit. Un dernier tir datant de Décembre 2020 a été fait durant ma thèse sur lequel les données présentées sont en cours d'analyse néanmoins il a été possible de déterminer l'activité spécifique que nous verrons plus tard. Ce qui est intéressant c'est que depuis, il a été démontré qu'il était possible de convertir la forme *oxalate* du Zirconium en forme *chlorée*, $[^{89}\text{Zr}][\text{ZrCl}_4]$ par unique passage de la dernière solution sur une résine commerciale, prêt à l'emploi *Waters Sep-pak Light QMA* (résumé en **Figure 29**), une résine échangeuse d'anion fort, contre ion : chlorure.

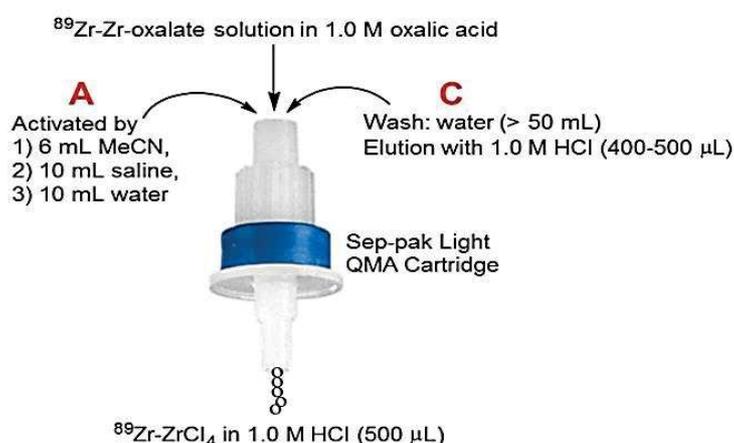


Figure 29 Schéma de la procédure du conversion du $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{oxalate})]^{4-}$ en $[^{89}\text{Zr}][\text{ZrCl}_4]$

Cette seconde forme est éluée avec une solution d'HCl 1M et permettrait plusieurs choses :

→ Une complexation plus rapide avec un ligand conjugué à un anticorps monoclonal¹⁷

→ L'acide oxalique résiduel serait toxique pour les modèles murins utilisés en pré-clinique (décalcification du sang et insuffisance rénale aiguë dû à l'oxalate de calcium obstruant les tubules rénaux).

3.4 Les analyses des productions en Zirconium-89

3.4.1 Détermination de la pureté des radionucléides

Un détecteur Ge(Li) couplé à un analyseur multicanaux a été utilisé pour quantifier le ⁸⁹Zr et pour identifier et quantifier les impuretés radionucléidiques. Ces analyses sont faites directement après séparation chimique sur une goutte (ou 30 µL) de la solution finale diluée dans 3 mL. Après purification, les spectrométries gamma sont similaires à celle de la **Figure 30** quelle que soit la forme de Zr-89 produite.

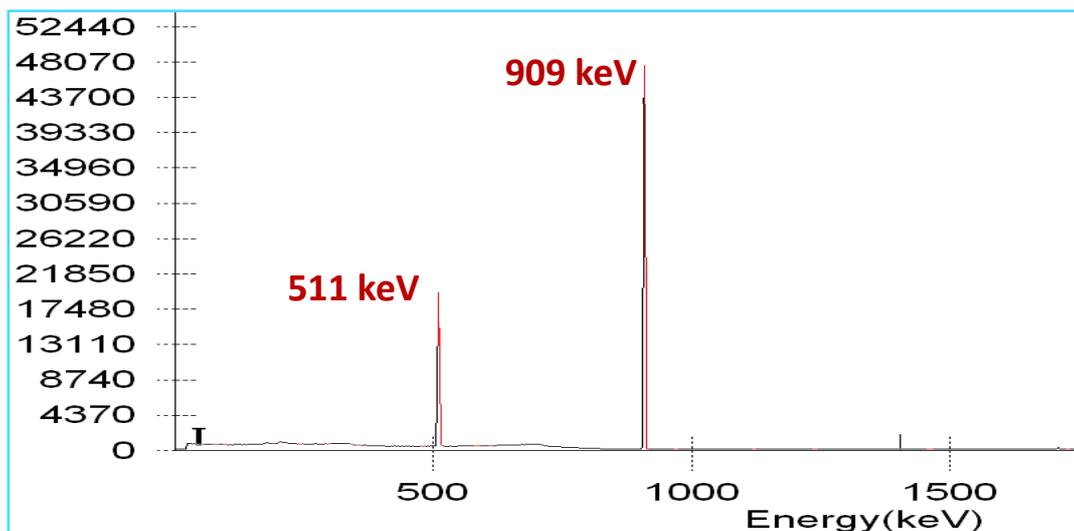


Figure 30 Le diagramme du spectre d'énergie γ de la solution finale dans HCl 1M (similaire à ce qu'on peut obtenir avec la solution d'acide oxalique 1M)

Après 3 mois, une même analyse a été faite sur le même flacon et on a pu déterminer la quantité de Zr-88 ($T_{1/2} = 83,4$ j, $E_{\gamma} = 393$ keV, 97%). En remontant à une activité lors de la fin de production ou EOB (*End Of Beam*), on a constaté que pour une activité produite, 0,001% était composé de Zirconium-88, ces valeurs sont en adéquation avec des productions déjà

faites et publiées dans la littérature par l'équipe de Wooten A. L²¹. J'ai aussi pu déterminer le type de radionucléide produit et restant sur la pièce, et on trouve majoritairement un isotope du molybdène : le 93m-Molybdène ($T_{1/2} = 6,85$ h) de la réaction $^{93}\text{Nb}(p,n)^{93m}\text{Mo}$ (cross-section : 22 mb)²². Cette réaction concerne le Niobium-93 se trouvant sur la pièce, on ne retrouve pas le Molybdène-93m dans le reste du process de purification.

3.4.2 Détermination de l'activité molaire apparente (AMA)

L'AMA tient compte de la présence de tout isotope métallique (stable ou radioactif) qui peut être chélaté par le ligand spécifique au Zirconium qui est le DFO. Pour une production de chaque forme, les résultats du titrage DFO ont été tracés et ajustés avec une courbe sigmoïdale dose-réponse pour produire une valeur EC50, qui a été utilisée pour calculer l'AMA en MBq.nmol⁻¹. L'AMA est déterminée par pourcentage de Zr-89 complexé en fonction de la quantité de DFO utilisé. Pour la forme tétrachlorée nous obtenons alors une activité molaire apparente de 44.37 MBq/mol (n=1) de (Figure 31).

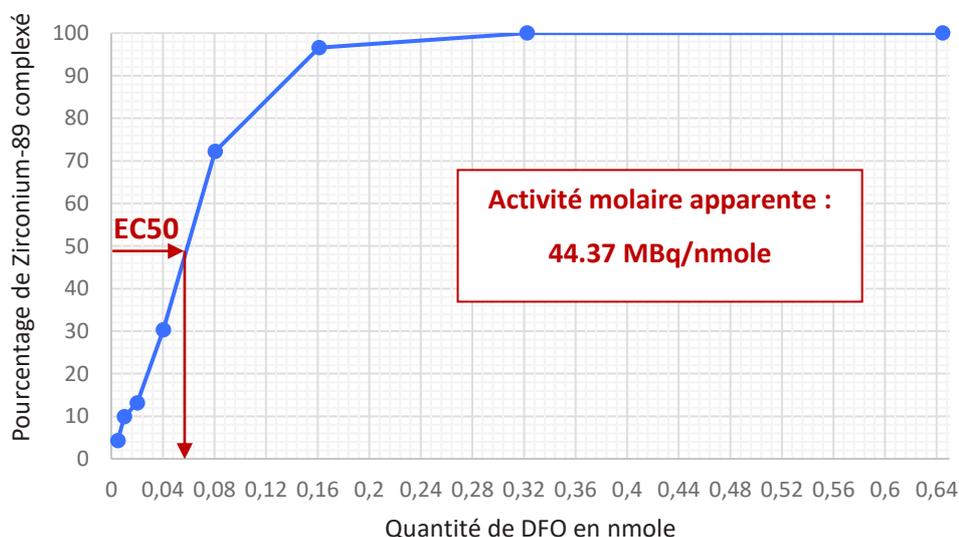


Figure 31 La courbe de complexation du DFO et du Zr-89 produit sous forme tétrachlorure avec la valeur à EC50 donnant l'activité molaire apparente

J'ai utilisé le mode opératoire décrit par J. Holland qui consiste à préparer des solutions de concentrations connues du DFO par dilutions successives permettant d'obtenir des solutions de 1,520 $\mu\text{mol/mL}$ à 0,18 $\mu\text{mol/mL}$. En prélevant une quantité fixe (50 μL) on peut alors définir

par rapport au pourcentage de Zr-89 la quantité au nmole correspondant. Les CCM sont utilisés et l'éluant utilisé est une solution d'EDTA à 100mM. Une fois la courbe dose-réponse sigmoïde obtenue, la valeur EC50 permet de déterminer l'AMA. J'ai observé une amélioration de l'AMA avec de plus gros volumes de rinçage et notamment en titrant la forme oxalate du Zirconium-89 (**Tableau 5**). Nous conservons des échantillons pour les analyser afin de détecter les contaminants métalliques qui pourraient diminuer l'AMA. Une analyse élémentaire sera effectuée sur ces échantillons par spectrométrie de masse avec ionisation par couplage inductif plasma (ICP-MS). Depuis, nous avons amélioré le process en utilisant la résine commerciale de Triskem et nous avons accru la quantité d'eau de rinçage. L'activité molaire apparente est plus élevée (**Figure 32**) ce qui est rassurant quant aux améliorations apportées.

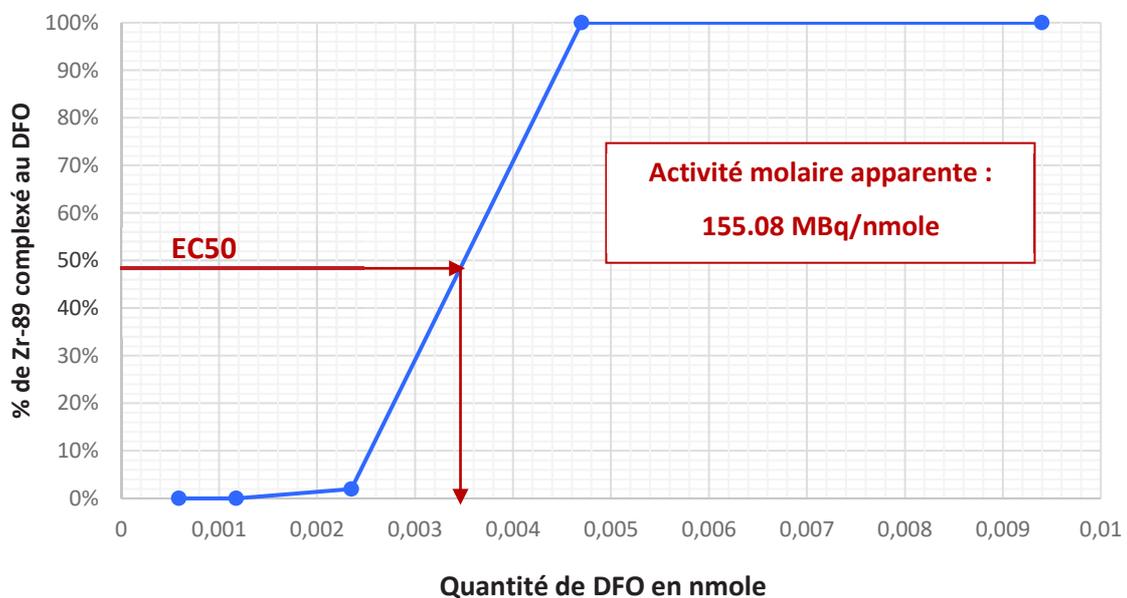


Figure 32 Courbe de complexation du DFO et du Zr-89 produit sous la forme oxalate et l'activité molaire apparente correspondante

3.4.3 Détermination de la pureté chimique

Les quantités d'impuretés en métaux dans la solution de chlorure de Zirconium-89 de Mars 2019 jusqu'à Décembre 2020 ont été analysées par ICP-MS. Bien qu'il ait été démontré qu'un rinçage accru réduisait significativement la masse de Y dans le produit final, on en retrouve. La masse de Fe n'a pas été observée car sous la valeur limite de détection. L'abondance du Nb en tant qu'impureté de métal à l'état de trace est ostensiblement due à la pièce de la cible sur laquelle est pulvérisé du ^{nat}Y . Après régularisation des données par soustraction du bruit de

fond et les coefficients de dilution, nous obtenons le **Tableau 5** (n=1 pour chaque échantillon). On peut observer une nette amélioration grâce à un rinçage plus prononcé de la résine ce qui a permis d'éliminer une grande quantité d'Yttrium et de zirconium naturel dans le millilitre d'actif produit.

Tableau 5 Analyses ICP-MS des dernières méthodes de production du Zirconium-89 (données en ppm)

	Y-89	Zr-90	Al-27	Fe-56	Nb-93	Cr-53	Cu-63	Zn-66	Mo-95
03/19	363	133	<25	<566	296,33	14,3	22,63	2136	27,6
07/19	0,01	0,2	<25	<566	747	0,09	0,55	69,81	0,01
12/19	1,96	0,18	<25	<566	507	0,10	0,09	4,19	0,01
11/20	3,68	0,10	<25	<566	1194	0,10	0,07	21,71	0,01
12/20	3,86	0,08	<25	<566	168	0,10	8,99	7,59	0,01

On peut comparer avec la méthode de production de Suzanne Lapi¹⁹ (**Tableau 6**), seule production utilisant le même système de pièce pulvérisée. On observe une quantité conséquente en Yttrium-89 qui proviendrait de la résine fonctionnalisée à la main. Dans le **Tableau 6**, nous pouvons aussi comparer mes résultats avec ceux présentés par l'équipe de Guérin B., et al.²³. Leur méthode de production utilise une couche d'Yttrium pressée sur une pièce d'aluminium. Ils montrent une haute activité molaire apparente de 150 ± 34 GBq/ μ mol.

Tableau 6 Analyses ICP-MS (données en ppm)

	Y-89	Zr-90	Al-27	Fe-56	Nb-93	Cu-63	Zn-66	Mo-95
Guérin ,B. et al. (n = 3)	<0,44	<4,17	<0,8	<4,17	Pas analysé	<1,0	<4,6	<1,0
Lapi, S. et al. (n = 3)	2,21	1,08	900	900	<Limite de détection	Pas analysé	Pas analysé	Pas analysé

3.5 Conclusion

L'optimisation des volumes et des concentrations ont permis d'obtenir une hausse des valeurs en AMA entre la production de Mars 2019 et Décembre 2020 que l'on trouve dans le **Tableau 7**. La méthode de production du Zirconium-89 via une cible d'Yttrium naturel pulvérisée sur une pièce de Niobium permet de produire avec d'excellents rendements de récupération le Zirconium-89. La pureté radiochimique et chimique sont suffisamment élevées pour des études de chélation. D'autres études sont nécessaires pour diminuer la quantité en Yttrium dans le flacon de récupération. Cet automate ainsi que cette méthode de purification permettent de produire à la demande les deux formes du Zirconium-89 les plus utilisées. Il serait intéressant d'utiliser une nouvelle résine permettant en une étape de produire du $[^{89}\text{Zr}][\text{ZrCl}_4]$ via une seule résine, la résine TBP afin de valider ce concept²⁴.

Tableau 7 Tableau récapitulatif des productions de Zirconium-89 entre Mars 2019 et Décembre 2020

Radioisotope produit	Zirconium-89
Formulation et pH	Acide oxalique 1M, pH < 2
Rendement global de production	71 ± 8 %
Activité Molaire Apparente	125 ± 30 GBq/μmol
Concentration d'actif	2077 ± 600 MBq/mL
Contaminant froid	Yttrium-89 et Niobium-93

4 Bibliographie

1. Brasse, D. & Nonat, A. Radiometals: towards a new success story in nuclear imaging? *Dalton Trans.*, **2015**, 44, 4845–4858 (2015).
2. Link, J. M., Krohn, K. A. & Eary, J. F. ^{89}Zr for antibody labeling and positron emission tomography. *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **1986**, 23, 1297–1298
3. Dejesus, O. T. & Nickles, R. J. Production and purification of ^{89}Zr , a potential PET antibody label. *Int. J. Rad. Appl. Instrum.*, **1990**, 41, 789–790
4. Meijs, W. E., Herscheid, J. D. M., Haisma, H. J. & Pinedo, H. M. Evaluation of desferal as a bifunctional chelating agent for labeling antibodies with Zr-89. *Int. J. Rad. Appl. Instrum.*, **1992**, 43, 1443–1447
5. Herscheid, J. D. M., Vos, C. M. & Hoekstra, A. Manganese-52m for direct application: A new $^{52}\text{Fe}/^{52\text{m}}\text{Mn}$ generator based on a hydroxamate resin. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **1983**, 34, 883–886 (1983).
6. Baroncelli, F. & Grossi, G. The complexing power of hydroxamic acids and its effect on the behaviour of organic extractants in the reprocessing of irradiated fuels—I the complexes between benzohydroxamic acid and zirconium, iron (III) and uranium (VI). *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1965**, 27, 1085–1092
7. Barocas, A., Baroncelli, F., Biondi, G. B. & Grossi, G. The complexing power of hydroxamic acids and its effect on behaviour of organic extractants in the reprocessing of irradiated fuels—II: The complexes between benzohydroxamic acid and thorium, uranium (IV) and plutonium (IV). *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1966**, 28, 2961–2967
8. Holland, J. P., Sheh, Y. & Lewis, J. S. Standardized methods for the production of high specific-activity zirconium-89. *Nucl. Med. Biol.*, **2009**, 36, 729–739
9. Pandey, M. K., Engelbrecht, H. P., Byrne, J. F., Packard, A. B. & DeGrado, T. R. Production of ^{89}Zr via the $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ reaction in aqueous solution: Effect of solution composition on in-target chemistry. *Nucl. Med. Biol.*, **2014**, 41, 309–316
10. Pandey, M. K. et al. Improved production and processing of ^{89}Zr using a solution target. *Nucl. Med. Biol.*, **2016**, 43, 97–100
11. Dias, G. M. et al. ^{89}Zr for antibody labeling and in vivo studies – A comparison between liquid and solid target production. *Nucl. Med. Biol.*, **2018**, 58, 1–7
12. de Goeij, J. J. M. & Bonardi, M. L. How do we define the concepts specific activity, radioactive concentration, carrier, carrier-free and no-carrier-added? *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **2005**, 263, 13–18

13. McCarthy, D. W. et al. Efficient production of high specific activity ^{64}Cu using a biomedical cyclotron. *Nucl. Med. Biol.*, **1997**, 24, 35–43
14. Degiovanni, A. et al. Emittance measurements at the Strasbourg TR24 cyclotron for the affition of a 65 MeV LINAC booster. [undefined /paper/emittance-measurements-at-the-strasbourg-tr24-for-a-Degiovanni-Amaldi/d975f89ca15782c6b28366d951addfacabed2097.](https://arxiv.org/abs/1907.09755), **2013**
15. TR-24 Cyclotrons, PET, SPECT Radioscopes - Advanced Cyclotron Systems | ACSI - Advanced Cyclotron Systems Inc. <https://advancedcyclotron.com/cyclotron-solutions/tr24>.
16. Pellicoli, M. et al. Automatic system of production, transfer and processing of coin targets for the production of metallic radioisotopes. *AIP Conference Proceedings*, **2007**, 1845, 020017 (2017).
17. Lin, M., Mukhopadhyay, U., Waligorski, G. J., Balatoni, J. A. & González-Lepera, C. Semi-automated production of ^{89}Zr -oxalate/ ^{89}Zr -chloride and the potential of ^{89}Zr -chloride in radiopharmaceutical compounding. *Applied Radiation and Isotopes*, **2016**, 107, 317–322
18. O’Hara, M. J., Murray, N. J., Carter, J. C., Kellogg, C. M. & Link, J. M. Hydroxamate column-based purification of zirconium-89 (^{89}Zr) using an automated fluidic platform. *Applied Radiation and Isotopes*, **2018**, 132, 85–94
19. Queern, S. L. et al. Production of Zr-89 using sputtered yttrium coin targets. *Nuclear Medicine and Biology*, **2017**, 50, 11–16
20. https://www.triskem-international.com/iso_album/poster_zr_resin_radiopharmacy.pdf
21. Wooten, A. L. et al. Routine Production of ^{89}Zr Using an Automated Module. *Appl. Science*, **2013**, 3, 593–613
22. Avila-Rodriguez, M. A., Wilson, J. S., Schueller, M. J. & McQuarrie, S. A. Measurement of the activation cross section for the (p,xn) reactions in niobium with potential applications as monitor reactions. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, **2018**, 266, 3353–3358
23. Alnahwi, A. H., Tremblay, S. & Guérin, B. Comparative Study with ^{89}Y -foil and ^{89}Y -pressed Targets for the Production of ^{89}Zr †. *Applied Sciences*, **2018**, 8, 1579
24. Graves, S. A. et al. Evaluation of a chloride-based ^{89}Zr isolation strategy using a tributyl phosphate (TBP)-functionalized extraction resin. *Nucl Med Biol.*, **2018**, 64, 1–7

1 Le ^{89}Zr -ImmunoTEP

1.1 Généralités

Pour témoigner du caractère labile du radionucléide, prenons l'étude de Bailly, C. *et al.* qui a comparé le ^{89}Zr et le ^{64}Cu *in vivo*. Dans le cadre du myélome multiple, le groupe de différenciation 138 (CD138) est un très bon marqueur d'identification de la maladie en imagerie TEP. L'anticorps anti-CD 138 nommé 9E7.4 est conjugué avec l'acide 1,8-*N,N'*-Bis-(carboxyméthyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane (TE2A) pour le Cuivre et le DFO pour le Zirconium respectivement. Des images TEP ont été comparées en mettant l'accent sur l'absorption des lésions osseuses¹. Le premier constat simple est qu'il n'est pas possible de faire un suivi TEP sur une souris à plus d'une semaine pour le Cuivre-64 et que les images faites avec le Zirconium-89 révèlent une image à fort contraste tissus sains/atteints. Le problème vient de l'absorption graduelle osseuse en Zirconium-89. Les images TEP faites sur des souris s'approchent de ce qui a été fait plus tôt où la caractéristique du Zirconium-89 de subir une transchélation ou transmétallation a été mis en avant². En effet, le Zirconium dit « libre » (sans transporteur ou complexe) c'est-à-dire sous forme citrate, oxalate, oxalate, phosphate ou chlorure se trouve majoritairement dans les os (études *ex vivo*, >10% ID/g, **Figure 33**) plus exactement au niveau des fonctions hydroxyapatite recouvrant les os après injection chez une souris saine, en intra-veineuse (*i.v.*).

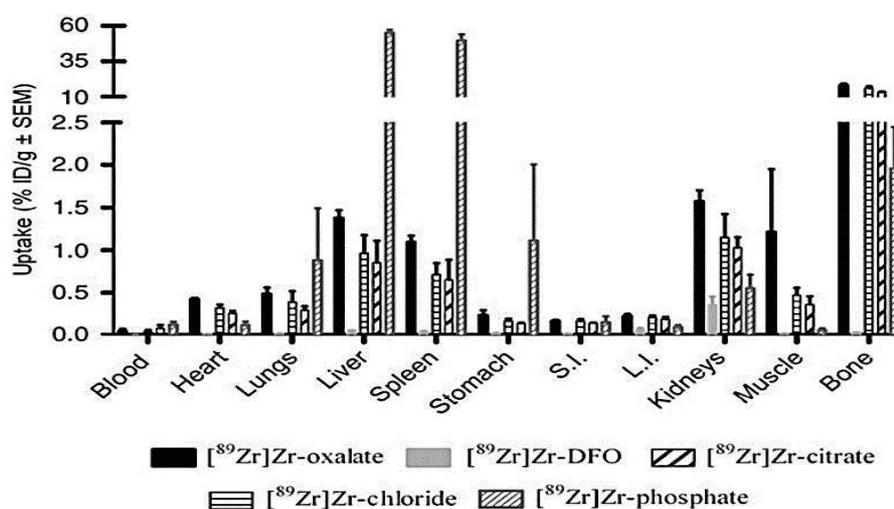


Figure 33 Biodistribution *ex vivo* de différentes préparations de Zirconium-89 six jours après injection *i.v.*

Cette captation des os, dans le cas d'un patient n'ayant pas de myélome entraînerait une radiation sur des organes sains, l'impact clinique n'a cependant pas été déterminé. Chaque papier en ImmunoTEP décrit une captation au niveau des os d'une radioactivité anormale. Elle est attribuée arbitrairement à la transchélation.

1.2 Propriétés du Zirconium

1.2.1 Etat de l'art

Chimiquement, la transchélation s'explique par l'état cationique du Zirconium, en effet, le Zirconium est un cation dur avec une préférence pour les donneurs d'électrons forts. On retrouve dans cette liste l'azote formant les fonctions chimiques amine, l'oxygène des fonctions hydroxy- et cétones. Elles sont nommées bases de Lewis dures car elles réagissent avec les acides de Lewis durs tel que les cations métalliques. Dans le cadre du Zr(+IV), il peut entreprendre jusqu'à un maximum de 8 coordinations électroniques. Simplement, le Zr(+IV) pour combler son déficit électronique aura besoin d'un ligand polydentate avec 6 à 8 atomes donneurs. Ce qui correspond à des charges 3- ou 4- lorsque le chélatant est déprotoné pour minimiser la charge du complexe résultant. Des études cristallographiques aux rayons X ont été entreprises dès les années 60 par l'équipe de Hoard, J. L. Elles ont confirmé la stéréochimie du complexe tétrakisoxalatozirconate (IV) possédant une charge globale de -4^3 . Cette charge déjà décrite plus haut est due aux solutions acides dans lesquelles le cation zirconate est plongé. La distance entre le métal et les oxygènes donneurs dont la structure dépend est de 2,244 ; 2,216 ; 2,192 et 2,144 Å. Plus tard, l'équipe de Dhungana, S., confirmera l'ordre de grandeur des distances entre ces deux atomes dans le cadre d'un ligand malonate. Le malonate se différencie de l'oxalate par un carbone séparant les deux fonctions carboxyliques composant ces ligands. Les distances sont de 2,091 à 2,288 Å et cela démontre la *souplesse* de ce type de ligand à complexer efficacement le cation +IV⁴. Il n'a été à ce jour impossible de déterminer la cristallographie aux rayons-X du complexe [Zr(DFO)] alors que de telles analyses sont disponibles pour le [Fe(+III)(DFO)]. Les études cristallographiques de tels complexes demandent du temps. Le complexe [Zr(DFO)] présente des problèmes de solubilité dans le méthanol ou l'éthanol. L'évaporation de ces solvants petit à petit faisant croître le cristal rend extrêmement compliqué la formation d'un réseau cristallin. Ce réseau peut être mal défini ou

instable, ce qui rend la manipulation aux RX impossible. Brechbiel, M. W. et son équipe se sont alors intéressés à la fonction chélatante seule du DFO. En utilisant un acide hydroxamique simple : l'acide acétohydroxamique qui fut complexé en étant mis en excès, par reflux, dans le méthanol avec du Zr(IV)⁵. Après formation du cristal, la cristallographie par rayon-X a démontré que la structure électronique du cation préférerait bien 8 atomes donneurs d'électrons. On utilise un outil informatique pour déterminer la cristallographie du complexe : la Théorie de la Fonctionnelle de la Densité (*DFT pour Density Functional Theory* en anglais). Les expériences DFT sont faites sur programme informatique de chimie quantique. Gaussian03 fut utilisé par l'équipe de Lewis J. S. en 2010⁶. Dans cette étude DFT, ils ont déterminé théoriquement la structure du complexe $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{HDFO})]^{2+}$ la plus stable. Pour cela, la géométrie des différentes liaisons chimiques a permis de déterminer la structure ayant la configuration thermodynamique la plus stable (en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Toutes ces structures se trouvent en **Figure 34**.

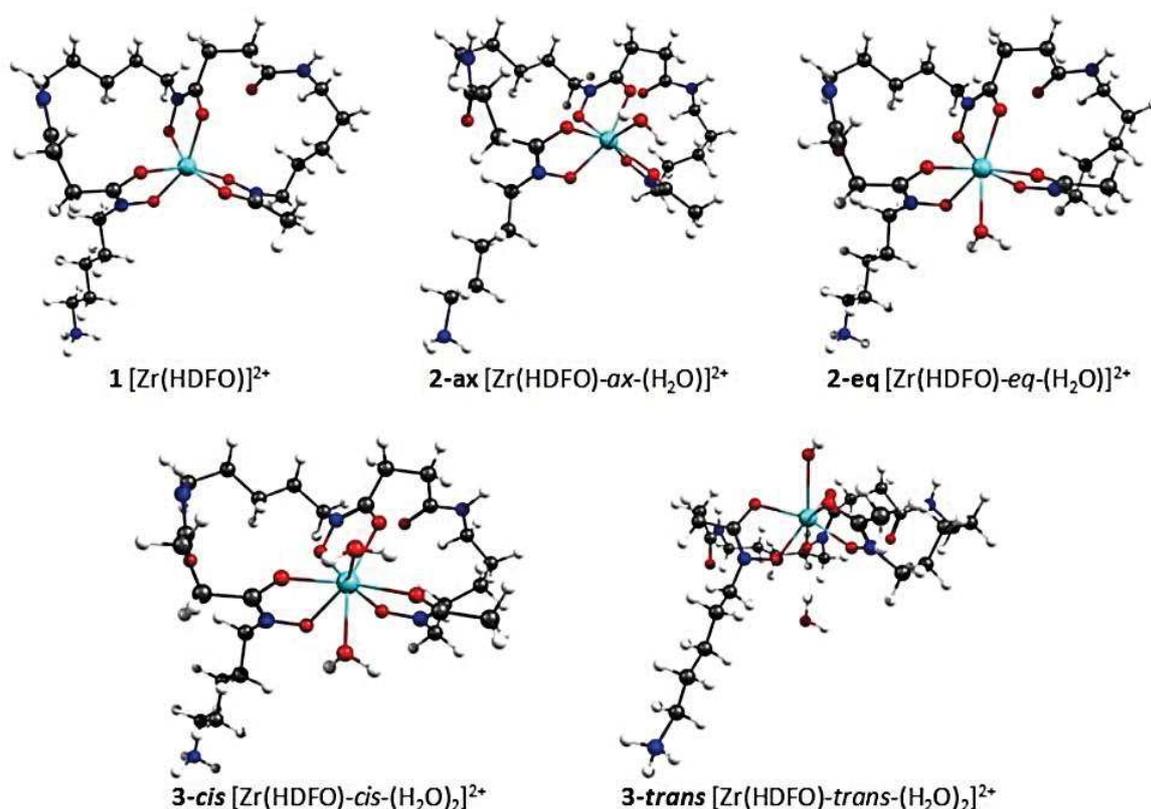


Figure 34 Structure déterminée par DFT du Zirconium(IV) et du HDFO, forme ammonium en bout de chaîne⁶.

En effet, ils ont d'abord déterminé par calculs l'énergie du complexe $[\text{Zr}(\text{HDFO})]^{2+}$ puis ils ont ajouté d'abord une molécule d'eau pour passer du Zr coordonné 6 fois à 7. La molécule d'eau peut alors se trouver soit en *axial* du $[\text{Zr}(\text{HFDO})]^{2+}$ donnant la cristal **2-ax**. Elle peut aussi se trouver théoriquement sur le plan équatorial donnant le réseau cristallin **2-éq**. La coordination octadentate du cation avec deux molécules d'eau, particulièrement pour la **3-cis** est plus stable de $14 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ par rapport à l'équilibre **2-ax** \leftrightarrow **2-éq**. Pour conclure simplement, le complexe $[\text{Zr}(\text{DFO})]$ étant le plus stable est celui stabilisé avec deux molécules d'eau en cis. Ces deux molécules endogènes provenant du milieu entraîneraient une instabilité du complexe due au caractère labile de celles-ci. Ce type d'observation théorique rejoint donc ce qui a été vu de manière pratique lors des transchélation et expliquerait l'accumulation croissante dans l'os. D'autres arguments peuvent provenir de la chimie inorganique où l'instabilité d'un complexe métallique est liée à la réduction du métal utilisé. L'hypothèse que le Zr (IV) soit réduit dans la solution et dans un organisme peut être posé. Néanmoins, la réduction $\text{Zr}^{4+}/\text{Zr}^{3+}$ se fait entre -1,4 à -1,5 Volts. Cette réduction est alors bien loin des capacités d'oxydo-réduction proposées par les organismes. La liste des potentiels redox sont disponibles dans *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology* (Lundblad, R. L., Macdonald, F., 2018, 5th Edition, CRC Press). Typiquement, à pH 7, le couple oxydo-réducteur ayant le potentiel E^0 le plus bas est le couple acétate/acétaldéhyde ($E^0 = -0,58 \text{ V}$). Si on prend l'exemple de la Ferrédoxine qui est la protéine ayant le potentiel le plus bas à pH 7 (-0,49 V), celle-ci ne pourrait pas réduire le Zirconium (+IV).

1.2.2 Conclusion

Pour conclure avec les propriétés du Zirconium et notamment sa capacité à être transchélaté vers les os, il reste une autre hypothèse, celle dont le Zr-89 soit finalement transchélaté vers un autre complexe de l'organisme, c'est-à-dire que le DFO ne serait pas un ligand assez puissant pour maintenir le cation. Expérimentalement, une activité connue du Zirconium-89 est complexé au DFO puis ce complexe est confronté soit à une solution d'EDTA ou DTPA 10, 100, 500 ou 1000 fois plus concentrées. On pourra alors suivre *in vitro* la transchélation du DFO vers l'EDTA/DTPA ou non. Par exemple, l'équipe Franscesconi L. C *et al.*⁷ a pu observer la libération du Zr-89 à pH 7 avec 100 fois de l'EDTA en excès. Plus précisément, le DFO perdrait le Zr-89 au bout de 3h à hauteur de $1,2 \pm 0,8\%$ au bout de 7 jours d'incubation.

D'autres études de *challenge* peuvent être faites comme celle de transmétallation où cette fois on confronte le complexe [⁸⁹Zr][Zr(DFO)] à des solutions contenant de concentrations cationiques en excès. Les cations utilisés peuvent être le Cu(II), le Fe(III), le Ni(II) ou le Ga(III) etc. c'est à dire tous les cations pouvant être complexé par le DFO. Ces *challenges* seront résumés dans un tableau plus tard.

1.3 Liste des ligands du Zr et imagerie TEP

1.3.1 Les dérivés de la Desferrioxamine-B

Nous avons vu que la fonction hydroxylamine composant le DFO (**A.**, **Figure 35**) était la fonction chélatante de choix (6 atomes d'oxygènes donneur dont 3 anioniques et 3 neutres). Il suffit de constater le nombre de ligands bi-fonctionnalisés ou non qui sont synthétisés ces dernières années pour comprendre l'intérêt des chimistes vis-à-vis du Zirconium-89. Le but de ces ligands est de compléter la demande d'octovalence du Zr(IV) et pour cela l'équipe de Patra, M. a synthétisé ce qui devient le nouveau standard en pré-clinique : le DFO* (**B.** sur la **Figure 35**)⁸. Le DFO* apporte la dernière fonction hydroxylamine par réaction de couplage entre le sel de Desferrioxamine commerciale et un building block carboxylate⁹. Ce building block possède une fonction hydroxylamine protégée et peut être synthétisé en six étapes avec un bon rendement (82% sur toutes les étapes). Ce dérivé du DFO permet d'être bioconjugué à un anticorps monoclonal et a été couplé au trastuzumab. Ce nouvel outil immunoTEP a justement été testée *in vivo*, et la biodistribution indiquerait une captation au niveau des os plus basse que le DFO-Trastuzumab à 144h *post-injection*¹⁰. On peut alors facilement comprendre pourquoi ce nouvel AcM radiomarqué au ⁸⁹Zr est entré depuis en phase clinique. Un autre dérivé du DFO a été synthétisé très récemment, le DFO-Cyclo* (**C.** sur la **Figure 35**).

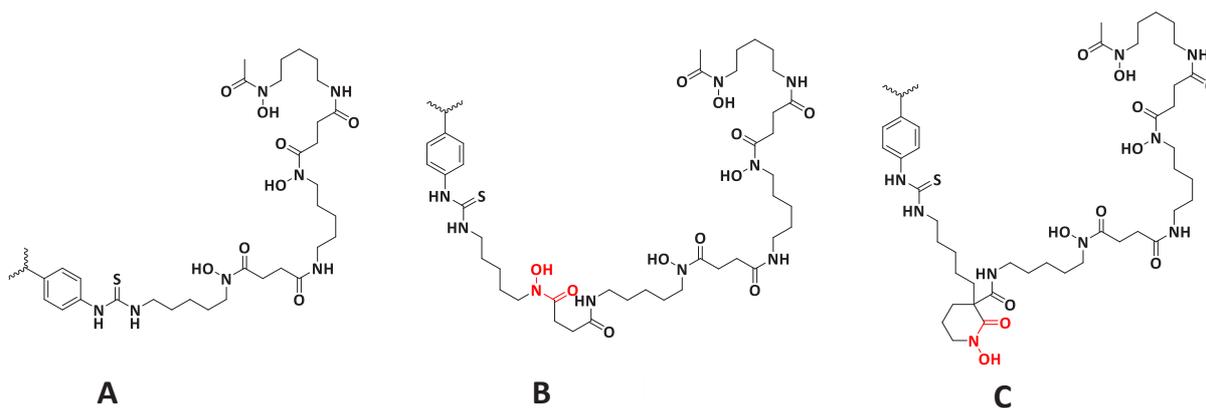


Figure 35 Le DFO bifonctionnalisée (A) et ses deux dérivés bifonctionnalisés : le DFO* (B) et le DFO-Cyclo* (C) dans le cas où le ligand est conjugué à un anticorps par réaction entre une lysine libre et la fonction isothiocyanate.

Le DFO-Cyclo* possède le 7^{ème} et le 8^{ème} atome d'oxygène nécessaire à un ligand octadentate pour espérer être meilleur que le DFO. Ces oxygènes sont portés par le groupement chimique 1-hydroxypiperidine-2-one ou 1,2-PIPOH. L'intérêt de ce nouveau groupement chimique est de complexer un cation métallique par une fonction hydroxylamine cyclique à 6 membres (base du squelette type cyclohexane). Le groupement hydroxamate (a. de la **Figure 36**) quasi-plannaire du PIPOH impliquerait que le cycle aurait une conformation demi-chaise avec les deux O donneurs en cis (ou Z si anionique). Les électrons et le caractère rigide du cycle empêchant l'hydroxamate d'avoir une rotation sur son axe C-N.

L'échange b. de la **Figure 36** n'est donc plus vraie pour le PIPO⁻, forme basique du 1,2-PIPOH¹¹. Ainsi, le PIPOH ou plus exactement le PIPO⁻ serait plus basique que les hydroxylamines du DFO, par exemple.

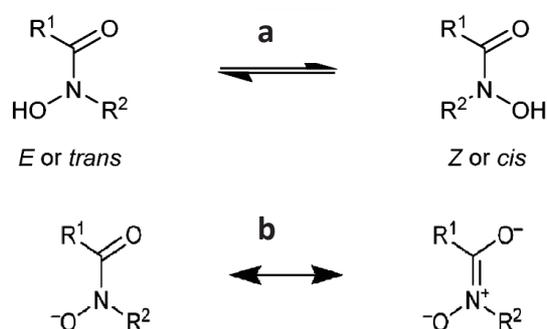


Figure 36 Forme de résonance d'une hydroxylamine (a) et résonance de sa forme anionique (b)¹¹

Ces faits ont été prouvés par spectrophotométrie par l'équipe de Sornosa-Ten qui démontra notamment par des complexes d'uranyle que la thermodynamique d'un complexe au PIPO^- serait meilleure (méthode d'électrophorèse d'affinité à capillaire). L'équipe de Chambron J.C. avait quelques années auparavant démontré l'affinité intéressante du PIPO^- envers le $\text{Zr}(+IV)$ par cristallographie aux rayons-X comme l'avait fait Brechbiel avec l'acide acétohydroxamique¹². La synthèse du DFO-Cyclo* se ferait avec l'intmédiaire du DFO* via la cyclisation intramoléculaire du *N*-benzyloxy carbamate (**Figure 37**)¹³.

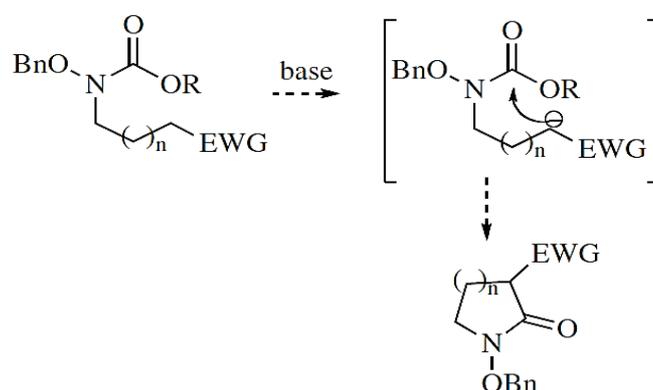


Figure 37 Cyclisation par une base forte, avec $n=3$ et EWG (groupe électroattracteur)¹³

Le dernier dérivé du DFO d'intérêt est le DFO-HOPO, en **Figure 38**, qui présente une bonne complexation malgré le fait qu'il n'existerait pas encore de version bifonctionnalisée. Le groupe HOPO ou 1,2-hydroxypyridinone est un cycle aromatique composé d'une hydroxylamine. Pour comparer avec le PIPOH , la conformation de la forme anionique de l'hydroxylamine est plane et orientée en *cis* (voir **Figure 37**).

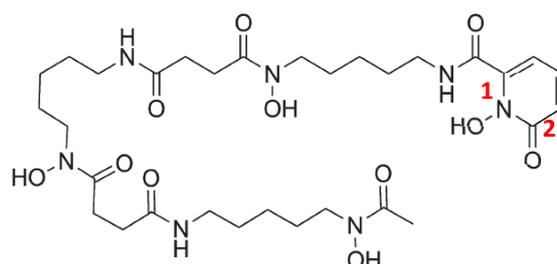


Figure 38 Dérivé de la DFO, le DFO-HOPO.

Composé synthétisé par réaction entre le DFO et le chlorure d'acyl en position 6 correspondant.

Lorsque le complexe $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO-HOPO})]$ est injecté dans un organisme, il va se retrouver dans tout l'organisme néanmoins la part de fixation dans les os est faible contrairement au $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO})]$ ¹⁴. Les expériences de stabilité *in vitro* de ces ligands avec l'isotope du Zirconium par *challenge* à l'EDTA en excès pourront être retrouvées en **Tableau 10** (page 87).

Très récemment, des études DFT ont été faites sur 23 ligands différents¹⁵ du Zr^{4+} par Holland J. P. Plus exactement, les constantes de formations ($\log\beta$) ont été déterminées et ainsi, un ligand dérivé du DFO se démarquerait en radiochimie ; l'oxoDFO*¹⁶. Cette molécule fut synthétisée par l'équipe de Gasser G. via surface solide, dont la méthode de synthèse est retranscrite en **Figure 39**.

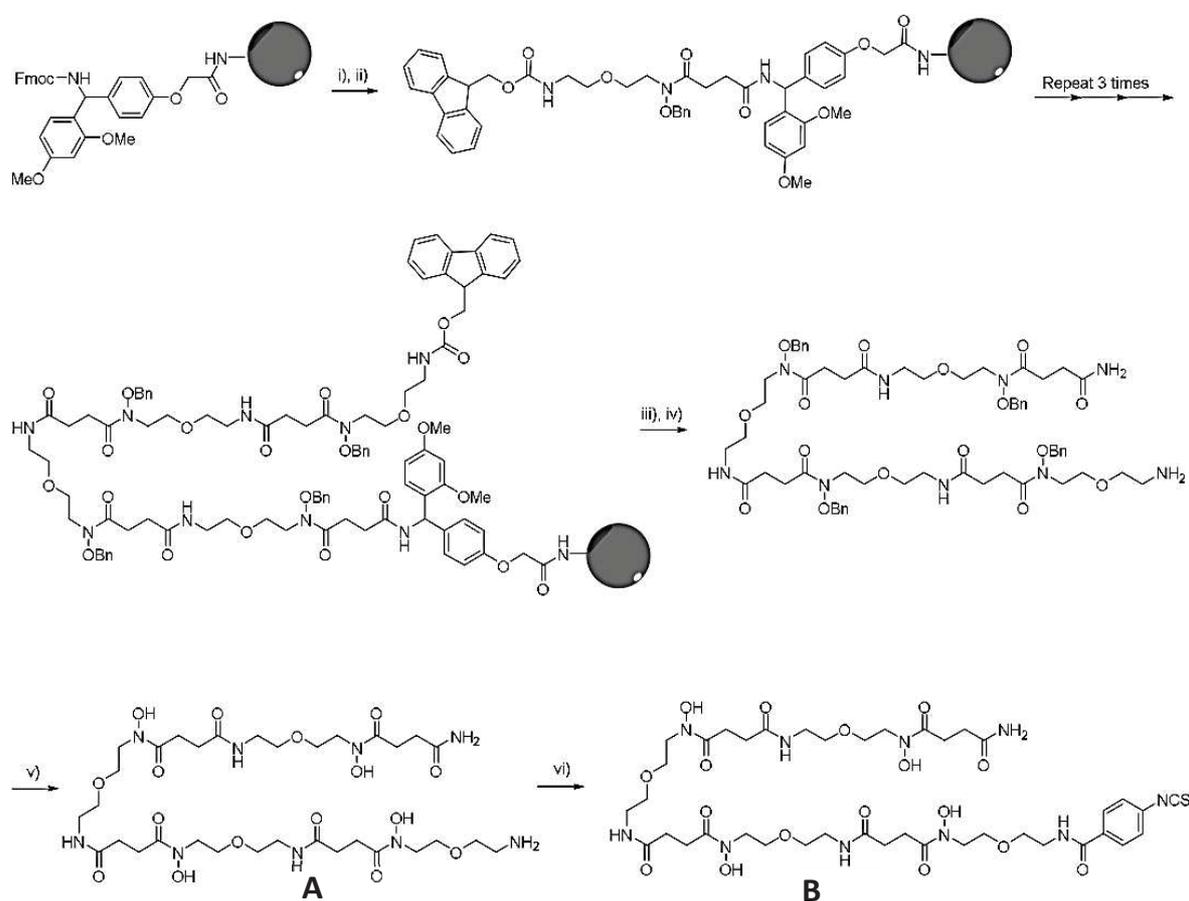


Figure 39 Synthèse assistée sur phase solide (SPPS) de l'oxoDFO* tel que présenté dans la littérature¹⁶
i) 20 vol.% piperidine/DMF ii) HATU, DIPEA/2,6-lutidine/DMF (3.5/3.5/93 : v/v/v) iii) 20 vol. % piperidine/DMF ; iv) TFA/TIPS/ H_2O (38/1/1 : v/v/v), 91% ; v) 10% Pd/C, H_2 , 5 bars, t.a., 4 h, 77% ; vi) acide 4-isothiocyanatobenzoïque, HATU, DIPEA, DMF, 12 h, t.a., N_2 , 15%

Cette synthèse sur phase solide est intéressante car elle nécessite peu d'étapes de purification. L'étape d'élongation a déterminé la répétition du couplage afin d'ajouter à chaque fois une fonction hydroxylamine. Ce type de synthèse est adapté pour produire de manière commerciale un ligand bifonctionnalisé prêt à l'emploi. Le but de cette molécule était d'augmenter sa solubilité globale, car le DFO* présente des problèmes de solubilité. C'est pourquoi le groupe *espaceur* R-(CH₂)₅-R entre chaque fonction R (hydroxylamine) a été remplacé par un groupement éther ou PEG : R-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-R.

Ce type de changement sur le squelette aurait l'avantage d'augmenter la solubilité globale de la molécule dans un premier temps. Il est possible de connaître expérimentalement la solubilité, ou le caractère hydrophile d'une molécule ou par une expérience de lipophilie caractérisant l'affinité chimique aux phases organiques *in silico* via le système *n*-octanol/PBS (pH 7,4). Ainsi, si on détermine le logP, plus il sera bas, plus l'affinité donc l'hydrophilie d'une molécule sera bonne. Le logD_{7,4}, désignant le logP au pH de 7,4, a beaucoup intéressé l'équipe de Briand M. qui a été déterminé à un certain pH. Pour exemple, le logD_{7,4} de la DFO* est de -0.4397. Pour le dérivé analogue oxoDFO* (**A** sur la **Figure 39**) et sa version bifonctionnalisée (**B** sur la **Figure 39**) de -1,5 ± 0,2 et -1,2 ± 0,1. On retrouve les expériences de LogD_{7,4} dans le **Tableau 8**. Il est notable de penser que les fonctions éthers de l'oxoDFO* rendraient plus flexibles les pinces chélatantes autour du Zr par modifications des espaceurs alkylés par un PEG (ou éther).

Tableau 8 Lipophilie de dérivés du DFO complexant du Zirconium-89. Dans le cas du radionucléide, la formule utilisée est $\log D = \log[(A_{\text{octanol}}) / (A_{\text{PBS 7,4}})]$ où A est l'Activité

Ligands	logD _{7,4}
[⁸⁹ Zr][Zr(DFO-NH ₂)]	-3,61 ± 0,2
[⁸⁹ Zr][Zr(DFO*-NH ₂)]	-3,54 ± 0,16
[⁸⁹ Zr][Zr(DFO-Cyclo*-NH ₂)]	-2,14 ± 0,1
[⁸⁹ Zr][Zr(DFO-HOPO)]	-0,87 ± 0,03

1.3.2 Les autres chélatants du Zirconium-89

1.3.2.1 Les chélatants cycliques

Dans la recherche incessante d'autres molécules ayant un fort pouvoir chélatant au cation +IV tel que le Zirconium, l'équipe de Zhai Chuangyan a pioché dans la bibliothèque des sidérophores naturels¹⁷. Ainsi, la Fusarine C (FSC, R=H représentée sur la **Figure 40**) est un des transporteurs naturels du Fer, elle a été utilisée en imagerie TEP (Gallium-68) et a été investiguée ainsi que sa forme bifonctionnalisée, la Triacetylfusarinine C (TAFC, R=COCH₃ représentée sur la **Figure 40**). Ce macrocycle ne présente que 3 fonctions hydroxylamines néanmoins il reste intéressant car il prouverait qu'un complexe cyclique est plus stable qu'un linéaire. Les résultats *in vitro* du **Tableau 8** démontrent une plus haute stabilité face à la transchélation. Ce ligand est disponible commercialement couplé à un tripeptide, le RGD et a été utilisé comme biovecteur pour les études *in vivo*. Néanmoins, l'image TEP indique une accumulation moins prononcée pour le FSC que le DFO, sans doute due à ce tripeptide.

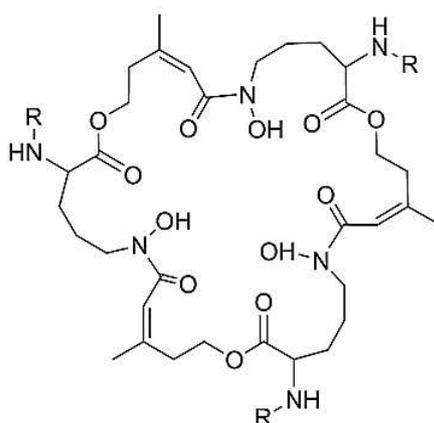


Figure 40 Ligand cyclique naturel testé *in vitro* pour le radiomarquage d'anticorps au Zirconium-89

Les études de transchélation *in vitro*, du FSC par exemple, démontrent une haute stabilité cinétique due à la nature cyclique d'un ligand qui empêcherait toute approche de molécules extérieure sur le métal central. Néanmoins, ce cycle ne possédant que 6 fonctions chélatantes ne serait pas optimal pour des études *in vivo* plus longues. Pour le moment, seules des images à T+24h *p.i.* ont été faites par imagerie TEP. De plus, la présence des 3 sites de bifonctionnalisation n'est pas souhaitable pour sa conjugaison avec un anticorps. Dernier point, la conjugaison se fait par complexation au Fe³⁺ avec traitement à l'EDTA, et des traces de cette chimie peuvent être problématique pour des études pré-cliniques.

1.3.2.2 Les ligands à bases HOPO

Nous avons vu que la fonction chimique 1,2-HOPO permettait de complexer le Zr-89. C'est notamment dû au pKa très élevé de l'hydroxypyridinone (pKa = 5,8). Cette capacité à s'ioniser rapidement à pH neutre et acide a intéressé Deri M. A. *et al.* qui a synthétisé un ligand linéaire : le 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)¹⁸. Dans un premier temps, la synthèse de ce ligand fut présentée en cinq étapes et elle débute par la préparation d'un chlorure d'acide du 1,2-HOPO protégé (groupe benzyle protégeant l'éthanolamine en position 1 du cycle, **Figure 41**).

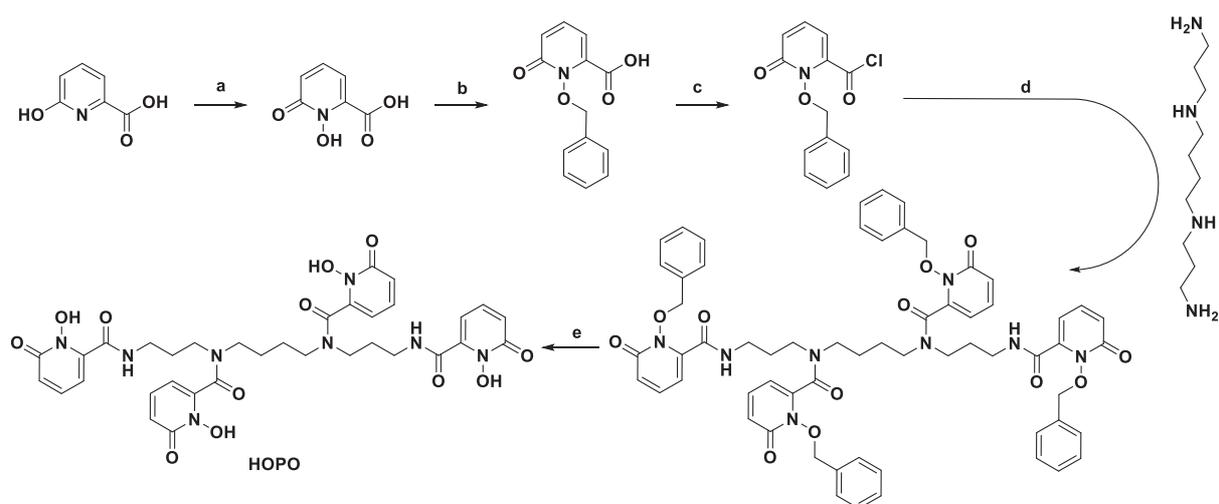


Figure 41 Synthèse du 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) ou HOPO **a.** CH_3COOOH (1,2 éq.), AcOH, TFA, 1h, 79% ; **b.** BnCl (1,2 éq.), K_2CO_3 (2,0 éq.), CH_3OH , 16h, 60°C, 92% ; **c.** $(\text{COCl})_2$ (2,2 éq.), CH_2Cl_2 , 0-25°C, 6h ; **d.** spermine (0,17 éq.), TEA (2,0 éq.), CH_2Cl_2 , 0 - 25°C, 24h, 81% ; **e.** H_2 , Pd/C, 42%

Le squelette de la molécule qui est la spermine réagirait sur les carbonyles pour former le 3,4,3-(LI-1,2-HOPOBn). Après débenzylation par H_2 catalysé au palladium sur charbon, des études *in vitro* du complexe avec du ^{89}Zr ont été réalisées. Par exemple, la stabilité du complexe (**A** en **Figure 42**) est élevée (>99%) à une variété de pH dont des pH très acides. En effet, à pH 5 le complexe reste très stable là où le DFO n'est pas compétitif (environ 3% intact après 24h). Les résultats des études de transchélation sont supérieurs au DFO. Des études cristallographiques ont encore une fois révélé le caractère octadentate du cation (**B** en **Figure 42**). La biodistribution révèle que le complexe est éliminé de l'organisme par voie rénale et très peu de Zirconium radioactif se trouve dans les os durant la métabolisation, c'est qui a finalement conforté la même équipe à travailler sur une version bifonctionnalisée le *p*-SCN-Bn-HOPO¹⁹.

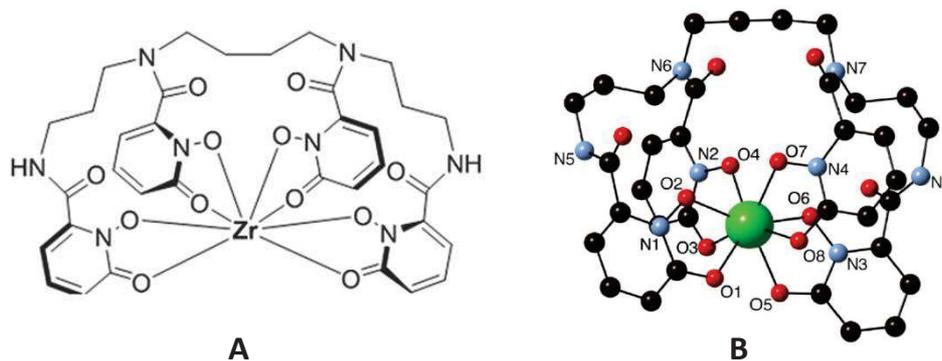


Figure 42 Schéma représentant le complexe Zr-HOPO et le cristal déterminé expérimentalement par cristallographie aux rayons X¹⁸.

La synthèse de celui-ci est longue et fastidieuse et comme l'évoquent les auteurs du papier, les étapes de déprotection donnent un rendement très bas sur 9 étapes. Malgré tout, la molécule fut synthétisée elle aussi depuis la spermine et bioconjuguée au Trastuzumab pour des études des stabilités *in vitro* et *in vivo*. Lorsque le traceur bioconjugué est radiomarqué au Zirconium-89, il montre une stabilité dans du sérum à 89,2% au bout de 7 jours, elle est de 94,7% pour le [⁸⁹Zr][Zr(DFO)@AcM]. Comme on peut le voir sur les images TEP (A) de la **Figure 44**, la netteté de l'image et l'intensité en activité de 72h à 168h *p.i.* sont possiblement liées à une stabilité plus élevée du ligand HOPO. D'après les auteurs, il n'y a pas de différences notables entre l'immunoréactivité de l'AcM qu'il soit lié au DFO ou à l'HOPO, simplement, le fait que le ratio en activité tumeur/os soit plus élevé pour le DFO diminuerait le contraste de l'image. Les études de biodistribution (B de la **Figure 43**) révèlent une quantité constante de 3 à 14 jours dans les os de Zirconium-89 pour le HOPO, 2,4% ID/g contre 17,4% ID/g pour le traceur conjugué au DFO.

Les molécules bi-cycliques ont été très étudiées depuis la découverte de ces fonctions hydroxypyridinone ou phtalimide. On pourrait aussi noter les complexes 2,3-HOPO dérivés de la structure du TAM-1 et TAM-2 (**Figure 44**). Ces complexes lorsque bioconjugués et radiomarqués au Zr-89 n'offrent malheureusement pas de diminution d'accumulation osseuse par rapport au DFO. Leur stabilité *in vitro* pouvait prédire ce type de résultat, on pourra visualiser à la fin de cette liste un tableau récapitulatif des expériences *in vitro* de transchéliation des différents ligands vus en **Tableau 10** (page 87).

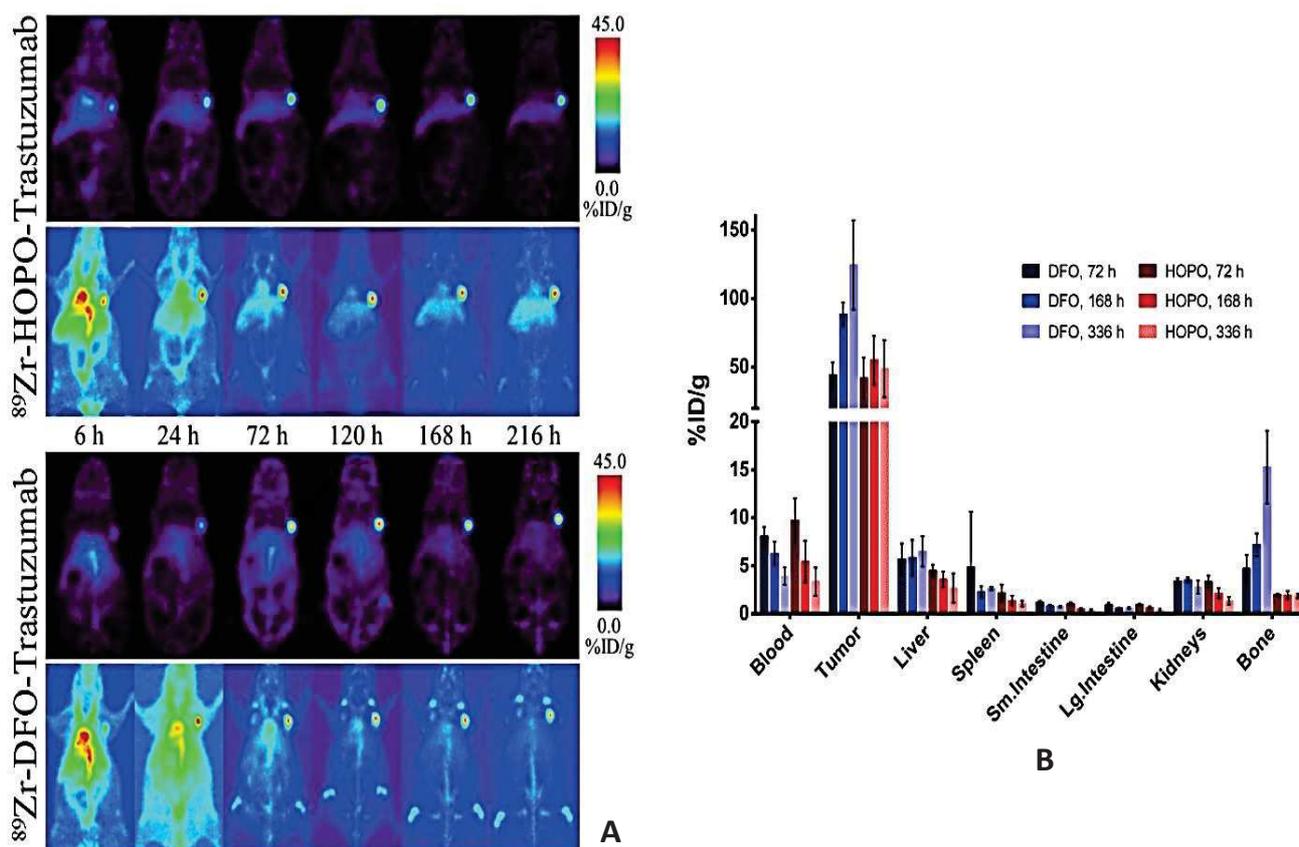


Figure 43 A. Imagerie TEP du $^{89}\text{Zr}[[\text{Zr}(\text{HOPO})@\text{Trastuzumab}]$ (en haut) et $^{89}\text{Zr}[[\text{Zr}(\text{DFO})@\text{Trastuzumab}]$ (en bas) dans le même modèle murin greffés aux BT474 dans l'épaule. L'intensité en %ID/g représentant une concentration en activité, rouge étant la concentration la plus forte. **B.** Etudes de biodistribution de ces modèles au bout de 3, 7 et 14 jours. (Image tirée du papier sur le p-SCN-Bn-HOPO ; Deri, M. A., et al., *Bioconjugate. Chem.*, 2015, 26, 2579-2591)

D'autres analogues basés sur des groupes bidentates cycliques existent, tel que la 2,3-dihydroxyterephthalamide (ou TAM). La littérature est complète concernant la synthèse de nouveaux agents thérapeutiques pour traiter la surcharge en fer²⁰. La bibliothèque des sidérophores du Fer définit par des fonctions chimiques bien définies rend le choix de synthèse de ligands potentiels pour le Zirconium attractif. C'est pourquoi l'équipe de Wadas, T. J *et al.* s'est intéressée à un macrocycle composé de 4 groupes terephthalamide²¹ (**Figure 44**). Ce ligand a été synthétisé en 4 étapes qui peuvent se résumer au couplage d'un groupement lysine sur des 1,4-phenylbisisothiocyanate d'un squelette hexamine. En fin de synthèse, les molécules TAM-1(Bn) et TAM-2(Bn), soit les intermédiaires protégés sont générés ensemble et des purifications plus longues ont été entreprises afin de séparer les deux composés.

La complexation de zirconium froid et les analyses LC-MS ont permis de prouver le caractère octadentate de ce type de complexe. Les études *in vitro* et l'imagerie TEP ont démontré une haute stabilité de ce type de complexe. En effet, l'accumulation osseuse est comparable au DFO.

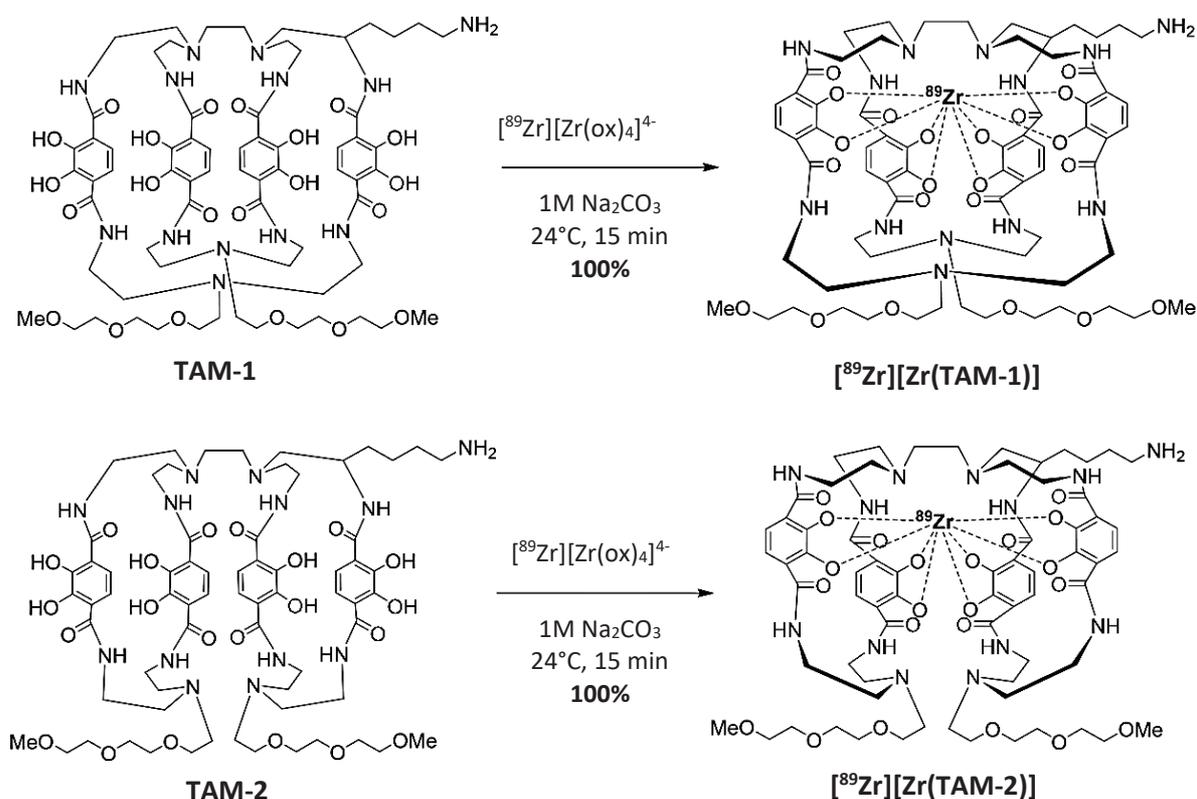


Figure 44 Radiomarquage des ligands TAM-1 et TAM-2, deux ligands bifonctionnalisés²¹.

La biodistribution du $[\text{}^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{TAM-1})]$ et de $[\text{}^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{TAM-2})]$ est plus élevée dans le foie et les reins que pour le $[\text{}^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO})]$ (**Tableau 10**, page 87). D'après Wadas, T. J., cette accumulation élevée dans le foie à 72h *p.i.* $[\text{}^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{TAM-1})]$ contre $[\text{}^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{TAM-2})]$ contre $[\text{}^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO})]$ soit $0,382 \pm 0,075$ (%ID/g), $0,953 \pm 0,076$ (%ID/g) et $0,066 \pm 0,009$ (%ID/g) respectivement entraînerait une rétention plus élevée dans les reins, dû à un phénomène multifactoriel. En résumé, l'accumulation élevée à 72h *p.i.* du $[\text{}^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{TAM-1})]$ contre $[\text{}^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{TAM-2})]$ contre $[\text{}^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO})]$ soit $4,767 \pm 0,762$ (%ID/g), $24,375 \pm 8,64$ (%ID/g) et $0,689 \pm 0,098$ (%ID/g) dans les reins est liée à l'activité du foie, l'environnement acide des reins changeant la structure des complexes. Pour pallier ce problème, ils étudient la structure du complexe et plus exactement des groupements PEG ainsi que la bioconjugaison à un anticorps qui pourrait réduire ces phénomènes.

1.3.3 Comparaison directe d'un même squelette linéaire et cyclique

Nous savons que le cation $Zr(+IV)$ possède un rayon ionique de 85pm et son rayon de covalence est de 1.48pm. Avec ces données seules, nous avons vu qu'on pouvait déterminer théoriquement l'équilibre thermodynamique d'un ligand, avant même de l'avoir synthétisé. L'équipe du Dr. Guérard en 2014 a essayé expérimentalement de déterminer le squelette spatialement adéquat au cation²². Brièvement, en faisant varier la chaîne carbonée alkylée entre deux groupes hydroxylamines de 5, 6 et 7 carbones il est possible d'en conclure la géométrie adaptée. De plus, pour le même nombre de carbones entre chaque groupe, ils ont synthétisé deux variantes : des ligands linéaires L5, L6 et L7 ainsi que C5, C6 et C7 pour les formes macrocycliques correspondantes (**Figure 45**).

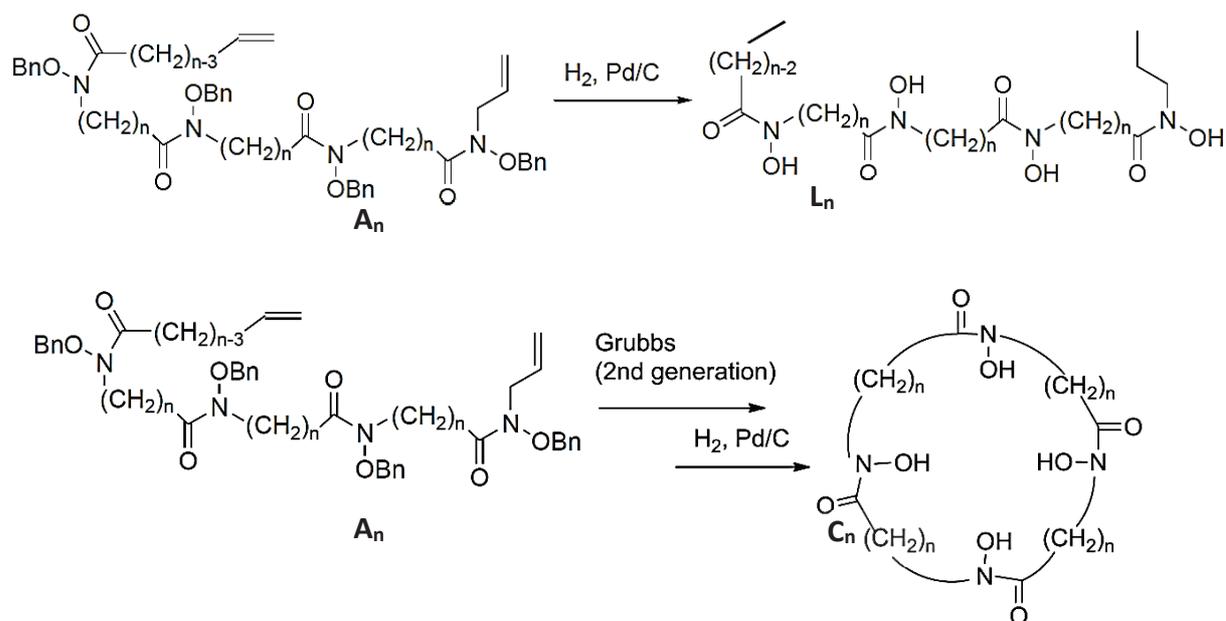


Figure 45 Dernière étape de la synthèse avec A_n ($n=5,6,7$), le synthon servant à la synthèse du cycle par métathèse via un catalyseur de Grubbs de seconde génération. La déprotection donnant L_n et C_n est l'hydrogénation catalysée au palladium sur charbon²².

La synthèse du cycle demande 9 étapes en tout mais l'effort mis dans ces travaux ont permis de mettre en avant un squelette dit *type* pour complexer le Zirconium-89. Premier point, le temps de complexation n'est pas la même entre tout ces ligands. Pour le DFO, 30 min suffisent à 20°C pour complexer tout le ^{89}Zr . Les ligands L5 et C5 ne peuvent complexer tout le nucléide même au bout de 2 h à 20°C (71% pour L5 et 22% pour C5), ou jusqu'à 80°C (max 87,3% pour L5 et 29% pour C5). La taille du squelette devenant intéressante serait celui à 6 carbones, en

effet, à température ambiante, seul 95% de L6 et 79% de C6 restent complexés. Une plus nette différence existe entre L6 et C6 lorsque l'on chaufferait à 80°C durant 30 min avec un rendement de radiomarquage de >99% à 92% respectivement. Finalement, pour obtenir des résultats de complexation comparables au *golden standard*, le L7 et le C7 offrirait ces caractéristiques au bout de 2h de réaction. Pour réellement comparer ces complexes, des études de transchélation démontrent une stabilité plus élevée pour le cycle à 7 méthylènes face au DFO : 87 ± 3 % intact contre 47 ± 3 % intact après 7 jours.

La taille d'un cycle pourrait alors être de 7 carbones entre chaque fonctions chélatantes et entraînerait une stabilité *in vitro* satisfaisante. Néanmoins, cette molécule n'étant pas bifonctionnalisée, aucune étude *in vivo* ou de conjugaison avec un biovecteur n'a pu être réalisée. Mais là n'était pas le but de ce papier, car le squelette de ces molécules n'offrait que très peu de chance d'être plus soluble que ces concurrentes. Récemment, l'équipe de Wängler C. s'est inspirée de ce squelette pour leur propre ligand. Tout d'abord, la solubilité dans l'eau a voulu être augmentée via la modification des chaînes alkylés en remplaçant 2 carbones par une fonction amide²³ dont la version non bifonctionnalisée est représentée en **Figure 46**.

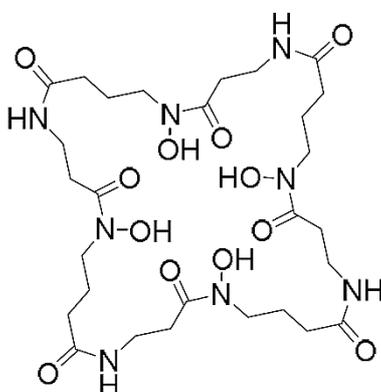


Figure 46 Le CTH36 pour Cyclic Tetra-Hydroxamate avec un cycle de 36 atomes. On retrouve bien les 7 atomes entre chaque fonction hydroxamate²³.

La version bifonctionnalisée a été soumise en parallèle au DFO à des études de transchélation dont les résultats sont résumés en **Tableau 10** (page 87). On remarque que le pourcentage de Zirconium-89 chélaté au complexe CTH36 au bout de 24h est de >95% et >80% pour une compétition face à 100 et 1000 excès d'EDTA à pH 7. De ce résultat très encourageant dépend désormais de trouver une bonne manière de conjuguer ce ligand à un anticorps monoclonal.

En effet, ils ont observé une difficulté à préparer une fonction réactive tel que les ester activés (type TFP) ou maléimide vu précédemment. La seule méthode ayant fonctionnée serait celle plaçant un groupement tétrazine qui peut réagir par une cycloaddition inverse de Diels-Alder sur un groupement TCO. Cela veut dire que l'anticorps doit être modifié au préalable. Ces réactions peu utilisées pour du radiomarquage et des conjugaisons demandent plus d'effort pour des études précliniques mêmes si la littérature regorge de ce type de manipulation.

1.3.4 Les ligands au squelette à base de cyclen et cyclam

1.3.4.1 Introduction

L'utilisation de macrocycle est une bonne approche afin d'obtenir un support à des fonctions chélatantes intra moléculaires. Les cycles pouvant être intéressants sont les 1,4,7,10-tétrazacyclododécane (cyclène) et le 1,4,8,11-tétrazacyclotétradécane (cyclam) offrant des amines secondaires remplissant le rôle d'attache de fonctions d'intérêts. L'équipe de Boros E. *et al.* s'y est intéressée en 2016. Par alkylation des amines par un bras *espaceur* contenant chacun une hydroxylamine protégée par un groupement benzyle, il a été possible de produire trois ligands différents²⁴ : L1, L2 et L3 dont les rendements totaux sont plutôt bons : 70%, 64% et 17% respectivement (**Figure 47**).

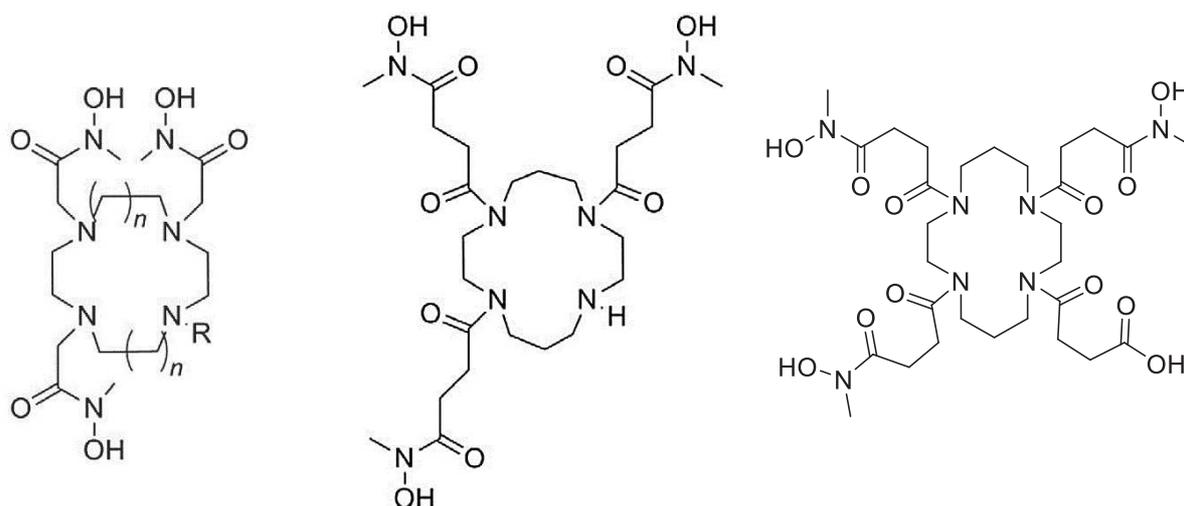


Figure 47 Structure des ligands à gauche L1 quand $n = 1$ (cyclène) et $R = CH_2CONOHCH_3$, L2 quand $n = 2$ (cyclame), $R = H$ et L3, $n = 2$, $R = CH_2CONOHCH_3$. Au centre, le ligand L4 à squelette cyclame et sa version bifonctionnalisée à droite, L5.²⁴

Tout d'abord, ils ont fait varier le type de cycle servant de squelette : cyclène pour L1 et cyclam pour L2 et L3. Ce n'est que pour leur dernier ligand, L4, qu'ils ont fait varier le nombre de méthylènes des bras espaceurs sur le cyclame correspondant. Ainsi, ils ont pu discriminer les ligands peu efficaces par tests de stabilité face à une forte concentration en EDTA (50mM) dont les résultats sont disponibles dans le **Tableau 10** (page 87). Pour résumer, le classement est celui auquel on pouvait s'attendre : $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{L4})] > [^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{L3})] > [^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{L2})] > [^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{L1})]$ et valorisé par leurs expérimentations DFT où ils dénotent une contrainte stérique élevée pour les cyclènes et que la sphère de coordination du cation Zr(+IV) aurait exceptionnellement une coordination heptadentate. Ces quatre ligands ont alors été soumis aux études de lipophilie dont les résultats sont visibles sur le **Tableau 9**. Avec tout cela, le groupement H de L4 fut choisi comme lieu d'approche à la bifonctionnalisation puisque ce ligand est bien plus intéressant que ces analogues. Ce ligand BFC, L5, le ligand qui retiendra notre attention a été synthétisé avec un rendement total de 6% avec un rendement de 27% pour la bifonctionnalisation du ligand L5.

Tableau 9 Lipophilie annoncée de chaque ligand complexant du Zirconium-89 dans un mélange n-octanol/PBS pH 7.4

Ligands	logD _{7,4}
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO-NH}_2)]$	-3,64 ± 0,2
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{L1})]$	-1,4 ± 0,0
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{L2})]$	-2,3 ± 0,2
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{L3})]$	-2,1 ± 0,1
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{L4})]$	-3,4 ± 0,1

La même équipe a essayé de conjuguer L5 au Trastuzumab par la méthode que l'on peut considérer comme classique, c'est-à-dire par l'utilisation d'un intermédiaire isothiocyanate, néanmoins elle a observé une hydrolyse des fonctions hydroxylamines lors de ces synthèses. Pour pallier ce problème, la méthode alors utilisée est celle de l'ester activé au TFP puis conjugaison à un AcM (Trastuzumab) assisté aux ions Fer (III). Malgré une conjugaison faible (0,17 – 0,45 ligand/anticorps), le radiomarquage et l'injection de cet anticorps radiomarqué dans un modèle murin portant des amas cancéreux BT20 (HER2-) ou BT474 (HER2+) ont été

fait. Ils ont remarqué par biodistribution à T + 4 j *p.i.* que l'anticorps conjugué au L5 se trouvait majoritairement au niveau des tumeurs (HER2+) $65,70 \pm 15,46$ %ID/g. L'accumulation étant naturellement plus faible pour les cellules HER2- on s'intéressera à l'accumulation dans les os et le ligand L5 n'est pas efficace. En effet, il y aurait cinq fois plus d'activité après 4 jours dans les os chez les souris traitées au $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{L5})@\text{Trastuzumab}]$ que celles traitées au $^{89}\text{Zr}\text{-DFO-Trastuzumab}$ ($18,98 \pm 2,12$ %ID/g vs $2,85 \pm 2,18$ %ID/g respectivement). Pour conclure, les squelettes à base de cyclame peuvent être de bonne base pour la synthèse de nouveaux ligands mais pour ceux présentés jusqu'à maintenant ils étaient bien trop instables *in vivo* malgré les résultats *in vitro* très encourageants. Autre point pour ce type de cycles, les amines composant les cycles ne rentrent pas en considération dans la sphère de coordination du cation comme peut l'être les cyclames envers le Cuivre (II) par exemple.

1.3.4.2 Un cycle tétraazacycloalkane bien connu, le DOTA

Le DOTA ou l'acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique est un ligand très populaire et largement utilisé pour les études en imagerie TEMP afin de complexer l'Indium-111. En imagerie TEP et donc en immunoTEP, le DOTA est le ligand *gold standard* pour le Cuivre-64 et le Gallium-68 de la même manière que le DFO est le ligand le plus utilisé pour le Zirconium-89. La chimie qui l'entoure ainsi que toute ses formes disponibles commercialement, pour la plupart en fait un ligand très attractif. Néanmoins, il n'avait jamais été utilisé ou mis en réaction avec le Zr-89. Sur le papier, le DOTA présente seulement 4 atomes donneurs d'électrons forts, les 4 oxygènes des acétates. Pour combler la sphère de coordination du Zr(IV) les doublets non liants des amines composant l'azamacrocycle doivent intervenir. Ces contraintes ont persuadé les radiochimistes du manque d'intérêt d'un tel ligand face aux ligands qu'on a pu voir jusqu'à présent ayant jusqu'à 8 atomes d'oxygènes. L'équipe de Wadas en 2017 s'est intéressé à un ligand qui pour l'opinion générale du monde de l'immunoTEP et de la radiochimie était défini comme désuet. En effet, en piochant dans ses dérivés, ils ont pu déterminer 3 cyclames potentiels d'intérêt²⁵ le DOTA, mais aussi le DOTAM et le DOTP. Ces deux derniers ligands tétraazacycliques présentent comme *pince* chélatante des fonctions acétamides dont les bases de Lewis considérées sont les oxygènes du groupement, pour le DOTAM.

Concernant le DOTP, les groupes fonctionnels pour la complexation sont les phosphates se situant à la place des acides carboxyliques. Les différents ligands sont représentés sur la **Figure 48**.

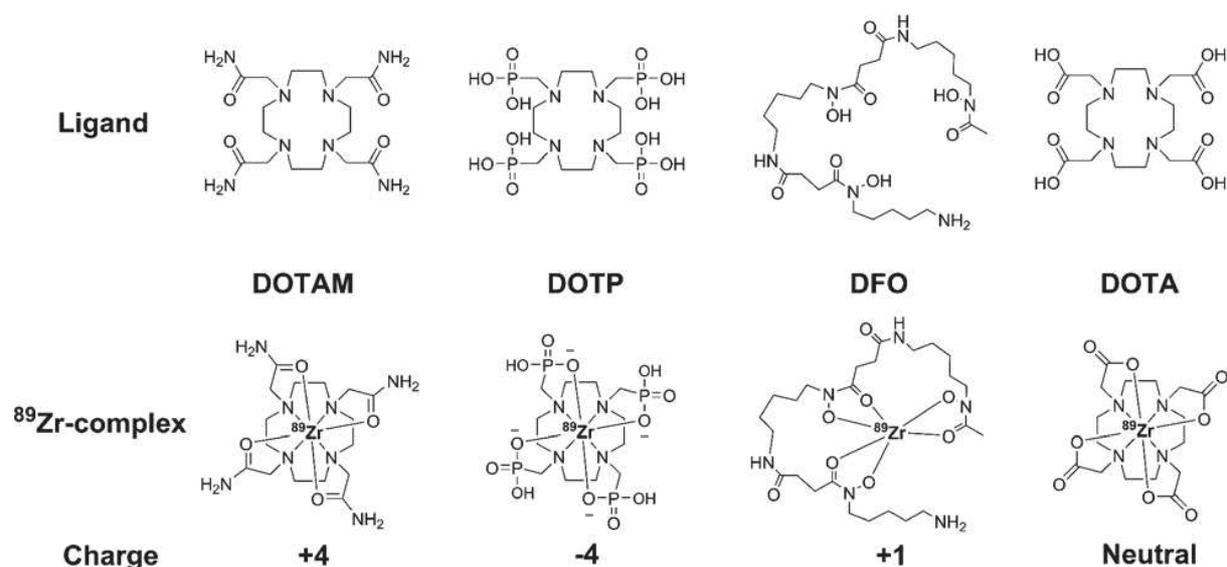


Figure 48 Figure représentant les structures des cyclènes seuls et complexant le Zirconium-89 ainsi que le DFO pour rappeler²⁵.

Les études cristallographiques d'un complexe DOTA-Zr ont été faites à froid. Dans un premier temps la forme oxalate du Zirconium, afin de simuler la forme commerciale du Zr-89 la plus répandue fut utilisée. Dans un second temps, le $ZrCl_4$, déjà décrit, a été utilisé avec succès. La diffractions des rayons-X sur un seul cristal qui a permis de donner la distance séparant le cation des 4 oxygènes de 1,004 Å ainsi que la distance entre le Zr et les 4 azotes, de 1,310 Å. Ces valeurs sont comparables aux complexes formés avec les carboxyles²⁶ et les hydroxamates¹². Ainsi, la complexation entre le DOTA et le $[^{89}Zr][Zr(oxalate)_4]^{4-}$ a été tenté et seul 66% du ^{89}Zr était complexé après 2h à 99°C. La complexation du ^{89}Zr a pu se faire intégralement en utilisant du $[^{89}Zr][ZrCl_4]$ mais en chauffant à 90°C durant 45 min. Cette méthode de complexation permet de piéger 100% du radionucléide. Cette méthode de radiomarquage des ligands a été utilisé pour les 3 ligands et directement mis en confrontation au $[^{89}Zr][Zr(DFO)]$. Le *challenge* à l'EDTA démontre une très haute stabilité des ligands tétraazacyclodécane, surtout pour le DOTA dont les valeurs sont visibles sur le **Tableau 10** Avec les études de transmétallation au Fe^{3+} , le DOTA pourrait être le ligand le plus stable vu jusqu'à présent. Néanmoins, sa méthode de complexation requiert d'adapter tout radiomarquage d'un anticorps. En effet, il est impossible de chauffer à 90°C un anticorps monoclonal sans le

dénaturer. L'avantage du Zirconium-89 est son temps de demi-vie qui pourrait jouer en sa faveur notamment pour des méthodes de prémarquages du ligand puis bioconjugaison sur un anticorps. L'avantage certain du DOTA est sa grande bibliothèque de versions bifonctionnalisées qui mériterait d'être étudiée plus en profondeur. Il n'est pas certain que le DOTA remplacera du jour au lendemain le *golden standard* qu'est le DFO où le radiomarquage se fait à température ambiante. Néanmoins, tout nouveau ligand devra forcément être confronté à ce ligand *in vitro*.

Tableau 10 Etudes de transchélation de différents ligands face à différentes concentrations en EDTA.

Complexe BFC	Excès EDTA	pH à 37°C	T + 1 h (%)	T + 1 jour (%)	T + 7 jours (%)
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO})]$	100 éq	7	100	96,7 ± 1,7	90,4 ± 4,5
			96,6 ± 1,1	88,6 ± 0,2	83,9 ± 0,5
			>95	>95	NR
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO})]$	500 éq	7	81,1 ± 1,1	36,2 ± 0,7 ⁸⁷	28,5 ± 0,4
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO})]$	1000 éq	7	68,3 ± 1,2	28,1 ± 0,7	20,3 ± 0,5
			NR	71 ± 1	53 ± 1
			95,5 ± 0,5	55,4 ± 3,2	42,2 ± 2,3
			>95	>75	NR
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO})]$	50 fois	7	NR	55	41
				98 ± 2	91 ± 2 (6j)
				75 ± 3	47 ± 3
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO})]$	100 éq	7	>99	75,63 ± 3,07	65,5 ± 4,42
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO}^*)]$	1000 éq	7	>99	>99	>99
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFOCyclo}^*)]$	1000 éq	7	>99	>99	>99
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFOHOPO})]$	100 éq	7	>99	>99	>99
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{TAFC})]$	1000 éq	7	99,6 ± 0,1	99,3 ± 0,2	97,2 ± 0,2
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{FSC})]$	1000 éqs	7	98,2 ± 0,1	96,5 ± 0,5	93,9 ± 0,7
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{TAM1})]$	13513 éq	7	NR	100	100
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{TAM2})]$	13368 éq	7	NR	100	100
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{HOPO})]$	100 éq	7	100	100	100
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{L1})]$	1000 éq	7	NR	78 ± 1	71 ± 3 (6j)
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{L2})]$	1000 éq	7	NR	98 ± 1	84 ± 1 (6j)
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{L3})]$	1000 éq	7	NR	88 ± 1	74 ± 4 (6j)
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{L4})]$	1000 éq	7	NR	98 ± 8	87 ± 1 (6j)
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{L5})]$	1750 éq	7	NR	0	0
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{L6})]$	1750 éq	7	NR	50 ± 3	43 ± 3
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{L7})]$	1750 éq	7	NR	79 ± 3	75 ± 3
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{C5})]$	1750 éq	7	NR	0	0
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{C6})]$	1750 éq	7	NR	29 ± 3	29 ± 3
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{C7})]$	1750 éq	7	NR	93 ± 3	87 ± 3
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{CTH36})]$	100 éq	7	>98	>95	NR
	1000 éq	7	>98	>80	NR
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DOTA})]$	1000 éq	7	100	100	100
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DOTAM})]$	1000 éq	7	98,3 ± 0,1	88,6 ± 0,4	47,4 ± 0,9
$[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DOTP})]$	1000 éq	7	99,2 ± 0,1	97,9 ± 0,1	79,4 ± 1,2

1.3.5 Le ligand historique, la Desferrioxamine-B

Grâce à ses différentes méthodes de production et de purification, ses propriétés physiques ($T_{1/2}$, abondance du β^+ /désintégration), le Zirconium-89 est un radiométal intéressant en vue d'une stratégie d'imagerie d'anticorps monoclonal et pour la validation en préclinique d'un nouvel anticorps. Le Zirconium-89 est couplé à l'anticorps monoclonal un ligand historique naturel déjà discuté auparavant, la Desferrioxamine-B (DFO, **Figure 49**).

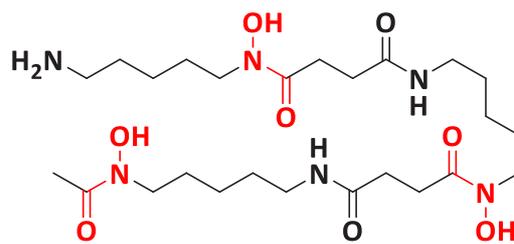


Figure 49 La Desferrioxamine-B

Ce sidérophore est très largement utilisé pour coupler le radiométal à tout vecteur biologique. Les premiers à avoir établi un protocole qui permet cette conjugaison est l'équipe de Verel, M.S. *et al.* en 2003²⁷. Ces méthodes multi-étapes synthétiques, même si très efficaces sont assez longues et rigoureuses. Brièvement, cette méthode nécessite l'ajout d'un *linker* sur la DFO via la *N*-succination de l'amine en bout de chaîne par réaction avec l'anhydride succinique en milieu basique. Puis du Fe^{3+} est complexé par les hydroxylamines (en rouge, **Figure 49**) qui composent la DFO et les rend inerte le temps du marquage de l'anticorps par un ester activé intermédiaire à la TFP. Avant le radiomarquage, il suffirait d'éliminer les traces de Fer via un rinçage à l'EDTA. Enfin, le Zirconium-89 était complexé sur le biovecteur conjugué²⁷. Depuis, de nouvelles méthodes de conjugaison du DFO sur l'AcM d'intérêt ont été développées, suivant la méthode de conjugaison vu précédemment²⁸. On peut considérer que la technique la plus utilisée en pré-clinique et en clinique est la méthode rapide et efficace de la synthèse d'un dérivé du DFO par le *p*-isothiocyanate de benzyle (1,4-phenylenediisothiocyanate). Le marquage de l'anticorps monoclonal se fait alors sur une lysine libre aléatoire sous condition alcaline (pH = 8,9 – 9,1) et est explicité en **Figure 50**. On peut trouver une voie de synthèse qui fait état de protocole pour tout laboratoire voulant marquer un anticorps au Zirconium-89²⁹.

Cette version de la Desferrioxamine-B est commerciale et prêt à l'emploi chez Macrocylics (*Dallas, USA*). Le nombre de publications, l'importance du nombre d'anticorps monoclonaux utilisé en Zirconium-89-ImmunoTEP et les modes opératoires très bien décrits confirment l'importance et la prédominance de ce ligand dans l'immunoTEP. Néanmoins, si on considère le cation Zr^{4+} , l'inertie cinétique des trois fonctions hydroxylamines du DFO ne suffisent pas pour complexer *totalemment* le Zirconium.

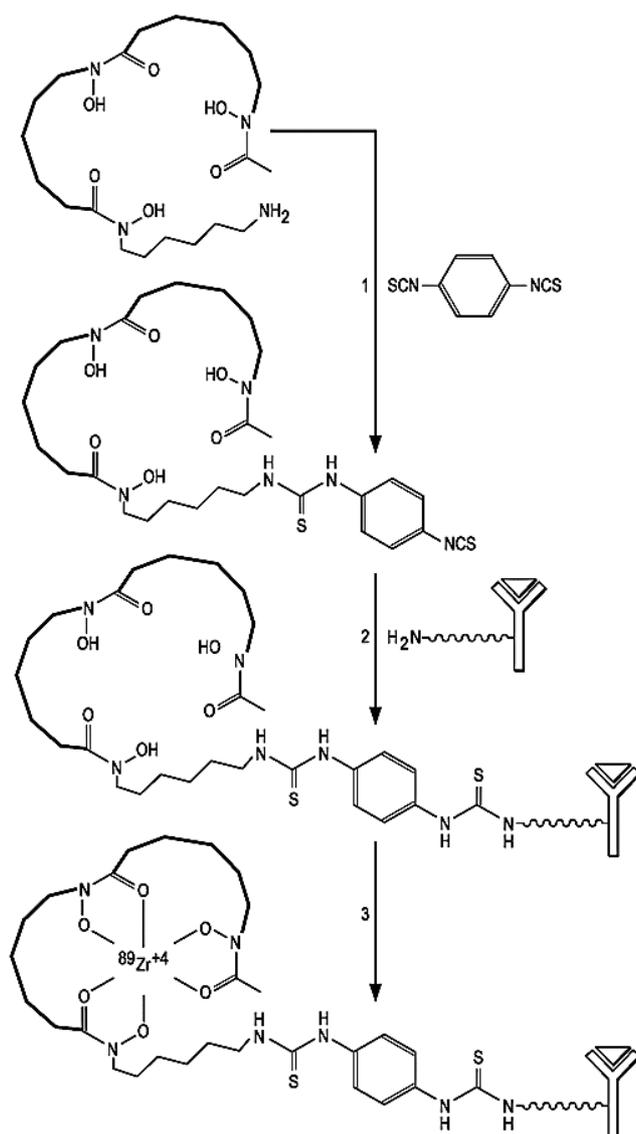


Figure 50 Fonctionnalisation du DFO³⁰ (1) Sel de Mélysate de DFO (0,2 g, 0,37 mmol, 1 éq.) isopropanol/eau (9 : 1) ; pSCN-Bz-SCN (0,29 g, 1,5 mmol, 4,05 éq.), CHCl₃, Et₃N (80 µL, 0,57 mmol, 1,6 éq.), t.a., 30 min ; 41%. **Conjugaison de l'anticorps avec le DFO-modifié (2)** DFO-Bz-NCS (40 nmol, 3 éq., 2mM DMSO), AcM (2 mg, 13,2 nmol, 1 éq.), 37°C, pH 8,9 – 9,1 (0,1M Na₂CO₃, 0,1 mL), 30min, 0.3-0.9 DFO/AcM. **Radiomarquage au ⁸⁹Zr (3)** [⁸⁹Zr][Zr(Oxalate)₄]⁴⁻ (37 MBq, 200 µL), neutralisé (2M Na₂CO₃, 90 µL), (DFO-Bz)@mAb (0,7 mg), 0,5M HEPES (1 mL, pH 7,1 – 7,3) ; 1h, 95

2 Synthèse de dérivé du DFO

Nous avons vu dans le chapitre précédent que les valeurs de $\log\beta_{\text{est.}}$ sont comparables avec les valeurs déterminées par les expériences *in vitro* puisqu'elles démontrent que la différence entre estimation et expérience est de seulement 1,87 en valeur absolue¹⁵. D'après la **Figure 51**, le complexe entouré en rouge décrit un complexe de DFO avec une molécule d'eau plus stable qu'un complexe formé par le DFO et deux molécules d'eau. Il est vrai que la complexation par 8 atomes est plus efficace mais je propose dans cette thèse la synthèse d'un ligand heptadentate. Ce ligand heptadentate visé est un dérivé du DFO et présente une fonction permettant la complexation du Zirconium(+IV). Un complexe de ce type est sur le papier plus efficace qu'un ligand hexadentate c'est pourquoi je propose dans cette partie la première synthèse d'un ligand possédant 7 bases de Lewis.

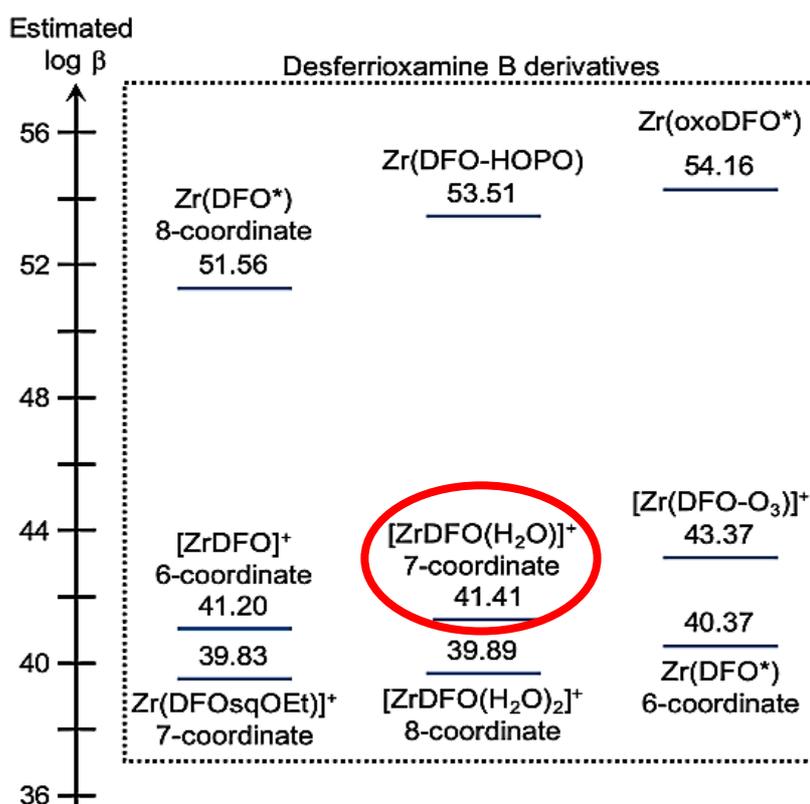


Figure 51 Tableau décrivant les résultats des calculs entrepris par Holland en 2020³¹ avec un rouge la valeur rassurant nos hypothèses.

Même si le DFO est un ligand assez bien adapté aux ions $^{89}\text{Zr}^{4+}$, il peut être amélioré en ajoutant un donneur supplémentaire. De nombreux groupes travaillent sur de "nouveaux" chélateurs afin d'augmenter le nombre de coordination des complexes d'ions $^{89}\text{Zr}^{4+}$, de la première sphère de coordination hexadentate octaédrique standard à quelque chose ayant jusqu'à 8 atomes donneurs.

Par exemple, lorsque le complexe est constitué d'un noyau $[\text{Zr}(\text{hydroxamate})_3]^+$, il porte une charge positive. Les calculs de DFT ont montré que les molécules d'eau peuvent se lier à l'ion Zr mais que les molécules d'eau coordonnées sont labiles et susceptibles d'un échange rapide dans les conditions ambiantes. Il est pratiquement difficile de placer deux atomes donneurs supplémentaires autour du noyau de $[\text{Zr}(\text{DFO})]$ en raison de la répulsion stérique dans la première sphère de coordination et de la tension des ligands autour du squelette DFO. $[\text{Zr}(\text{DFO}^*)]$ a été produit et "signalé" comme un complexe coordonné 8 fois, mais au début de la thèse, nous croyions fermement que le système serait en fait coordonné 7 fois dans l'eau. L'extension de la structure de la DFO via l'amine primaire est une chimie triviale. Le problème est que la dérivation de l'amine entraîne une solubilité dans l'eau extrêmement faible (comme avec DFO^*). Si nous pouvons introduire une petite chaîne d'acides aminés hydrosolubles au niveau de l'amine primaire de la DFO, qui porte un donneur monoanionique et une fonction réactive pour se fixer aux anticorps, nous pourrions fabriquer un complexe $[\text{Zr}(\text{DFO})]$ plus stable avec des caractéristiques de solubilité améliorées.

Les réactions de la **Figure 52** ci-dessous fonctionnent et donnent un produit soluble dans l'eau, le DFO-(Gly)₃, sous forme de sel TFA.

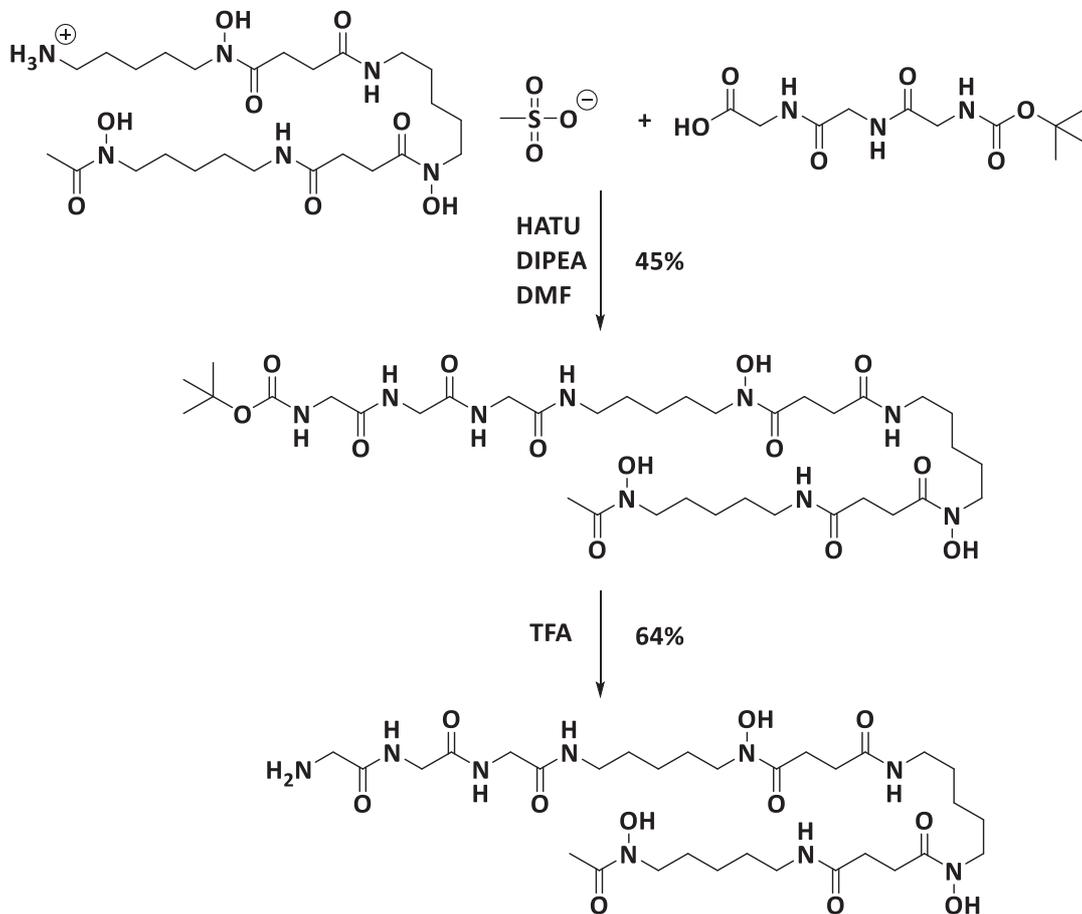


Figure 52 Couplage du DFO et d'un tripeptide NHBoc-(Gly)₃-OH et la déprotection donnant le DFO-(Gly)₃, sous forme de sel TFA.

Mon concept serait de dériver la DFO avec une séquence de dipeptides ou de tripeptides qui installerait un acide carboxylique comme groupe solubilisant et donneur anionique pour le Zirconium, ainsi qu'une fonction réactive pour la fixation aux protéines.

2.1 Les acides aminés capables de complexer le Zr-89

Si nous faisons une liste des acides aminés pouvant chélater de façon optimale le Zr-89, c'est-à-dire ceux possédants des bases de Lewis fortes sur leur chaîne latérale, on trouve alors l'acide aspartique, l'acide glutamique, la sérine, la thréonine et la tyrosine. On peut alors établir le **Tableau 11** qui permet de réduire le nombre de tests à faire et de synthèses. De manière générale, plus le pKa d'une fonction chimique est basse, plus elle sera sous forme d'ion à pH neutre. C'est le cas pour les deux acides, acide glutamique et acide aspartique qui seront sous la forme de carboxylate, donc avec une base forte de Lewis.

Tableau 11 Récapitulatif des valeurs de certains acides aminés portant sur leur chaîne latérale une base de Lewis forte.

Acide aminé	Chaîne latérale	pKa associé	Forme associée à pH neutre
Acide aspartique	Carboxyle	3,65	Carboxylate
Acide glutamique	Carboxyle	4,25	Carboxylate
Sérine	Hydroxyle	13	Alcool
Thréonine	Hydroxyle	13	Alcool
Tyrosine	Hydroxyle	10,07	Alcool

Les autres acides aminés resteront sous la forme d'hydroxyle lors du processus de complexation, limitant ainsi leurs intérêts. En résumé, nous partirons sur le choix des acides aspartiques et glutamiques et pour pouvoir les incorporer sur la chaîne proposée par le DFO, nous avons décidé d'imiter le DFO* en longueur de chaîne. Le DFO* est formé par couplage peptidique entre l'acide 4-((5-aminopentyl)(hydroxy)amino)-4-oxobutanoïque et l'amine de la desferrioxamine commerciale. Dans notre cas, le couplage devrait alors se faire non pas sur l'acide choisi mais sur un autre acide aminé, tel que la glycine. Cet acide aminé le plus simple permet de maintenir la solubilité d'une molécule tout en laissant libre le second acide aminé. Nous sommes alors en présence d'une dipeptide NH₂-(Glu/Asp)-Gly-OH et vient la question alors de la bifonctionnalisation. L'amine portée par l'acide aminé chélatant ne devrait pas servir à conjuguer le ligand au vecteur biologique, par précaution il serait plus judicieux d'ajouter un autre acide aminé permettant l'ajout d'une amine qui sera libre. La partie à ajouter au DFO sera alors sous la forme d'un tripeptide qui sera synthétisé en phase liquide.

être éliminé facilement par traitement acido-basique avec une solution HCl 1M. Le dipeptide **4** est alors extrait facilement avec l'acétate d'éthyle. Pour obtenir le tripeptide **1** il est alors nécessaire de déprotéger l'amine en N-terminal par réaction avec du TFA. Puisque cette voie s'intéresse aux esters activés de type **-OSu**, j'ai préparé un synthon **6** qui sert pour cette voie et la seconde que nous verrons plus tard, en utilisant la méthode désormais bien connue utilisée pour l'intermédiaire **3**. L'avantage de cette méthode est de proposer une amine réactive et non sous forme de sel de triflate après agitation de la solution aqueuse au NaHCO₃. On obtient alors le tripeptide protégé après purification sur gel de silice avec 51% de rendement.

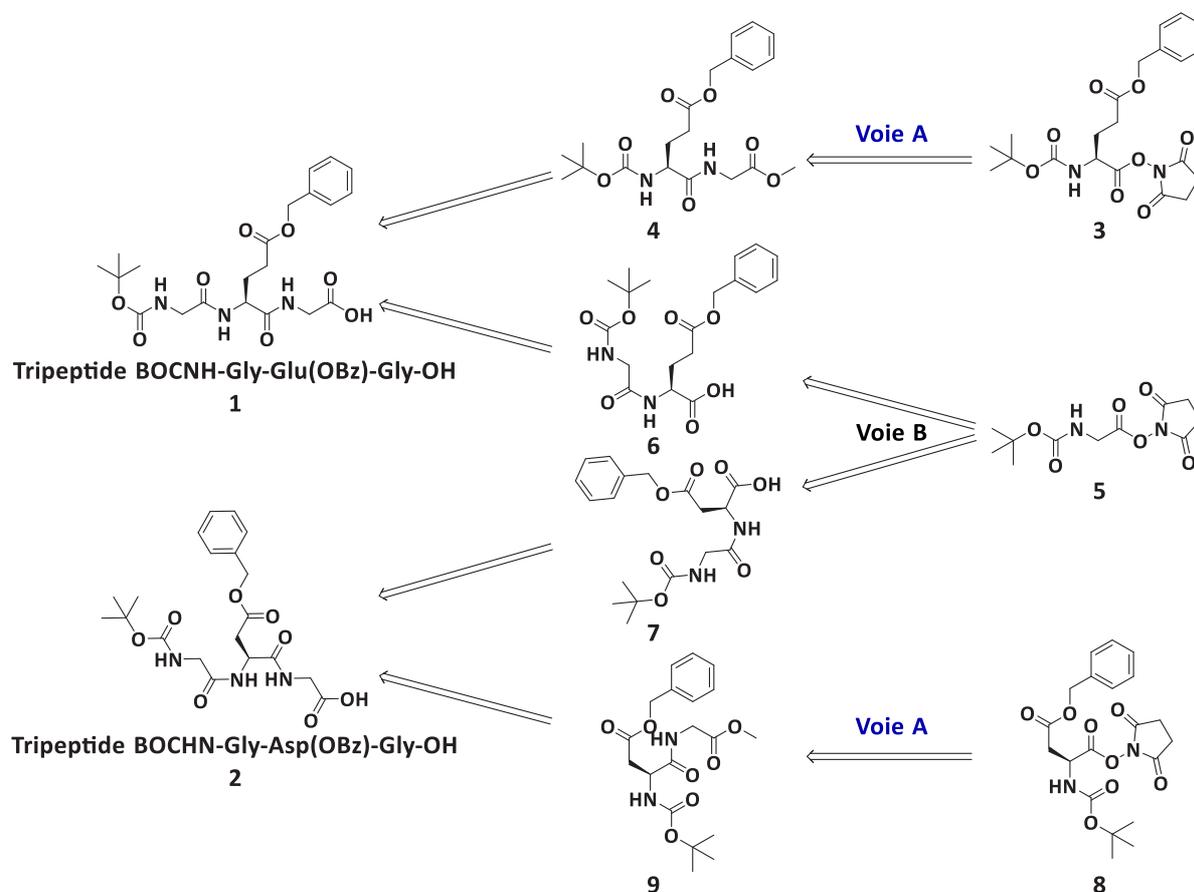


Figure 54 Rétrosynthèse des tripeptides d'intérêts **1** et **2**

2.2.2 Synthèse via la Voie B

J'ai débuté cette nouvelle voie de synthèse du tripeptide en phase liquide en exploitant la méthode d'activation du C-terminal. Pour résumer, la voie B allonge la chaîne peptidique du N terminal au C terminal, contrairement à la voie précédente. Ce carboxyle qui formera un ester activé (**5**, **Figure 54**) a été proposé lors de la voie précédente. Pour commencer, j'ai préparé la N-BOC-Glycine-OSu **5** par une méthode classique décrite par Tanaka K. et son équipe³¹. Puis par la même méthode utilisée pour obtenir **4**, on obtient alors le dipeptide **6** proposant un carboxyle libre par utilisation de l'acide glutamique où seule la chaîne latérale est protégée. Le carboxyle libre est activé par la méthode d'activation au *N*-hydroxysuccinimide pour former un dipeptide de type **NHBOC-Acide Aminé 3-Acide aminé 2-OSu**. Pour s'affranchir de l'étape de déprotection avec un lithien, on se démarque de la voie A avec la principale différence d'utiliser un acide aminé déprotégé. Effectivement, de la glycine libre est utilisée. L'avantage de cette méthode sur le papier est de faire réagir seulement l'amine de cet acide aminé sur l'ester activé. J'ai donc mis en pratique cette hypothèse avec la réaction résumée en **Figure 55**.

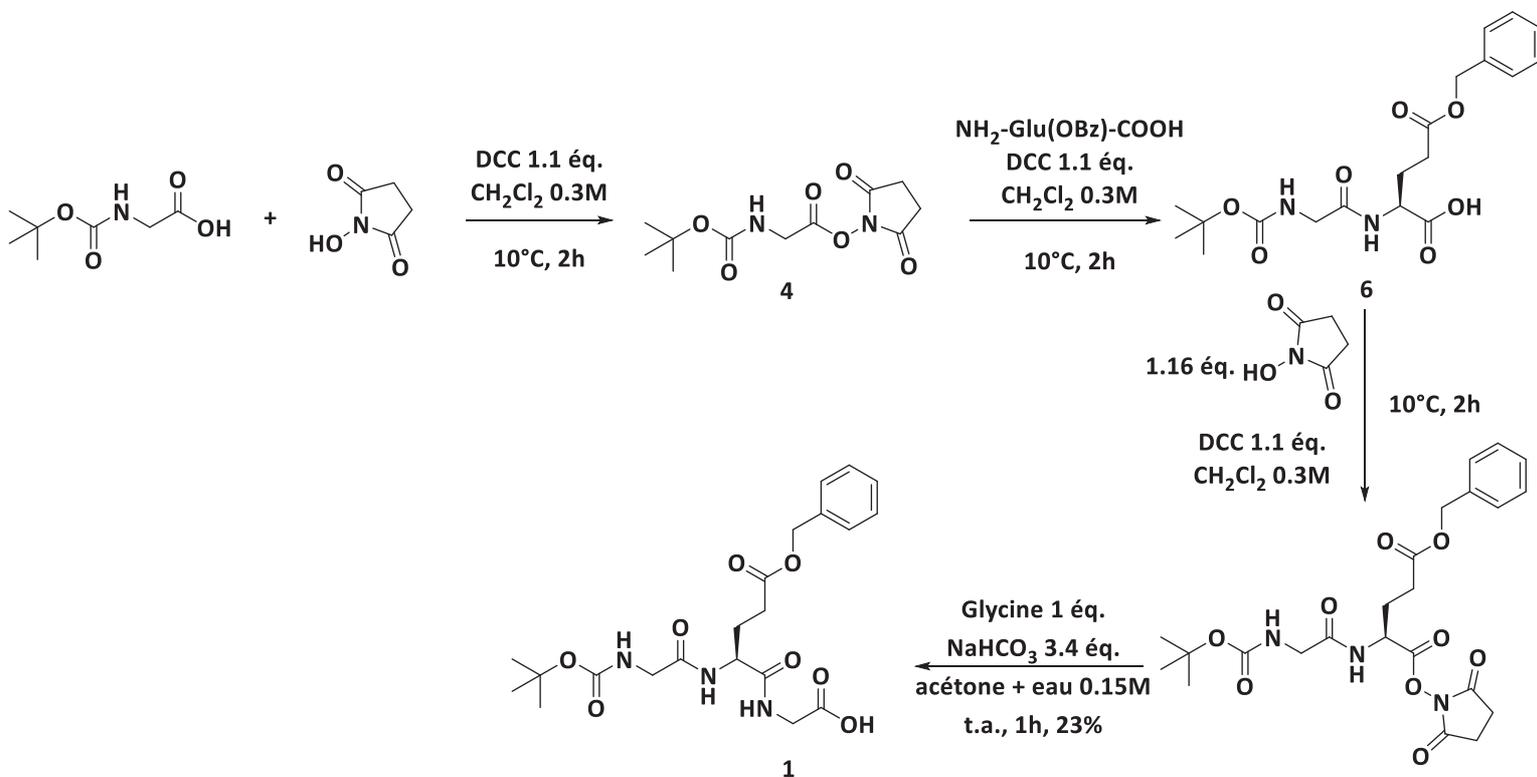


Figure 55 Synthèse du tripeptide NHBoc-Gly-Glu(OBz)-Gly-OH

Après élimination de l'urée formée à la première étape puis par précipitation et rinçage aqueux (pH 2-3) on obtient un tripeptide prêt à l'emploi. Ce tripeptide peut alors être formé, certes avec un rendement faible mais en évitant la contrainte de la déprotection. On retrouve bien sur la **Figure 56** les protons correspondant aux groupements protecteurs *tert-butyle* et *benzyle* (**H_a** et **H_g**, **Figure 56** et **57**). Les chaînes alkylées des glycines et de l'acide glutamique sont notamment présentes (**H_b**, **H_d**, **H_e** et **H_h**, **Figure 56** et **57**).

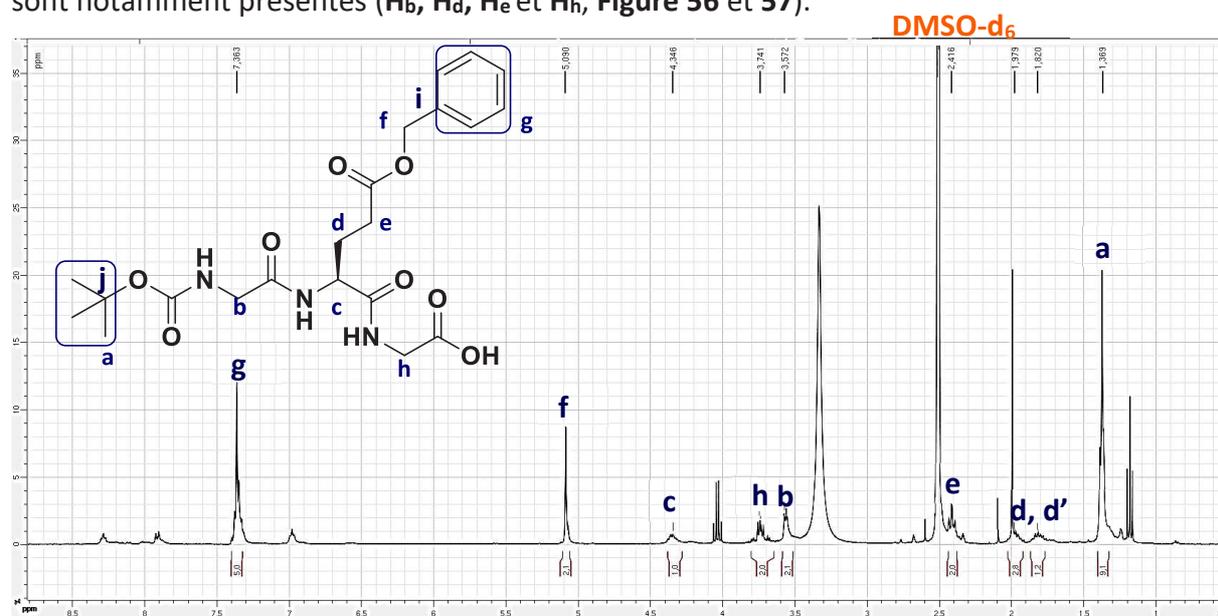


Figure 56 RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) de **1**

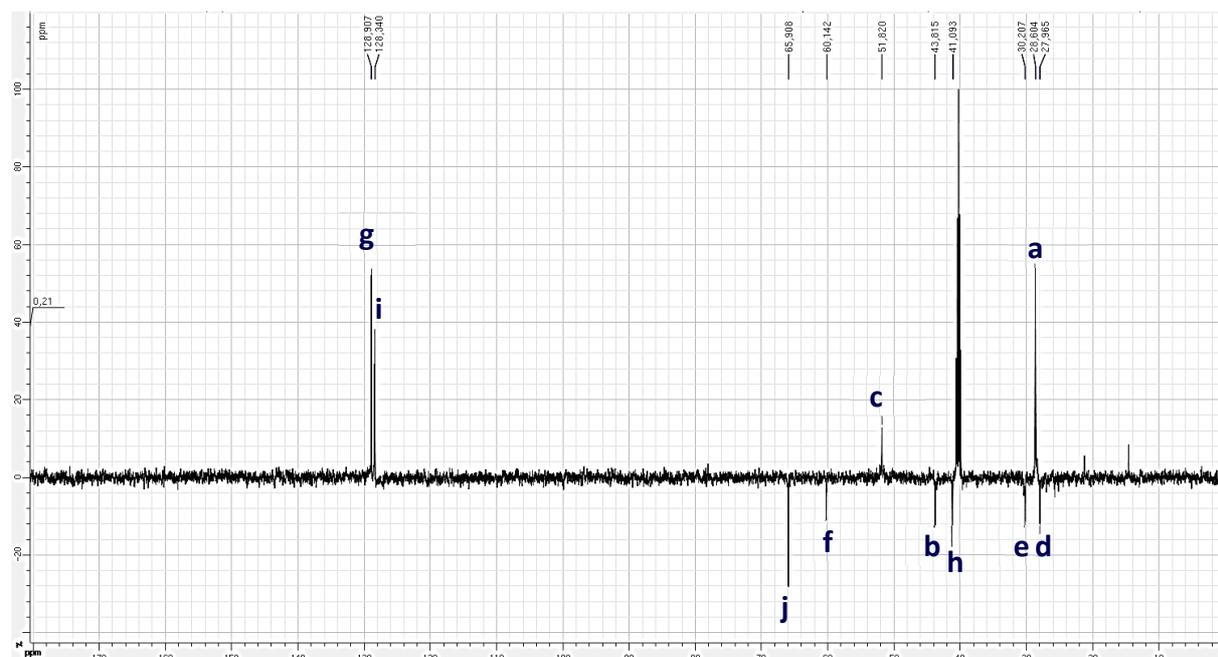


Figure 57 RMN ¹³C DEPT135 (126 MHz, DMSO-d₆) de **1**

2.3 Synthèse du tripeptide Gly-Asp-Gly

Pour cette synthèse, je me suis intéressé à une autre façon d'allonger la chaîne peptidique. Par une méthode courante en phase solide, j'ai entamé une synthèse par voie Fmoc- en phase liquide. La voie précédente étant longue et fastidieuse, j'ai voulu optimiser cette synthèse. De plus, les synthèses d'un dipeptide avec des analogues de l'acide aspartique benzylé ne donnaient pas de bons résultats. Cette méthode nous permet aussi d'utiliser le dérivé d'acide aspartique **10** avec un groupement protecteur de type *tert*-butyl sur l'acide carboxylique sur la chaîne latérale de ce dernier. La rétrosynthèse décrite en **Figure 58** démontre une synthèse rapide qui ne devrait pas poser de problèmes autres les déprotections.

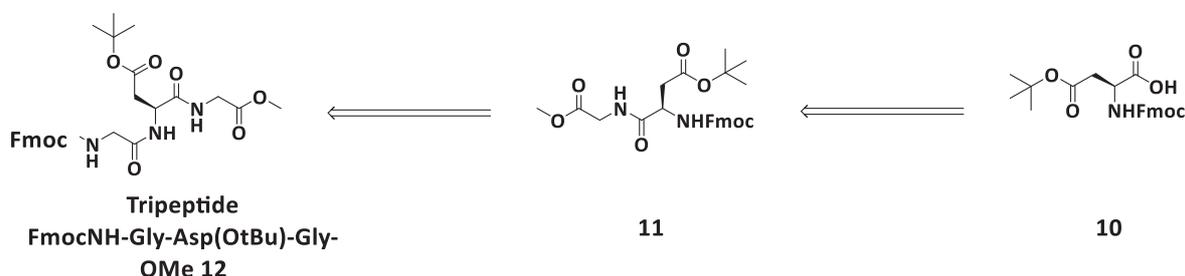


Figure 58 Rétrosynthèse du tripeptide **12**

La première étape similaire à la molécule précédente nécessite que très peu de purifications et on obtient alors la molécule **11** (**Figure 59** et **60**) après une nuit d'agitation à température ambiante. On obtient deux signaux **b** et **b'** (**Figure 59**), nous sommes en présence de protons non-équivalents dues au carbone asymétrique de l'acide glutamique.

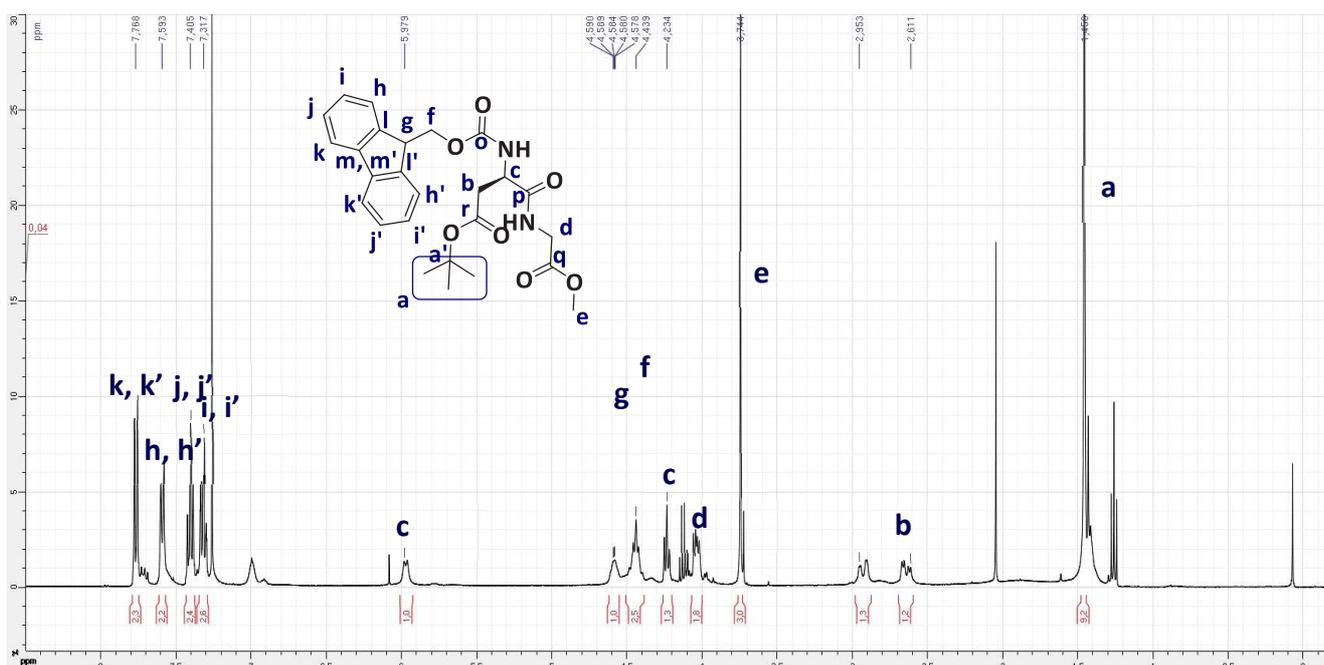


Figure 59 RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de **11**

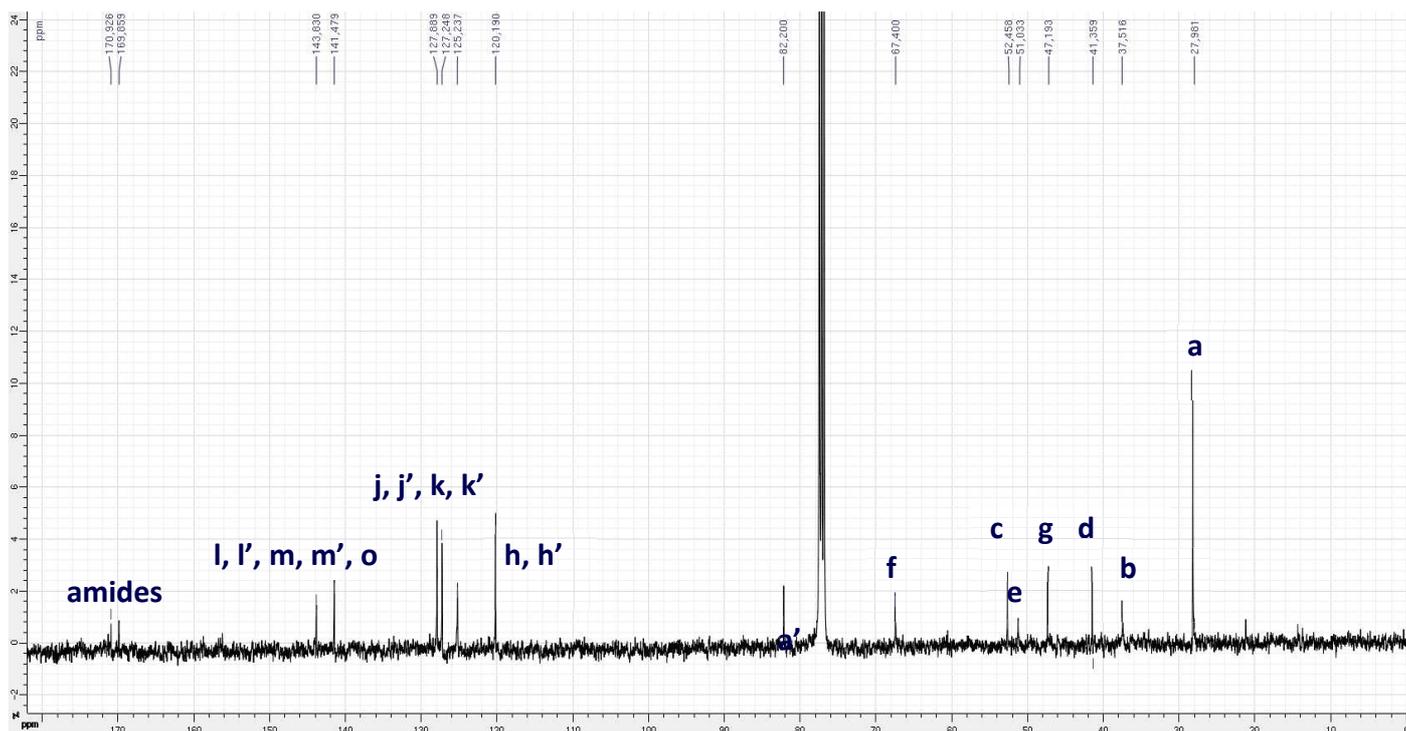


Figure 60 RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) de **11**

Il s'en suit la déprotection du groupement Fmoc de **11** via la méthode classique en phase solide³², par action de la piperidine. Différentes concentrations via des solutions faites maison ont été testées ainsi que différents temps de réaction, le tout est résumé dans le **Tableau 12**. Comme on peut le remarquer, les déprotections en phases liquides de ces molécules ne sont pas extrêmement bien renseignées, c'est pourquoi il a fallu adapter ces synthèses.

Tableau 12 Résumé des déprotections du dipeptide

Quantité de dipeptide	Concentration de piperidine dans la DMF (% v/v)	Taux de conversion (%)
0.2 mmol	10	0
0.2 mmol	50	<1
0.4 mmol	10	0
0.4mmol	50	<1

Comme nous pouvons le voir, les méthodes parfaitement adaptées aux synthèses sur phase solides ne sont pas celles qui fonctionneront en phase liquide. Cette synthèse demandant plus de temps, nous avons laissé ce dérivé tripeptidique de côté le temps d'équiper le laboratoire de matériels adaptés pour la phase solide. En gardant à l'esprit que les groupements protecteurs de l'amine et du carboxyle pourront être supprimés en une seule étape. Avant de se lancer dans la synthèse de molécules en phase solide, nous avons voulu synthétiser le DFO-tripeptide dérivé de l'acide glutamique avec le Zirconium(+IV).

2.4 Synthèse du dérivé de la desferoxamine : la desferoxamine-glycine-acide glutamique-glycine

2.4.1 Synthèse de la DFO-Gly-Glu(OBz)-Gly-NHBoc **13**

En possession de la molécule **1** prête à être utilisée pour un dernier couplage via le protocole de Holland pour coupler une molécule comportant un acide carboxylique³³, j'ai adapté le protocole avec utilisation d'un agent de couplage évitant de possibles racémisations, le HBTU (**Figure 61**). Cette synthèse se déroule durant 4 jours avec ajouts successifs de DIPEA pour maintenir le pH suffisamment basique. Cette synthèse a été lancée plusieurs fois mais sans une conversion totale de la DFO et malgré l'excès de tripeptide utilisé. En effet, après les 80h indiquées dans la publication, la quantité de produit après *work-up* était faible. C'est pourquoi le suivi journalier de la réaction avec ajout d'un équivalent toutes les 4 heures a permis d'augmenter le taux de conversion de ce couplage. Après couplage, la molécule fut purifiée par centrifugation successive dans l'eau, pour solubiliser la DFO n'ayant pas réagi malgré tout.

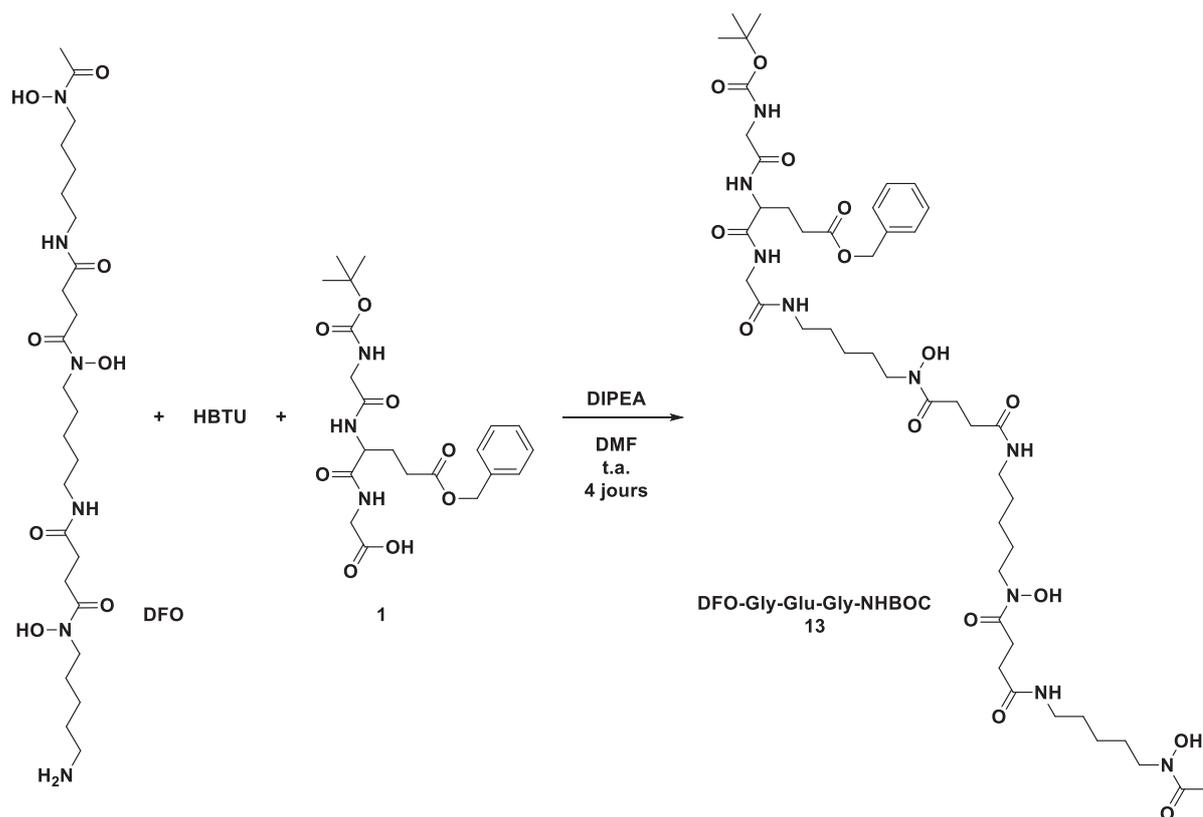


Figure 61 Synthèse du dérivé de la Desferrioxamine-B par couplage avec la molécule 1

En effet, nous ne retrouvons pas de tripeptide après analyse par spectrométrie de masse. Limité en quantité de tripeptide, cette réaction fut considérée comme complète et l'étape de déprotection du tert-butyl fut entreprise.

2.4.2 Synthèse de la DFO-Gly-Glu(OBz)-Gly-NH₂ 14

Le TFA seul fut utilisé pour la déprotection, mais il n'a pas aidé à déprotéger intégralement la molécule 13. Une méthode dite plus douce fut préférée par utilisation d'un *scavenger* et de l'eau dans un mélange 95 / 2,5 / 2,5 de TFA/Triisopropylsilane/eau pour une concentration finale de 50 mM. Après deux heures de réaction, j'ai obtenu un mélange de la molécule dérivée de 13 sans le groupement BOC, 14. On observe notamment du DFO et on voit apparaître le tripeptide déprotégé, visible sur le spectromètre de masse en **Figure 62**. Une purification a été réalisée sur HPLC semi-préparative via une colonne C18 dans le laboratoire de l'équipe Biométaux et Chimie Biologique UMR 7177 de l'Institut Le Bel à Strasbourg. Cette purification fut entreprise à ce moment précis puisque l'étape suivante ne nécessite pas de

Comme on peut le voir sur la **Figure 63**, j'ai bien la molécule **14** souhaitée sur laquelle on peut remarquer le déplacement des protons en β de l'amide formée qui sont déblindés (**H₈**, **Figure 63**). On retrouve bien un singulet pour les protons de la glycine en β de l'amide formée ainsi qu'un des deux protons non équivalents de l'acide glutamique. L'avantage de la synthèse de ce tripeptide est qu'en couplant la DFO à une glycine on évite la racémisation, fait que l'on aurait pu observer en couplant la DFO directement à l'acide glutamique.

Concernant la RMN du carbone, on retrouve tous les carbones de la chaîne carbonée de la Desferioxamine comme on peut le voir sur la **Figure 64**. Ce qui est déterminant pour l'analyse d'une telle molécule c'est l'apparition d'un autre carbone dans la zone des carbonyles >170 ppm. Ce carbone correspond à l'amide formée par le couplage peptidique. Un autre carbone indique un bon couplage : le carbone sp^3 de la glycine porteuse du carbonyle permettant le couplage. On retrouve le carbone correspondant à 41,359 ppm (**Figure 64**) puis à 42,562 ppm indiquant un déblindage typique de la formation d'une amide en β . Ayant obtenu après purification la molécule **14** seule, j'ai déprotégé le groupement benzylique de la fonction chélatante de l'acide glutamique.

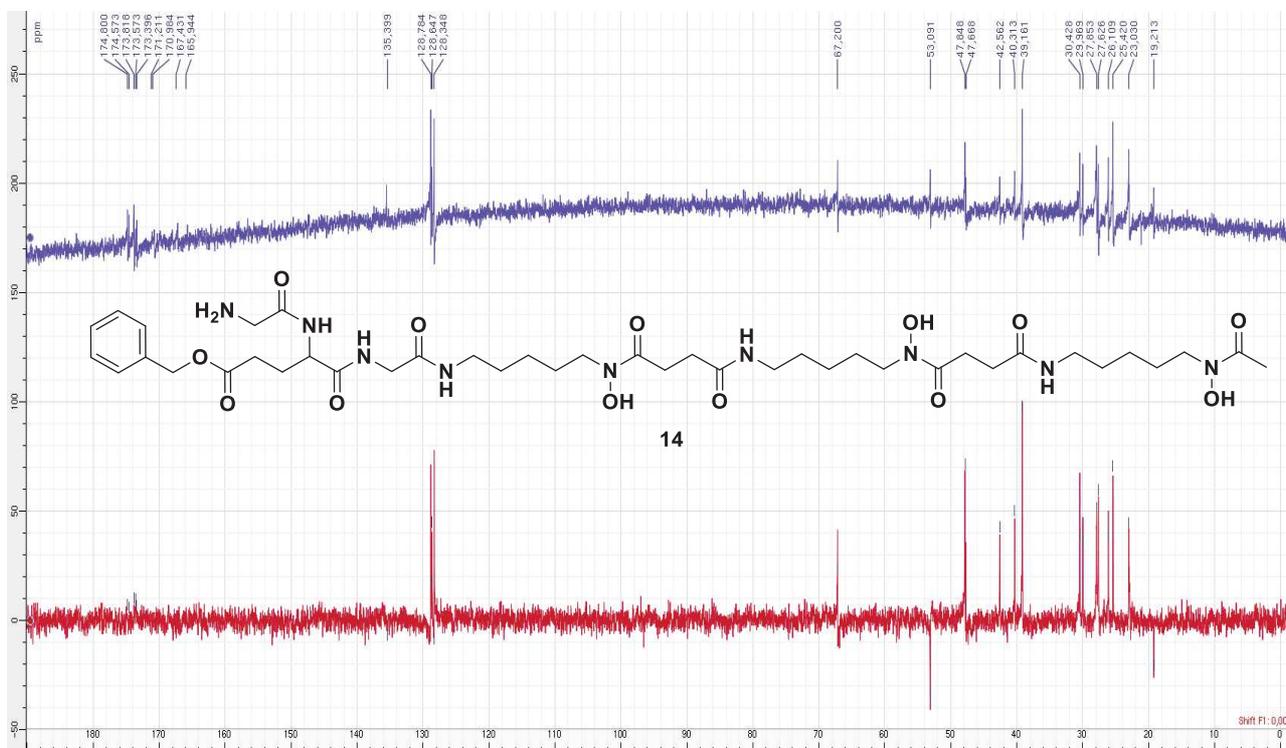


Figure 64 RMN du ^{13}C standard en violet et RMN DEPT du ^{13}C en rouge de **14**

2.4.3 Synthèse de la DFO-Gly-Glu(OH)-Gly-NH₂ **15**

Pour cette déprotection, un équivalent de Pd/C est utilisé dans une solution de **14** dans le méthanol à 2,31mM. Un ballon de dihydrogène est vidé dans le réacteur avant d'être rempli à nouveau et le tout est maintenu sous agitation. Dans la littérature, des déprotections de ce type sur un acide glutamique protégé dure entre 30 minutes et 2 heures d'agitation à température ambiante. J'ai choisi par défaut 2 h de réaction, après filtration sur fritté à porosité 4 et évaporation du méthanol, le mélange réactionnel a été analysé par RMN. Il se trouve que le temps de réaction n'était pas adéquat à une telle structure malgré la quantité de Pd/C supérieure à ce qui est préconisé dans la littérature³⁴ soit 0,1 éq. Après avoir relancé 2h supplémentaires, j'obtiens la molécule **15**. Comme prévu, il n'est pas nécessaire de purifier cette molécule puisque la RMN (**Figure 65**) ainsi que l'analyse spectrométrique de masse indiquent la présence d'une seule molécule.

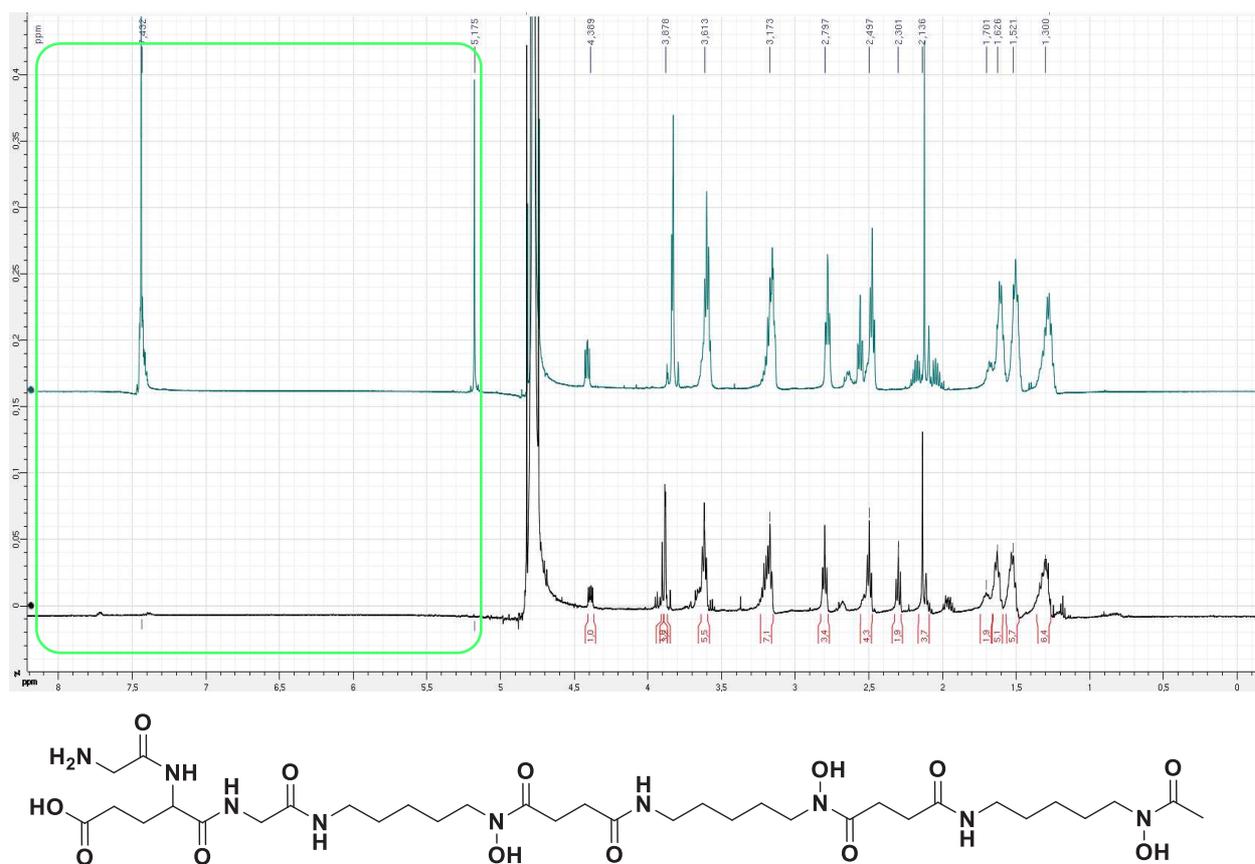


Figure 65 RMN ¹H du DFO-Gly-Glu(OBz)-Gly-NH₂ (**14**) et du DFO-Gly-Glu(OH)-Gly-NH₂ (**15**)

La molécule a été obtenue avec un rendement de 32%. La déprotection est suivie par analyse RMN en observant particulièrement le déplacement chimique des protons du groupement benzyle en vert (**Figure 65**). On remarque bien leurs disparitions ainsi que le blindage du triplet des deux protons correspondant aux protons **H₄** (**Figure 63**) allant de 2,574 ppm à 2,301 ppm. La molécule est alors apte aux tentatives de complexation du ⁸⁹Zirconium(+IV).

3 Synthèse et applications de dérivés du DFO-Gly-Glu(OH)-Gly-NH₂, 15

3.1 Introduction à la photochimie

3.1.1 Etat de l'art

Nous avons vu les méthodes classiques de radiomarquage des protéines qui impliquent généralement plusieurs étapes au cours desquelles la protéine d'intérêt est d'abord purifiée, couplée à un ligand, isolée, stockée, puis radiomarquée. Il existe de nombreuses méthodes de couplage, mais en clinique, la plupart des productions d'AcMs radiomarqués reposent sur la modification des résidus de cystéine (-SH) à l'aide de maléimides, ou sur la fonctionnalisation de la chaîne latérale de la lysine (-NH₂) à l'aide de réactifs à base de N-hydroxysuccinimide (NHS) ou d'isothiocyanate (NCS). La possibilité d'utiliser des composés photochimiquement activés pour marquer des molécules biologiquement actives a été introduite par Westheimer et son équipe en 1962¹⁵. En ce temps, ils ont démontré que la formation de carbène via un groupement diazo pouvait s'insérer dans une liaison CH après irradiation aux UV à 315nm. Depuis, le photomarquage est devenu une discipline à part entière et un grand nombre de choix de réactifs est maintenant disponible pour étudier la structure et le fonctionnement des systèmes biologiques^{35,36}.

3.1.2 Choix du groupement réactif pour la photosynthèse

Les agents de photomarquage doivent répondre à certains critères pour pouvoir être utilisés dans un contexte biologique : La structure de la biomolécule étudiée ne doit pas être fortement perturbée par le groupement photo-réactif ce qui diminuerait l'affinité de la sonde pour sa cible. Ils doivent être chimiquement inertes et stables dans des conditions biologiques. Ils doivent réagir uniquement à des longueurs d'ondes qui n'induiront pas de dégradation d'autres molécules biologiques, typiquement à des longueurs d'ondes supérieures à 300 nm. Le temps de réaction doit être court, si possible inférieur au temps de dissociation du complexe à étudier. La réaction doit pouvoir former des liens covalents avec n'importe quel résidu ou groupement chimique.

3.1.3 Photoréaction produisant des carbènes (exemple des produits diazirines)

La première description de diazirines en tant qu'agent de photomarquage date de 1973 avec la 3-aryle-3H-diazirine³⁷. Une avancée majeure dans l'utilisation des aryl diazirines pour le photomarquage a été réalisée en 1980 lorsque Brunner et al. ont signalé la synthèse efficace et les propriétés photochimiques des trifluorométhylphényl diazirines para-substituées³⁸. La longueur d'onde d'activation des groupements diazirines est d'environ 350nm (320 - 380 nm), ce qui est bien au-dessus de la limite de biocompatibilité des 300 nm. Ces groupements n'entraînent pas de dommages significatifs lors de leur activation. Une fois activée par irradiation, la diazirine perd une molécule de diazote formant un carbène singulet (**Figure 66**).

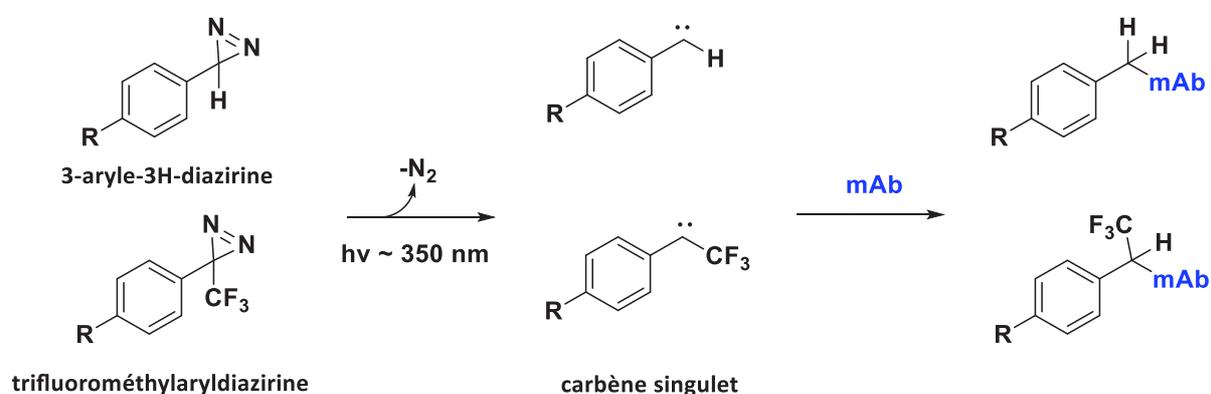


Figure 66 Illustration de photomarquage de diazirines où R est un ligand, médicaments, etc.

Ce carbène singulet stabilisé permet d'entreprendre une réaction dont la cinétique est très rapide mais elle ne permet pas de contrôler la chimiosélectivité, ni la régiosélectivité. C'est-à-dire que l'on trouvera la molécule couplée à des endroits non voulus de l'anticorps photomarké puisque ce carbène s'insère dans toutes liaisons C-C ou C-H disponibles. L'utilisation de sonde à base de diazirine peut être donc limitée par des réactions secondaires qui vont diminuer leur rendement de photomarquage. De plus, la synthèse et l'incorporation de cette fonction chimique nécessitent souvent des étapes de synthèse contraignantes. L'extrême réactivité des carbènes et des radicaux rend très difficile le contrôle des conditions de sorte que le couplage biomoléculaire sur l'anticorps se produit à un rythme qui dépasse les réactifs censés *quencher* le dioxygène ou d'autres espèces du mélange. En revanche, les aryle azides (et plus généralement les espèces azides aromatiques) produisent également plusieurs

intermédiaires de courte durée et très réactifs, dont le parent est le produit photolytique par perte de $N_{2(g)}$ sous forme de nitrène singulet à coquille ouverte (**Figure 67**) qui a une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde.

3.1.4 Photoréaction des azotures d'aryle

Dès 1969, l'utilisation des azotures d'aryle a été reporté par l'équipe de Seeberger, P.H. pour photomarquer les chaînes peptidiques des IgG de lapin³⁹. La réactivité des azotures d'aryle est intéressante et se base sur la réactivité des nitrènes. En effet, après la phase d'irradiation, le groupement azoture $-N_3$ va perdre une molécule de diazote entraînant la formation d'un nitrène singulet (**Figure 67**). L'enchaînement des réactions intramoléculaires va pouvoir réagir de trois manières différentes. Après la formation photo-induite de l'intermédiaire arylnitrène singulet, la conjugaison bimoléculaire aux protéines peut se produire par trois mécanismes potentiels : attaque nucléophile sur les céténimines pour donner les produits 2-azépine favorisés, substitution nucléophile via le cycle benzazirène ou par un intermédiaire ion nitrénium protoné, ou insertion directe de liaisons C-H, C-C ou X-H par les nitrènes singulets (défavorisés).

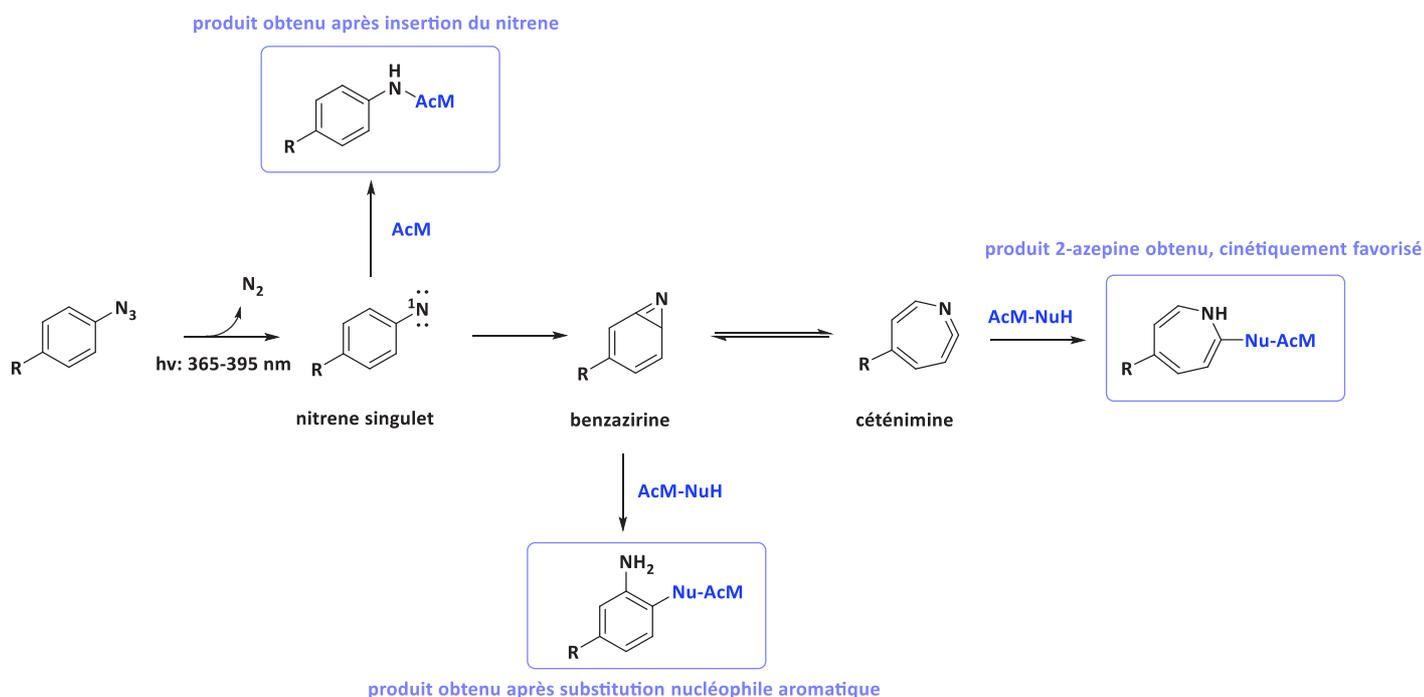


Figure 67 Principaux mécanismes des réactions des azotures d'aryles activés. **R** représentant un ligand, médicaments et les molécules obtenus par réaction avec un nucléophile (**NuH**) des anticorps ($-NH_2$) ou sur des liaisons C-H ou X-H des anticorps (X, hétéroatome)

La photoactivation des azides d'aryle libère du $N_2(g)$. À température ambiante, le réarrangement des espèces nitrènes singulets donne principalement des intermédiaires benzazirine et céténimine, par expansion/réduction de cycle. La céténimine, également appelée déhydroazépine, a été observée et peut être piégée par des nucléophiles pour former des azépines. Des études de réactivité de ces céténimines montrent que la réaction bimoléculaire avec les amines est supérieure à la réaction avec l'eau qui donne les 3H-azépinones⁴⁰. Le réarrangement des nitrènes singulets en benzazirine et céténimine peut être empêché par la substitution des positions 2, 3, 5 et 6 du groupe aromatique de l'azoture d'aryle par des atomes de fluor⁴¹. Il a notamment été démontré que la substitution en ortho par le fluor affecte le taux d'expansion du cycle, augmentant ainsi la barrière thermodynamique au réarrangement ($\Delta G^\ddagger \sim 35 \text{ kJ mol}^{-1}$) et conduisant par conséquent à une plus longue durée de vie des espèces nitrènes singulets ($56 \pm 4 \text{ ns}$). Le nitrène singulet peut aussi réaliser une insertion C-H ou X-H \rightarrow X étant un hétéroatome-présent dans la molécule d'intérêt. Les molécules benzazirines et céténimines sont des molécules électrophiles particulièrement réactives envers des nucléophiles. On peut alors obtenir un pontage uniquement au niveau de groupements nucléophiles des biomolécules (AcM-**NuH**), les chaînes latérales de certains acides aminés. La récente popularité de cette chimie est basée sur la relative facilité de leur synthèse et de leur incorporation.

3.2 Photoconjugaison de ligands à un anticorps

3.2.1 Etat de l'art

Une méthode idéale de radiomarquage doit être simple, rapide et comporter une seule étape, à partir de précurseurs stables et bien caractérisés, sans intermédiaires isolés. Comme les productions radiopharmaceutiques cliniques utilisent des niveaux élevés de radioactivité, une automatisation complète est souhaitable. Les contraintes de temps imposées par la décroissance radioactive signifient également que la cinétique chimique est cruciale pour décider si une nouvelle réaction peut être utilisée en radiochimie. En tenant compte de ces points, l'alternative de photochimie est intéressante face aux méthodes thermo-chimiques qui sont couramment utilisées pour radiomarquer les immunoglobulines, les autres protéines, les peptides et les petites molécules.

Ce n'est que très récemment, en 2019, que l'équipe de Eichenberger, L. S. a établi les premières réactions photochimiques en vue de conjuguer le NODAGA/DOTA/NOTA-PEG₃-ArN₃ au Trastuzumab⁴². Cette réaction de conjugaison photochimique a été possible à pH ~ 7.5 ainsi que la complexation du ⁶⁸Ga. Cette réaction en « *one pot, two step* » a permis de photoconjuguer et radiomarquer le Trastuzumab en 15 minutes à température ambiante. Après purification par PD-10-SEC, cette réaction afficherait des rendements autour de 18% avec un taux de ligand par anticorps allant de 1,1 à 1,8 pour un taux de radiomarquage >95%. Depuis cette étude, de nombreux ligands ont été adaptés à cette chimie par ajout d'un aryle azide (**Figure 68**)⁴²⁻⁴⁴. La conversion radiochimique est le taux entre la quantité de ligand, l'activité utilisée et l'activité retrouvée après purification de l'anticorps radiomarqué.

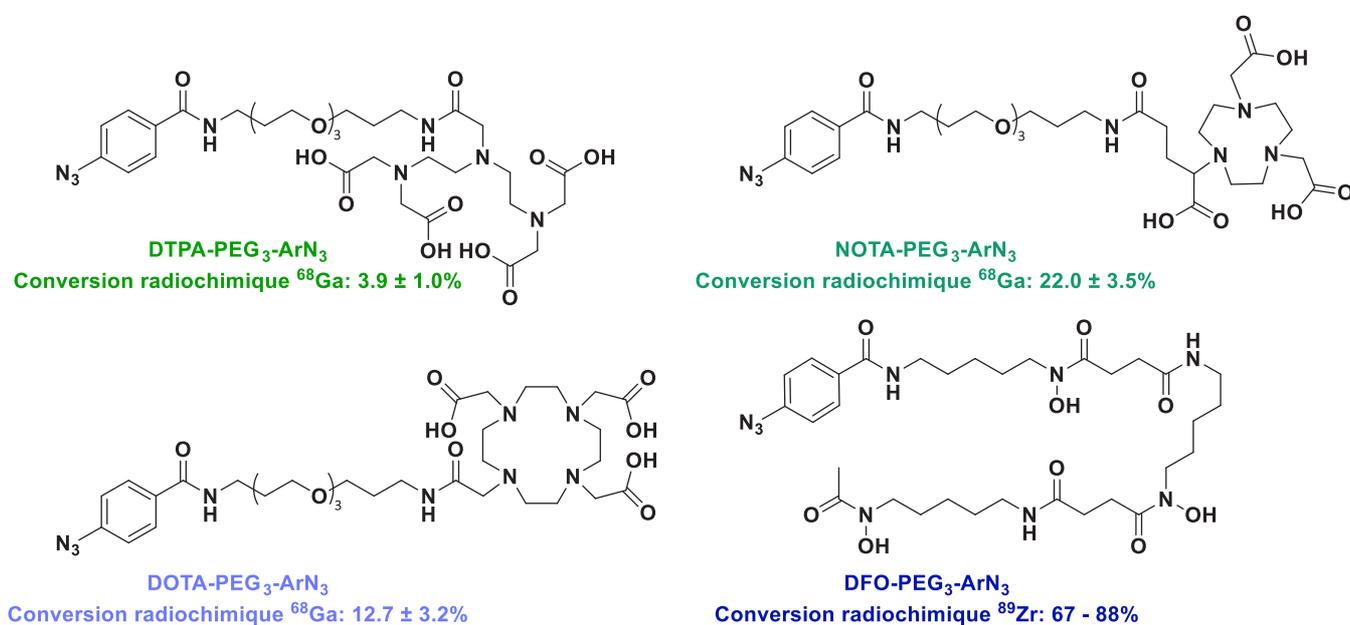


Figure 68 Comparaison des conversions radiochimiques obtenues par la réaction de ligands photoréactifs (ArN₃) marqués au ⁶⁸Ga et ⁸⁹Zr avec des anticorps prépurifiés

La photoconjugaison et le radiomarquage du Zirconium-89 propose un taux de conversion très intéressant sachant que tout se fait dans le même réacteur et une seule purification est nécessaire. Le DFO-ArN₃ est néanmoins peu soluble à un pH élevé et commence à précipiter lentement lorsque le pH descend en dessous de 9. C'est pourquoi des réactions photochimiques ont été lancées immédiatement après l'ajout du HCl et de la protéine.

3.2.2 Intérêt d'une telle conjugaison

Il n'est d'intérêt d'étudier ce ligand que face au DFO-Bn-NCS qui est le ligand bifonctionnalisé le plus utilisé. L'équipe de Klingler, S. qui a grandement contribué à la mise en avant de cette méthode, s'est intéressée à comparer cette dernière molécule au DFO-PEG₃-ArN₃.³³ Malgré les nombreuses caractéristiques intéressantes, la photoradiosynthèse des ⁸⁹Zr@AcMs présente plusieurs limites qui nécessitent des recherches plus approfondies. Des expériences antérieures utilisant différents chélates, radionucléides et protéines photoactifs ont révélé de fortes variations dans les CRC (Conversions RadioChimiques) et les RRC (Rendements RadioChimiques) isolés. La photoradiosynthèse utilisant [⁸⁹Zr][Zr(DFO-ArN₃)] a (jusqu'à présent) permis d'obtenir les CRC les plus élevés, les valeurs dans cette étude atteignant un pic de 58,1% à 3,4%, et dans les travaux précédents [⁸⁹Zr][Zr(DFO)@azepintrastuzumab] a été obtenue dans les CRC de 67% à 88%. Des études utilisant les radionucléides ⁶⁸Ga et ¹¹¹In combinés avec des radionucléides azamacrocycliques ou des chélates acycliques permettent d'obtenir des CRC photoinduits plus faibles dans une fourchette de 4% à environ 25%. La chimie est fortement dépendante de la géométrie expérimentale.

Bien que les études cinétiques aient montré que l'étape de photoinitiation était très efficace et dépendait linéairement du flux de photons, la forme du faisceau de photons, le point focal, le volume de la réaction, la diffusion ou l'absorption potentielle de la lumière incidente par le récipient de réaction ou les composants chimiques du mélange peuvent avoir un impact considérable sur les CRC observés. Les CRC expérimentaux montrent également une forte dépendance à la concentration initiale de protéines. Un autre problème est la faible solubilité de DFO-ArN₃ dans des conditions aqueuses. Il se dissout à un pH élevé de plus de 10 mais précipite facilement lorsque le pH est ajusté à la fenêtre optimale (7,5 - 9,0) requise pour la réaction photochimique. Des valeurs de pH plus élevées ne peuvent pas être utilisées car de nombreux anticorps ne tolèrent pas des conditions très basiques, et des expériences ont montré qu'à un pH d'environ 9,0 ; les CRC mesurés diminuent à cause de l'hydrolyse de la céténimine intermédiaire par les anions hydroxydes. Les problèmes de solubilité associées au DFO-ArN₃ peuvent potentiellement être résolus en utilisant des groupes éther dans le squelette du chélate, ou par l'ajout de chaînes de polyéthylène glycol entre le chélate et le

groupe photoactif ArN_3 . Actuellement, les variations des CRC sont également la principale raison pour laquelle il est plus difficile de purifier le $^{89}\text{Zr}@AcM$ à partir du mélange de réaction photochimique que les synthèses conventionnelles, qui présentent souvent un radiomarquage quantitatif. Ces problèmes de purification sont essentiellement techniques et peuvent être résolus en utilisant des méthodes de purification alternatives telles que la centrifugation sur colonne de spin. Néanmoins, l'amélioration de l'efficacité de la réaction reste l'objectif premier. Il reste beaucoup de travail à faire avant une normalisation des méthodes de photoradiosynthèse. L'onartuzumab a été utilisé pour être radiomarké au ^{89}Zr en utilisant la chimie du NCS et une alternative photochimique induite par LED en utilisant la chimie des aryles azides (ArN_3). Ces approches ont permis d'obtenir du $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO-Bn-NCS})@onartuzumab]$ et du $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO-azépine})@onartuzumab]$, qui se sont tous deux avérés viables ciblant le récepteur c-MET dans les adénocarcinomes gastriques³³. Le passage à une synthèse photochimique simultanée présente l'avantage d'être compatible avec des anticorps standards sans nécessité à éliminer ses excipients. La photoradiosynthèse a également été réalisée en moins de 15 minutes et a donné un produit final qui affichait une diminution de l'agrégation des protéines, et par conséquent, une absorption plus faible dans le foie et la rate. Ces données encouragent le développement de la photoradiosynthèse comme alternative pour la production de protéines radiomarkées ^{89}Zr de qualité clinique.

3.3 Dérivé hydrosoluble de la Desferrioxamine aryle azide

L'accès aux dérivés hydrosolubles de la DFO portant des liaisons (PEG)₃ est simple et facilite l'utilisation de la photochimie dans la synthèse des ⁸⁹Zr@AcMs (**Figure 69**).

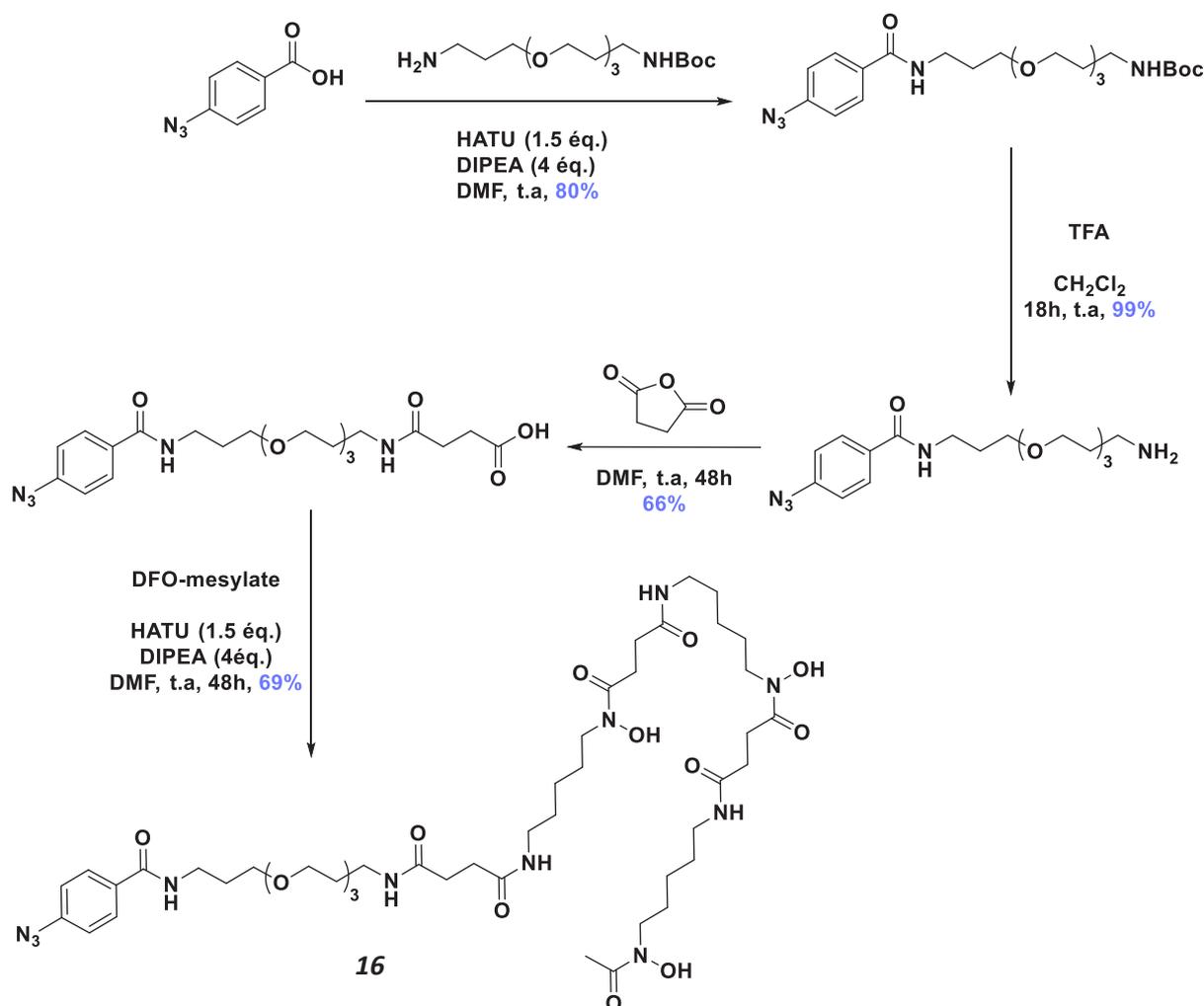


Figure 69 Synthèse du dérivé hydrosoluble et photoactivable du DFO, **16**

La partie qui équivaut à un linker en photochimie correspond au PEG₃ qui est très largement utilisé pour tenter d'augmenter la solubilité dans l'eau d'une molécule. Guillou, A. et al. ont décrit cette synthèse et la première photoconjugaison de ce ligand.⁴⁵ Après irradiation dans un tube en verre du DFO-PEG₃-ArN₃, le [⁸⁹Zr][Zr(ox)₄]⁴⁻ et le biovecteur de leur choix par une puissante diode électroluminescente (LED) dont le pic d'émission est à 395 nm a confirmé la conjugaison photochimique du complexe. La photochimie en « *one pot, two step* » (**Figure 70**) a été complètement observée en 15min.

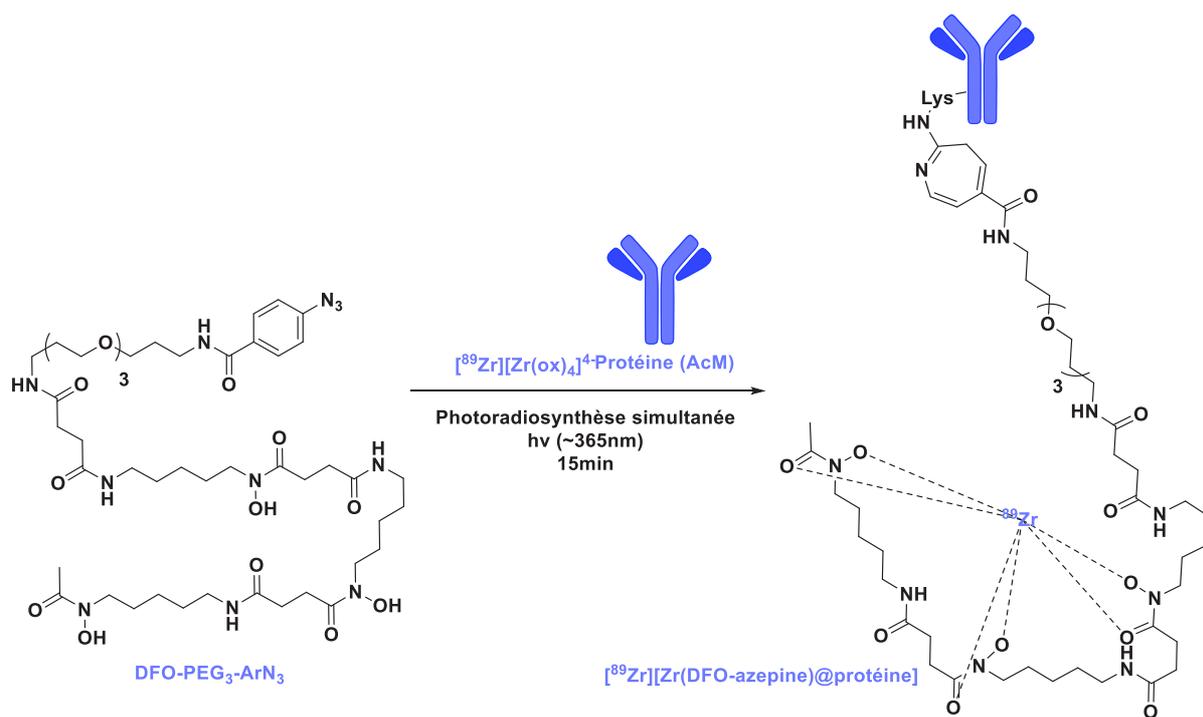


Figure 70 Photoradiosynthèse à composants multiples de $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO-azépine})@protéine]$

En effet, leurs rendements radiochimiques (RRC) isolés et corrigés de la désintégration pour les réactions de la protéine d'azépine $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO-PEG}_3)]$ avec le DFO-(PEG)₃-ArN₃ étaient de $72,9 \pm 1,9 \%$ pour le HSA, et $58,3 \pm 3,4 \%$ avec l'Herceptin (n= 3 mesures indépendantes pour chaque réaction ; avec des concentrations finales de protéines dans les mélanges réactionnels de 175 μM , 141 μM , 77 μM , respectivement). À titre de comparaison, les réactions pour former du $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO-PEG}_3\text{-azépine})@HSA]$ par irradiation à une longueur d'onde plus courte (365 nm) ont donné un RCY moyen de $70,7 \pm 2,3 \%$ (n = 3). Pour chaque réaction, la pureté radiochimique (RCP) des produits isolés était >90% (déterminée par HPLC). L'agrégation des protéines était <5% et, comparée à l'analyse des solutions mères de protéines, n'a pas augmenté après l'irradiation. Contrairement à des travaux précédents avec le DFO-ArN₃, les réactions faciles et la grande reproductibilité de ces expériences proviennent probablement de la solubilité accrue dans l'eau du composé **16**. Le profil de solubilité légèrement amélioré du DFO-(PEG)₃-ArN₃ a conduit à poursuivre d'autres études biologiques en utilisant le $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO-PEG}_3\text{-azépine})@onartuzumab]$. Des expériences de chélation ont démontré que le $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO-PEG}_3\text{-azépine})@onartuzumab]$ restait stable pendant l'incubation avec un excès de DTPA (>50 mM, pH 7, 37°C). Après incubation pendant 4 jours, <16% de la radioactivité se transchélatait sur le DTPA pour donner $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DTPA})]^-$ ce qui est

cohérent avec l'excellente stabilité du complexe $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO})]$ dans des conditions physiologiques. Ces études cellulaires ont révélé que le $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO-PEG}_3\text{-azépine})@onartuzumab]$ était immunoréactif.

3.4 Synthèse de dérivé de **15** photolabile

Dans le chapitre précédent, nous avons discuté d'une synthèse en solution de tripeptides de type Gly-Glu-Gly. En vue de la difficulté de développement et de purification d'une telle molécule aussi petite soit-elle, nous avons décidé d'établir une collaboration avec l'équipe de Jason Holland. Dans leur laboratoire, il m'a été possible de synthétiser des tripeptides différents et rapidement en utilisant la méthode de synthèse sur phase solide. J'ai utilisé une résine chlorure de 2-chlorotriptyle (100-200 mesh), Novabiochem® résumé en **Figure 71** dont la méthode a été adaptée à celle de Serra G.³²

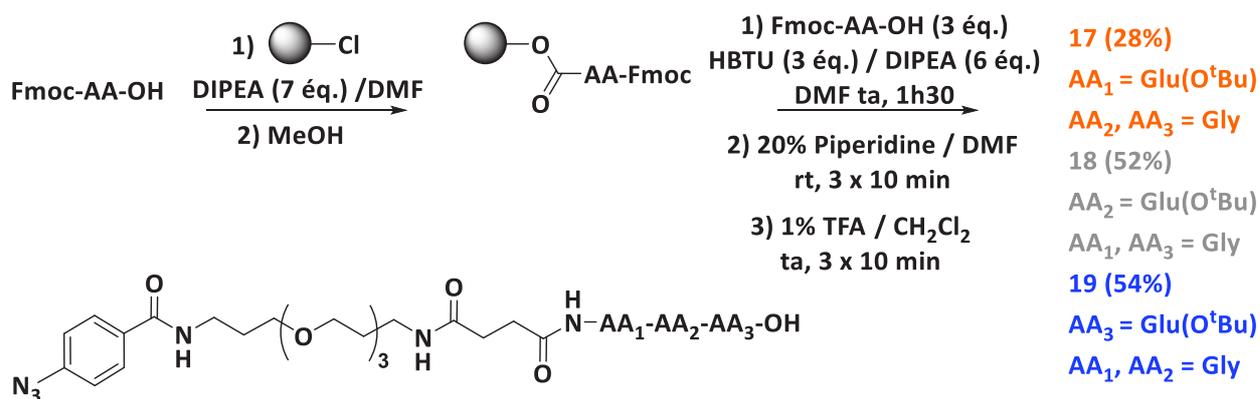


Figure 71 Procédure générale de la synthèse sur phase solide du tripeptide couplé au linker PEG₃ et le groupement photolabile aryle azide

Cette méthode de synthèse m'a permis de synthétiser en parallèle trois tripeptides. Il a été question d'étudier la position idéale de l'acide aminé participant à la complexation du Zirconium-89 et d'établir la meilleure géométrie pour compléter la sphère de coordination de ce métal. L'avantage de la synthèse sur phase solide m'a permis d'ajouter *in situ* le groupement photolabile avant le clivage du peptide de la résine. Après clivage et purification, les rendements de synthèse ont pu être déterminés et sont corrects (entre 28 et 54% sur 3 étapes). J'ai pu obtenir trois molécules purifiées et prêtes à être couplées au DFO. Ce couplage au DFO a été fait suivant les méthodes classiques d'utilisation du HATU (**Figure 72**).

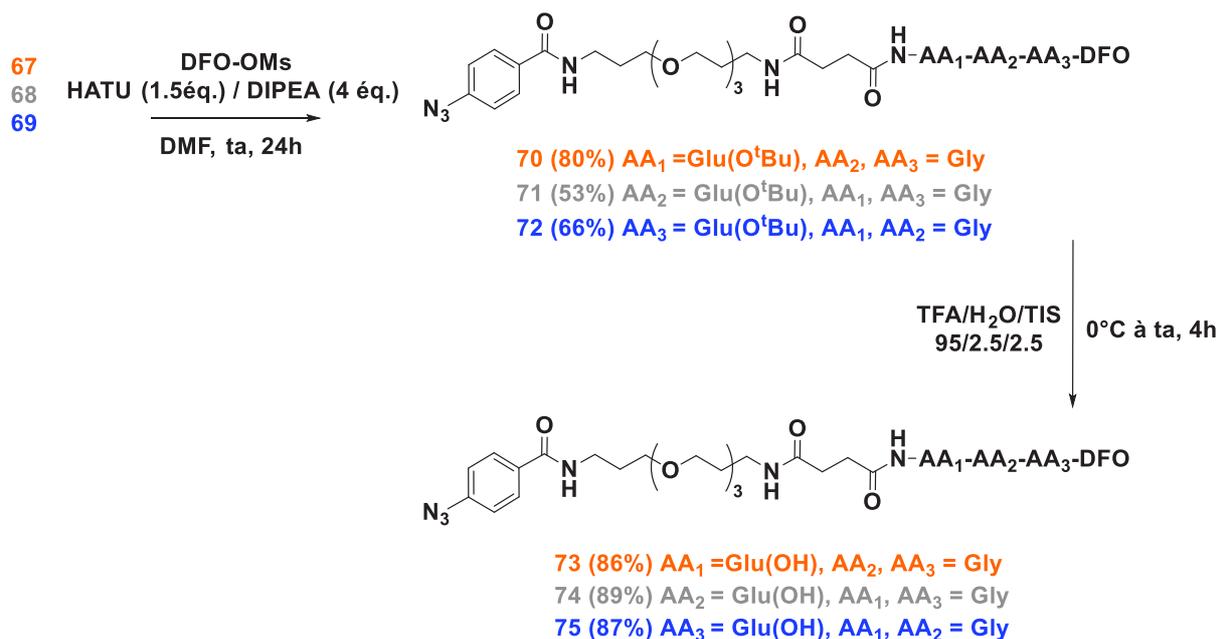


Figure 72 Procédure de couplage entre les tripeptides **17**, **18** et **19** et le DFO ainsi que la déprotection du tert-butyl pour donner les dérivés du DFO **23**, **24** et **25** (rendement déterminé après purification)

Après précipitation au congélateur durant 24 heures dans l'éther, puis dialyse et lyophilisation, j'ai pu obtenir **23**, **24** et **25**. Une petite partie a été analysée par Spectrométrie de masse Haute-Résolution on observe sur ces spectres (**Figure 73**) que le m/z correspond à ce qui a été calculé, soit m/z = 1250,65. On peut observer deux états ioniques, soit en **[23/24/25+H]⁺** nous donnant le pic correspondant à 1251,6466 m/z soit **[23/24/25-H]⁻** à 1249,6417 m/z. Nous avons donc bien nos molécules, avant des études *in vivo*. Pareillement à la molécule **15** il est nécessaire d'étudier la stabilité de celles-ci et de les comparer à la molécule de DFO-(PEG)₃-ArN₃ fournie par l'équipe de Jason Holland.

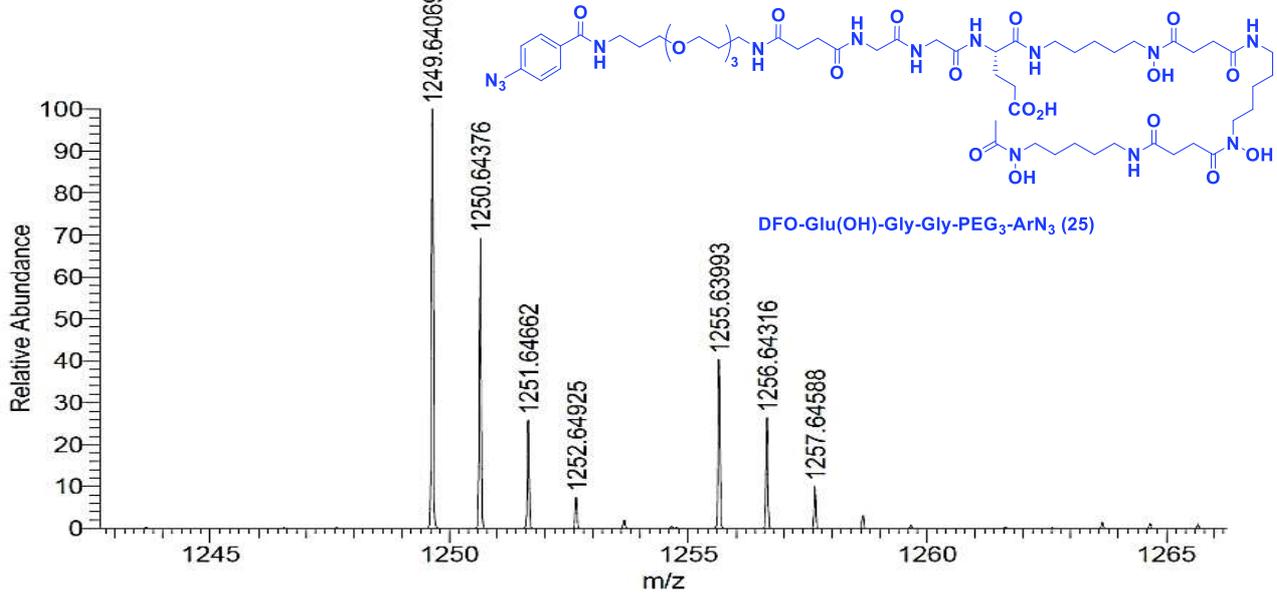
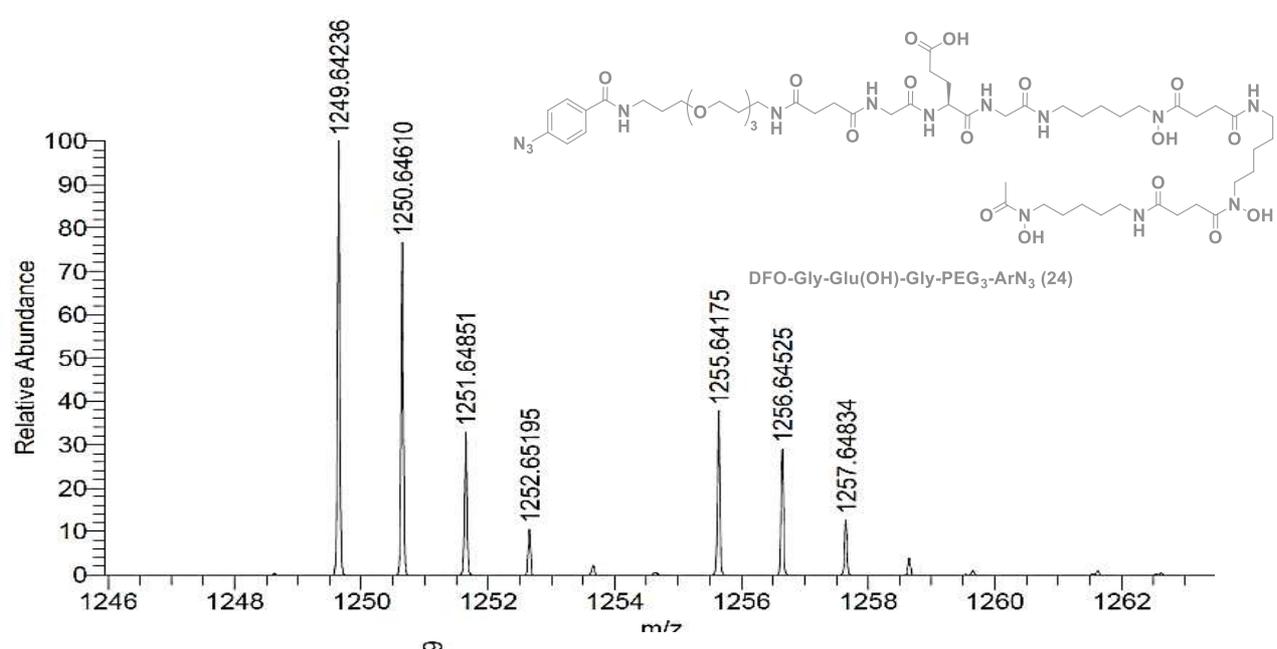
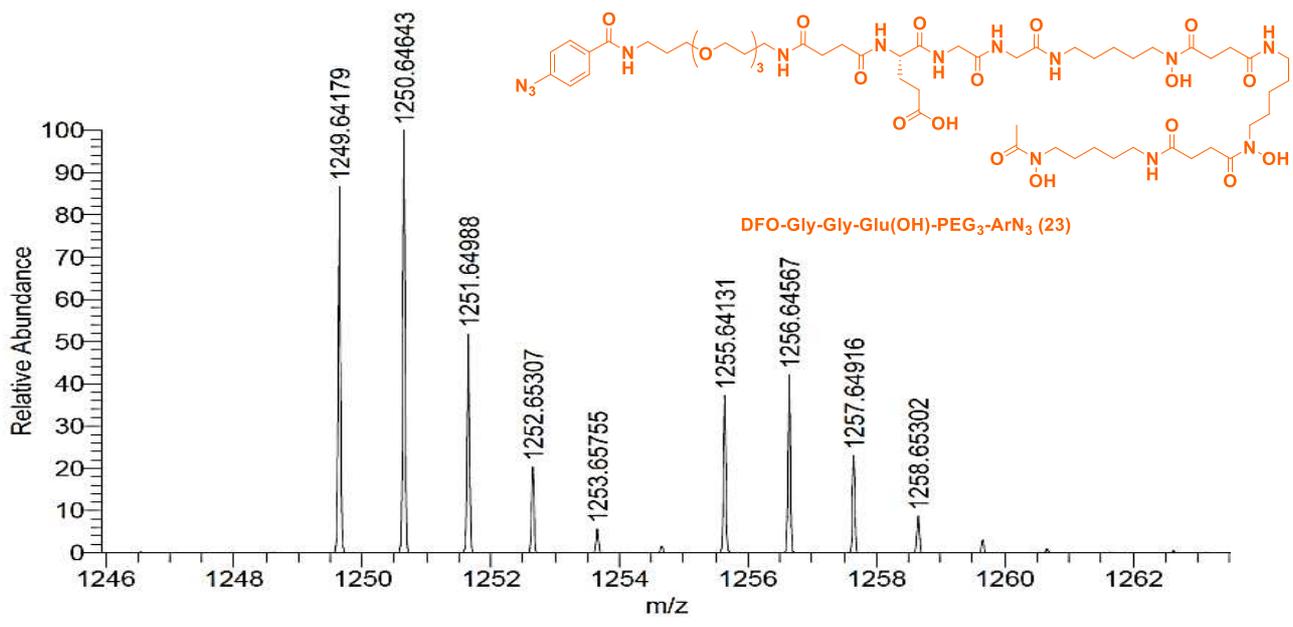


Figure 73 Analyse HR-ESI-MS des dérivés tripeptides du DFO.

4 Bibliographie

1. Baily, C. et al. What is the Best Radionuclide for Immuno-PET of Multiple Myeloma? A Comparison Study Between ^{89}Zr - and ^{64}Cu -Labeled Anti-CD138 in a Preclinical Syngeneic Model. *Int. J. Mol. Sci.*, **2019**, 20, 2564
2. Abou, D. S., Ku, T. & Smith-Jones, P. M. In vivo biodistribution and accumulation of ^{89}Zr in Mice. *Nucl. Med. Biol.*, **2011**, 38, 675–681
3. G. L. Glen, J. V. Silverton, and J. L. Hoard. *Inorg. Chem.*, **1963**, 2, 250-255
4. Dhungana, S., White, P. S. & Crumbliss, A. L. Crystal structure of ferrioxamine B: a comparative analysis and implications for molecular recognition. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2001**, 6, 810–818
5. Guérard, F. et al. Investigation of Zr(IV) and ^{89}Zr (IV) complexation with hydroxamates: progress towards designing a better chelator than Desferrioxamine B for immuno-PET imaging. *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 1002–1004
6. Holland, J. P. et al. ^{89}Zr -DFO-J591 for ImmunoPET of Prostate-Specific Membrane Antigen Expression In Vivo. *J. Nucl. Med.*, **2010**, 51, 1293–1300
7. Francesconi, L. C. et al. Alternative Chelator for ^{89}Zr Radiopharmaceuticals: Radiolabeling and Evaluation of 3,4,3-(LI-1,2-HOPO). *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 4849–4860
8. Patra, M. et al. An octadentate bifunctional chelating agent for the development of stable zirconium-89 based molecular imaging probes. *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 11523–11525
9. Kadi, N., Oves-Costales, D., Barona-Gomez, F. & Challis, G. L. A new family of ATP-dependent oligomerization-macrocyclization biocatalysts. *Nat. Chem. Biol.*, **2007**, 3, 652–656
10. Vugts, D. J. et al. Comparison of the octadentate bifunctional chelator DFO*-pPhe-NCS and the clinically used hexadentate bifunctional chelator DFO-pPhe-NCS for ^{89}Zr -immuno-PET. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2017**, 44, 286–295
11. Sornosa-Ten, A. et al. Effects of preorganization in the chelation of UO_2^{2+} by hydroxamate ligands: cyclic PIPO-vs. linear NMA-. *New J. Chem.*, **2018**, 42, 7765–7779
12. Jewula, P. et al. Synthesis and Structural Study of Tetravalent (Zr^{4+} , Hf^{4+} , Ce^{4+} , Th^{4+} , U^{4+}) Metal Complexes with Cyclic Hydroxamic Acids. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, 1529–1541
13. Raavé, R. et al. Direct comparison of the in vitro and in vivo stability of DFO, DFO* and DFOcyclo* for ^{89}Zr -immunoPET. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2019**, 46, 1966–1977
14. Allott, L. et al. Evaluation of DFO-HOPO as an octadentate chelator for zirconium-89. *Chem. Commun.*, **2017**, 53, 8529–8532
15. Holland, J. P. Predicting the Thermodynamic Stability of Zirconium Radiotracers. *Inorg. Chem.*, **2020**, 59, 2070–2082

16. Briand, M., Aulsebrook, M. L., Mindt, T. L. & Gasser, G. A solid phase-assisted approach for the facile synthesis of a highly water-soluble zirconium-89 chelator for radiopharmaceutical development. *Dalton Trans.*, **2017**, 46, 16387–16389
17. Chuangyan Zhai, Dominik Summer, Christine Rangger, Gerben M. Franssen, Peter Laverman, Hubertus Haas, Milos Petrik, Roland Haubner, and Clemens Decristoforo. *Mol. Pharmaceutics*, **2015**, 12, 2142-2150
18. Deri, M. A. et al. Alternative Chelator for 89Zr Radiopharmaceuticals: Radiolabeling and Evaluation of 3,4,3-(LI-1,2-HOPO). *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 4849–4860
19. Deri, M. A. et al. p-SCN-Bn-HOPO: A Superior Bifunctional Chelator for 89Zr ImmunoPET. *Bioconjug. Chem.*, **2015**, 26, 2579–2591
20. Abergel, R. J. & Raymond, K. N. Terephthalamide-containing ligands: fast removal of iron from transferrin. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*, **2008**, 13, 229–240
21. Pandya, D. N., Pailloux, S., Tatum, D., Magda, D. & Wadas, T. J. Di-macrocyclic terephthalamide ligands as chelators for the PET radionuclide zirconium-89. *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 2301–2303
22. Guérard, F., Lee, Y.-S. & Brechbiel, M. W. Rational Design, Synthesis and Evaluation of Tetrahydroxamic Acid Chelators for Stable Complexation of ZrIV. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.*, **2014**, 20, 5584–5591
23. Seibold, U., Wängler, B. & Wängler, C. Rational Design, Development, and Stability Assessment of a Macrocyclic Four-Hydroxamate-Bearing Bifunctional Chelating Agent for 89Zr. *Chem. Med. Chem.*, **2017**, 12, 1555–1571
24. E. Boros, J. P. Holland, N. Kenton, N. Rotile, P. Caravan, *ChemPlusChem*, **2016**, 81, 274.
25. Pandya DN, Bhatt N, Yuan H, et al. Zirconium tetraazamacrocyclic complexes display extraordinary stability and provide a new strategy for zirconium-89-based radiopharmaceutical development. *Chem Sci.*, **2017**, 8, 2309-2314
26. Alves, L. G. et al. Synthesis and structural characterization of novel cyclam-based zirconium complexes and their use in the controlled ROP of rac-lactide: access to cyclam-functionalized polylactide materials. *Dalton Trans.*, **2012**, 41, 14288–14298
27. Iris Verel, Gerard W.M. Visser, Ronald Boellaard, Marijke Stigter-van Walsum, Gordon B. Snow and Guus A.M.S van Dongen. *J. Nucl. Med.*, **2003**, 44, 1271-1281
28. Jurek, P., W02008124467, *Bifunctional Hydroxamic Acid Ligands and Method of Synthesis*. **2008**
29. Vosjan, M. J. W. D. et al. Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p -isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine. *Nat. Protoc.*, **2010**, 5, 739–743

30. Mikos Bodanszky and Agnes Bodanszky, *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer, **1994**
31. Vong, K. K. H., Maeda, S. & Tanaka, K. Propargyl-Assisted Selective Amidation Applied in C-terminal Glycine Peptide Conjugation., *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 18865–18872
32. Fagundez, C., Sellanes, D. & Serra, G. Synthesis of Cyclic Peptides as Potential Anti-Malarials. *ACS Comb. Sci.*, **2018**, *20*, 212–219
33. Klingler, S., Fay, R. & Holland, J. P. Light-Induced Radiosynthesis of ⁸⁹Zr-DFO-Azepin-Onartuzumab for Imaging the Hepatocyte Growth Factor Receptor., *J. Nucl. Med.*, **2020**, *61*, 1072–1078
34. James P. Davidson, Olga Lubman, Thierry Rose, Gabriel Waksman, and Stephen F. Martin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 205-215
35. Bayley, H. & Knowles, J. R. Photoaffinity labeling. *Methods Enzymol.*, **1977**, *46*, 69–114
36. Chowdhry, V. & Westheimer, F. H. Photoaffinity Labeling of Biological Systems. *Annu. Rev. Biochem.*, **1979**, *48*, 293–325
37. Richard A. G. Smith and Jeremy R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, *95*, 5072–5073
38. Brunner, J., Senn, H. & Richards, F. M. 3-Trifluoromethyl-3-phenyldiazirine. A new carbene generating group for photolabeling reagents. *J. Biol. Chem.*, **1980**, *255*, 3313–3318
39. Bou-Hamdan, F. R., Lévesque, F., O'Brien, A. G. & Seeberger, P. H. Continuous flow photolysis of aryl azides: Preparation of 3H-azepinones. *Beilstein J. Org. Chem.*, **2011**, *7*, 1124–1129
41. Platz, M. S. Comparison of Phenylcarbene and Phenylnitrene., *Acc. Chem. Res.*, **1995**, *28*, 487–492
42. Eichenberger, L. S., Patra, M. & Holland, J. P. Photoactive chelates for radiolabelling proteins. *Chemical Communications*, **2019**, *55*, 2257–2260
43. Patra, M., Eichenberger, L. S., Fischer, G. & Holland, J. P. Photochemical Conjugation and One-Pot Radiolabelling of Antibodies for Immuno-PET., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2019**, *58*, 1928–1933
44. Patra, M., Klingler, S., Eichenberger, L. S. & Holland, J. P. Simultaneous Photoradiochemical Labeling of Antibodies for Immuno-Positron Emission Tomography. *iScience*, **2019**, *13*, 416–431
45. Guillou, A., Earley, D. F. & Holland, J. P. Light-Activated Protein Conjugation and ⁸⁹Zr-Radiolabelling with Water-Soluble Desferrioxamine Derivatives. *Chem. Eur. J.*, **2020**, *26*, 7185–7189

Chapitre 4 : Etude *in vitro*

1 Complexation de ⁸⁹Zr et du Zirconium-89

1.1 Matériels et méthodes

1.1.1 Introduction

Le Zirconium naturel n'ayant aucun rôle connu dans les systèmes biologiques, la libération incontrôlée, par transchélation, de son isotope radioactif à partir de produits radiopharmaceutiques injectés, reste une des préoccupations majeures. La forte affinité du Zr pour le phosphore conduit à son dépôt éventuel dans des tissus riches en phosphate, notamment le foie, les reins et les os. Il est donc essentiel dans un premier temps de comprendre la stabilité des complexes de ⁸⁹Zr seuls. Nous avons vu dans le **Tableau 10** (page 87) que les tests de stabilité *in vitro* étaient de bons indicateurs en pré-clinique et en pré-injection animal. Des stabilités faibles en milieu tamponné pH 7,4 sont très souvent révélateurs d'une mauvaise complexation d'un agent chélateur. La complexation des ligands avec le radiométal a été contrôlée à l'aide d'un papier de chromatographie sur couche mince instantanée imprégné de silice (iTLC-SG) (Agilent Technologies). Ces CCM ont été analysées sur un radiochromatographe Ray-Test miniGita, dont la fenêtre énergétique est de 500 à 1500 keV. Ce système de radio-CCM utilisé pour l'analyse de la pureté radiochimique des produits radiopharmaceutiques marqués au ⁸⁹Zr est le plus utilisé dans la littérature¹⁻⁶. Ces systèmes sont principalement utilisés pour analyser les anticorps monoclonaux marqués au Zirconium-89 afin de déterminer le taux de Zirconium-89 non lié. Le système iTLC-SG/50-100 mM EDTA pH 5.0 est souvent mentionné dans la littérature⁷ pour l'analyse des préparations de complexes à base de Zr-89. Le Zirconium formant un complexe stable avec l'EDTA dont la constante de stabilité ($\log\beta$) pour $^{nat./89}\text{Zr}(\text{EDTA})^0$ est de $27,9 \pm 0,1$ ⁸. Sur une CCM, le complexe $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}(\text{DFO})]$ aura un $R_f = 0$ et pour le ⁸⁹Zr-non lié un $R_f = 1$. J'ai décidé d'utiliser ce système comme façon de contrôler la complexation du Zirconium-89.

1.1.2 Préparation des solutions : complexation des ligands et du Zirconium-89

J'ai préparé différentes solutions de ligand **15** et de **DFO** commerciale (sel de mésylate, Sigma-Merck à 1mM après dilution d'une solution à 7mM) dans l'eau déionisée ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Ainsi, en contrôlant le volume on peut contrôler la quantité de matière du ligand utilisé. Cela sera justement très concret lors des tests de *challenge* à l'EDTA. Pour la complexation j'ai préparé 25 μL d'une solution à 1M HEPES dont le pH a été fixé à 7,4. Après ajout de 2,5 μL de la solution du ligand, soit 2.5 nmole de ligand (1mM), on ajoute finalement une activité suffisante de Zr-89. Pour ces études, la forme du Zirconium-89 utilisée est la forme oxalate qui est neutralisée avec une solution de Na_2CO_3 1M à un pH compris dans une fourchette de 7,4 - 7,8. Sous la barre de pH 7,4 ; j'ai observé une difficulté à complexer le Zirconium, il en est de même pour une solution basique $\text{pH} > 8$. L'étape de complexation est le moment où est finalement évaluée la cinétique de complexation. La cinétique de complexation du DFO n'est pas rapide. 15 à 60 min sont nécessaires pour complexer, suivant le pH, l'intégralité d'une solution en Zirconium-89 à température ambiante. Dans mon cas, j'ai remarqué que 15 minutes à température ambiante ne suffisaient pas nécessairement à tout complexer. J'ai fait varier les deux paramètres que sont le temps de réaction et la température. Après 15 minutes à 37°C sous agitation, le DFO a intégralement complexé la même quantité de ^{89}Zr employée à température ambiante. En parallèle, en utilisant le même mode opératoire, l'agent chélatant **15** est capable de complexer l'intégralité du Zr-89 mis en jeu. Pour résumer, lorsque l'on veut complexer entre 3 à 5,5 MBq, que ce soit pour le **DFO** ou pour **15**, 15 minutes à 37°C suffisent. Les progressions des différentes réactions sont analysées à l'aide de CCM jusqu'à une disparition complète du pic à $R_f = 1$ (**Figure 74**).

Les études de radiochimie ont montré que les ligands ont été quantitativement radiomarqués en 15 minutes à 37°C ; aussi bonnes que les meilleures conditions de radiochimie décrites pour les chélateurs du ^{89}Zr récemment publiés. Les activités molaires apparentes pour les complexes $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO})]$ et $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\mathbf{15})]$ sont respectivement de 2088 $\text{MBq}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$ et 2128 $\text{MBq}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$, et sont en accord avec d'autres complexes ^{89}Zr rapportés dans la littérature⁹⁻¹¹.

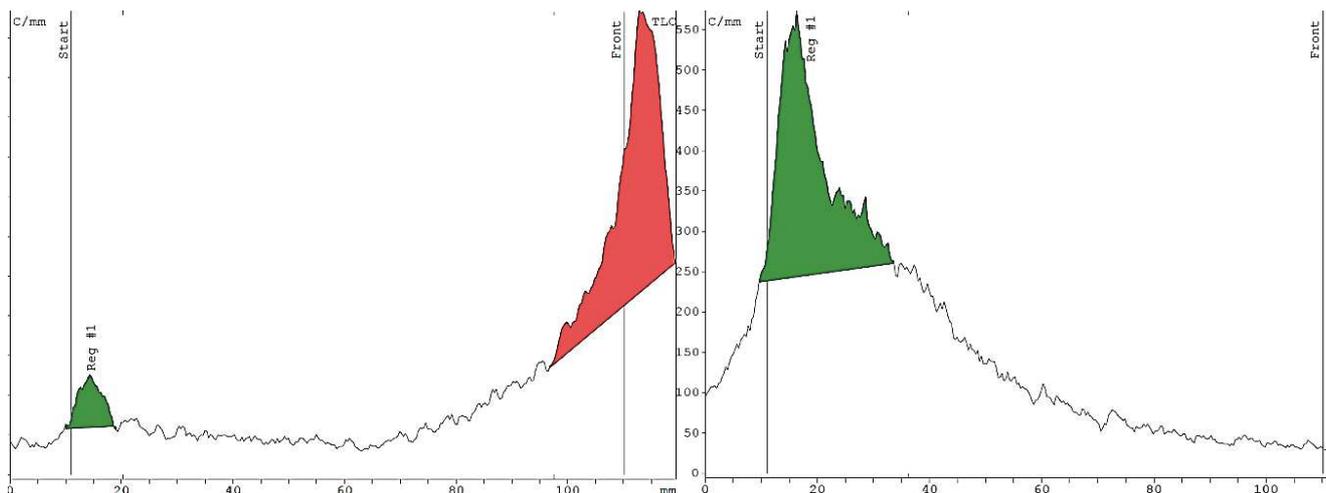


Figure 74 à gauche, CCM démontrant une complexation à 96% à $T = 1$ min et à droite une complexation totale à $T = 15$ min

1.2 Tests de stabilité en milieu aqueux

1.2.1 Dans du PBS

Les complexes $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\mathbf{15})]$ et $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO})]$ ont été dilués dans un tampon PBS pH 7.4 et mis sous agitation (800 tr/min) à une température de 37°C. La stabilité est analysée par radio-CCM après 24, 48, 72, 96 et 168h. La **Figure 75** résume la stabilité du complexe **15** dans le tampon, on remarque une excellente stabilité lors des 4 premiers jours avant une perte de complexation à 7 jours. Le DFO quant à lui reste stable pendant 7 jours. Toutes les expériences ont été répliquées trois fois. La stabilité d'un agent chélatant le ^{89}Zr est un facteur critique dans le développement d'un radiopharmaceutique à base d'anticorps. Le $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\mathbf{15})]$ a été *challengé* en présence d'un large excès d'EDTA et de protéines de sérum de souris.

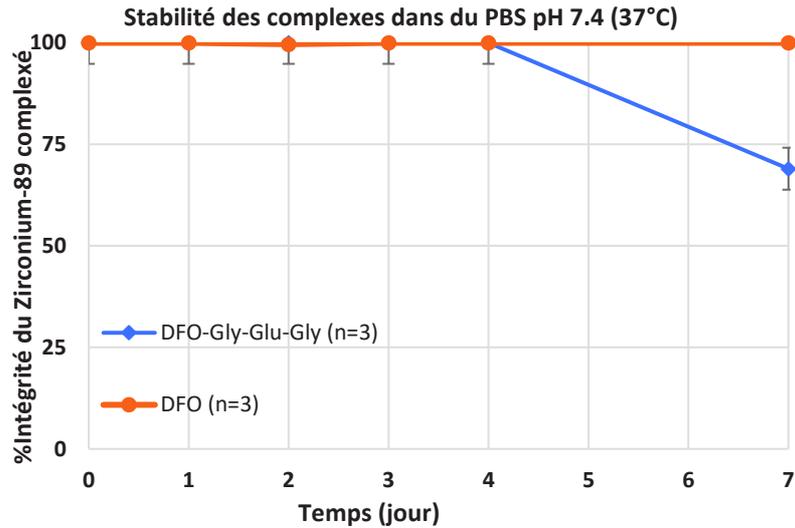


Figure 75 Stabilité des agents complexants **15** (en bleu) et le DFO commerciale (en orange) dans le PBS 7,4 en fonction du temps à 37°C

1.2.2 Face à l'EDTA

La stabilité des chélatants radiomarqués ont été évaluées en présence d'EDTA en ajoutant 100 équivalents d'EDTA à 1 MBq de chélate radiomarqué dilué dans 50 µL de PBS pH 7,4. Les mélanges ont été incubés à 37°C. Les aliquots ont été analysés par radio-CCM. Au bout de 24h, $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\mathbf{15})]$ est encore intègre à 28% en présence d'EDTA alors que le $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO})]$ ne l'est plus du tout. Les résultats sont visibles ci-dessous en **Figure 76**.

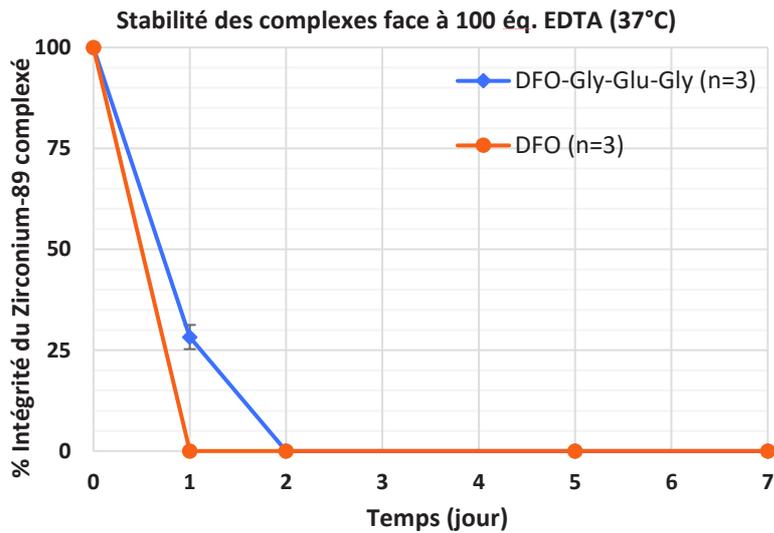


Figure 76 Stabilité des agents complexants **15** et le DFO commerciale face à un excès d'EDTA dans le PBS 7.4 en fonction du temps à 37°C

1.3 Dans du plasma murin

Finalement, le meilleur moyen de *simuler* la stabilité, la cinétique de transchélation dans un cocktail de protéines est encore d'établir une réaction dans du plasma murin. Pour cela j'ai suivi le mode opératoire classique de la littérature qui indique de diluer une activité suffisante dans une quantité de plasma allant de 100 à 500 μL . De notre côté, 0,8 - 1 MBq de la solution des complexes préparés précédemment fut dilués dans 200 μL de plasma murin et maintenu sous agitation à 37°C durant 7 jours. Toutes ces réactions furent réalisées 3 fois. Chaque jour, une quantité fut prélevée et déposée sur CCM pour être analysée. On obtient alors les résultats résumés dans le **Figure 77**. Le tableau retrace le pourcentage de Zirconium-89 complexé aux différents ligands sur une période d'une semaine. Pour plus de clarté, les valeurs du **Figure 77** ne descendent pas sous les 90% sur l'axe des ordonnées. Au bout de 48 heures, nous pouvons remarquer une baisse de 3% pour la DFO commerciale contrairement à **15** qui n'a perdu que 0,23% du Zirconium. En accord avec les données de la littérature, le Zirconium-89 complexé au DFO est stable *in vitro*. Pour la molécule **15**, on peut affirmer que jusqu'à 4 jours le caractère heptadentate fait ses preuves. Néanmoins, la baisse majeure se déroule entre 5 et 7 jours où la quantité de Zirconium-89 « libre » trouvé dans le plasma est de 4,83%.

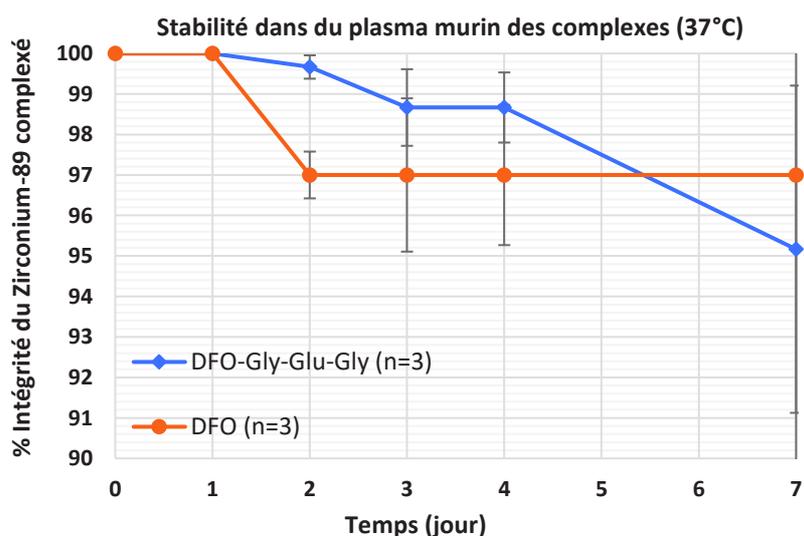


Figure 77 Stabilité des agents complexants **15** et le DFO commerciale aux protéines dont des transferrines présentes dans un plasma murin, maintenant sous agitation durant 7 jours (168 heures) à 37°C

Ces valeurs restent en accord avec ce qu'on attend d'un ligand heptadentate, c'est-à-dire que l'agent complexant maintient l'isotope plus efficacement sur une période de 4 jours.

1.4 Détermination du log D

Afin de discuter de l'hydrophilie ou l'hydrophobie d'une molécule, la détermination du log P ou du log D est importante lorsque l'on caractérise un nouveau ligand. Nous avons fait le choix de déterminer le log P à pH 7,4 donc d'un log $D_{7,4}$ qui rend compte plus réellement de la solubilité d'un composé dans un milieu vivant. Pour cette expérience, j'ai utilisé la méthode dite du « flacon agité »¹². Dans un mélange de 1 mL de tampon PBS pH 7,4 et 1 mL de *n*-octanol, 10 μ L correspondant à 0,5 MBq de la solution de radiocomplexe sont ajoutés. Le *n*-octanol est lavé à l'eau par centrifugation avant d'être utilisé. Le mélange est alors vigoureusement agité pendant 20 minutes à 37 °C. Les deux phases sont ensuite séparées par centrifugation (11000 tr/min, 4 minutes) et 50 μ L de chaque phase sont collectées et comptées. Les expériences sont réalisées trois fois et le log $D_{7,4}$ a été déterminé suivant l'équation suivante :

$$\log D_{7,4} = \log (A_{n\text{-octanol}} / A_{\text{PBS pH } 7,4}) \text{ avec } A_{n\text{-octanol}} \text{ et } A_{\text{PBS pH } 7,4} \text{ les activités mesurées respectivement dans les } 50 \mu\text{L de } n\text{-octanol et les } 50 \mu\text{L de PBS.}$$

On obtient alors les résultats du **Tableau 13** et on peut alors conclure que d'après ces résultats d'expériences, tous les analogues présentent un caractère hydrophile, ce qui est très probablement dû à la fois à leurs charges à pH neutre. Les liaisons hydrogènes que ces ligands peuvent présenter en solution vont dans ce sens. Néanmoins, la molécule **15** présente une lipophilicité plus élevée que les autres analogues du DFO (DFO* et DFOCyclo*) mais possède une hydrophilie plus élevée que le DFO-HOPO.

Tableau 13 Coefficient de répartition dans le n-octanol/PBS (pH 7,4) (litt. : d'après la littérature, l'expérience n'a pas été reproduite)

Produits	logD _{7,4}
DFO-Glu-Gly-Glu-NH ₂ ⁽¹⁵⁾	-1,52 ± 0,13
DFO ⁽⁶⁾	-3,61 ± 0,21
DFO* ⁽⁶⁾	-3,54 ± 0,16
DFO*Cyclo ⁽⁶⁾	-2,14 ± 0,03
DFO-HOPO ⁽¹³⁾	-0,87 ± 0,03

1.5 Conclusion

La molécule **15** radiomarquée au ⁸⁹Zr a montré une stabilité *in vitro* légèrement supérieure comparée au DFO commerciale. Le DFO-tripeptide est un candidat prometteur pour un ligand heptadentate dérivé du DFO.

2 Complexation de 23, 24 et 25 avec le Zirconium-89

2.1 Etude de stabilité *in vitro*

La première étape avant toute étude de stabilité *in vitro* est de connaître les conditions optimales de radiocomplexation des ligands. Pour cela j'ai adapté la méthode utilisée au laboratoire pour complexer le Zr-89 au DFO-mesyate. Après avoir neutralisé à pH ~ 7,6 – 7,8 la solution de $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{ox})_4]^{4-}$ via l'ajout d'une solution de Na_2CO_3 1M, j'ai d'abord laissé réagir 5 MBq de Zr-89 à 2,5 pmol de ligand. Point important, la solubilité des quatre ligands est remise en cause, en effet lorsque j'ai préparé mes solutions à 1mM j'ai dû rajouter 5% du volume en DMSO pour pouvoir solubiliser le tout. Les études de logP sont alors impossibles à faire pour le moment. Après 15 minutes dans du PBS pH 7,4 ; via un suivi par CCM, seul 60% de Zirconium-89 est complexé à 37°C pour **23** et **24**. Le **DFO-(PEG)₃-ArN₃** et **25** ont complexé intégralement le Zirconium-89. Après 30 minutes, il restait 10 - 15 % de Zirconium libre dans les mélanges restant. Ce n'est qu'au bout de 45 minutes que 100% du Zirconium-89 a été complexé par **23** et **24**.

2.1.1 Stabilité des ligands dans du plasma murin

La méthode afin d'étudier la stabilité de ces ligands est la même que pour le dérivé **15**. J'ai déposé 5MBq, dans le cas de la stabilité des ligands, dans du plasma murin (100 µL).

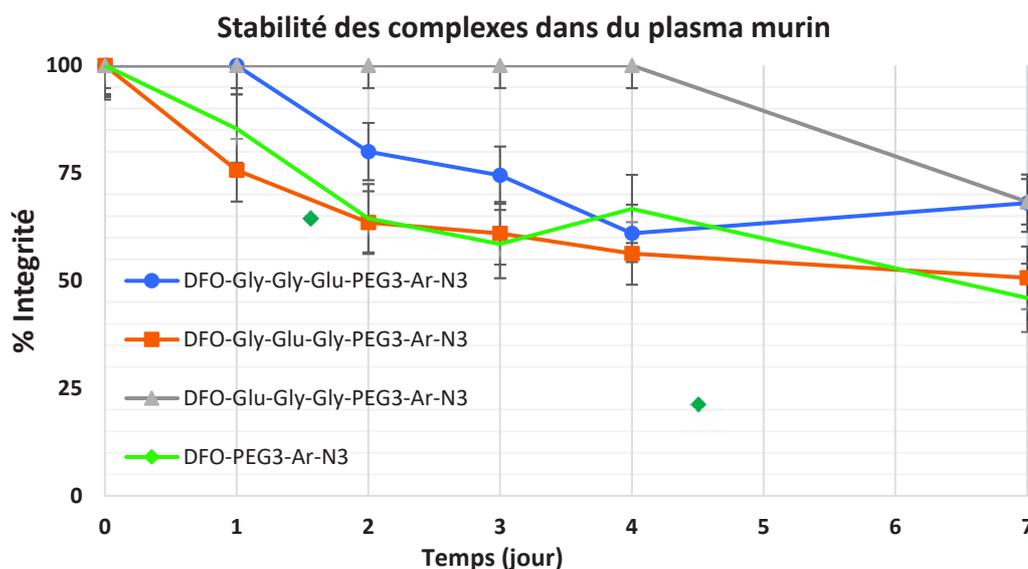


Figure 78 Etude de stabilité des quatre ligands dans du plasma murin durant 7 jours à 37°C

En prélevant chaque jour une petite quantité (5 à 8 μL) j'ai pu établir l'étude de stabilité jusqu'à 7 jours (**Figure 78**). Le DFO-Glu-Gly-Gly-PEG₃-Ar-N₃ semble le meilleur, les autres ligands présentent le même profil et sont peut-être hydrolysés par une enzyme du plasma. La courte séquence d'acides aminés est potentiellement susceptible au catabolisme.

2.1.2 Stabilité face à la transchélation l'EDTA

Pour étudier de manière poussée la transchélation possible de ces dérivés du DFO vers l'EDTA, j'ai prêté une attention forte au pH du milieu. L'EDTA élimine rapidement les ions Zr^{4+} du DFO lorsque le pH descend en dessous de 7. Les groupes hydroxamates sont facilement protonés à $\text{pH} < 6.5$, de sorte que les carboxylates de l'EDTA entrent en compétition pour la coordination des ions métalliques. En effet, le pH a donc été maintenu entre 7.4 et un maximum de 7.6 par un contrôle quotidien. L'étude de stabilité montre que le $[\text{Zr}^{89}][\text{Zr}(\mathbf{16})]$ reste intègre à 70% après 24h, il reste stable jusqu'à 4 jours avant de montrer à nouveau une diminution de l'intégrité après 7 jours. Les complexes tripeptides **23**, **24** et **25** montrent une meilleure stabilité que **16** tout au long de l'étude. Ils sont très stables les 2 premiers jours ($>95\%$) voire 4 jours pour le complexe **25** avant de présenter une diminution, surtout entre J+4 et J+7 (**Figure 79**).

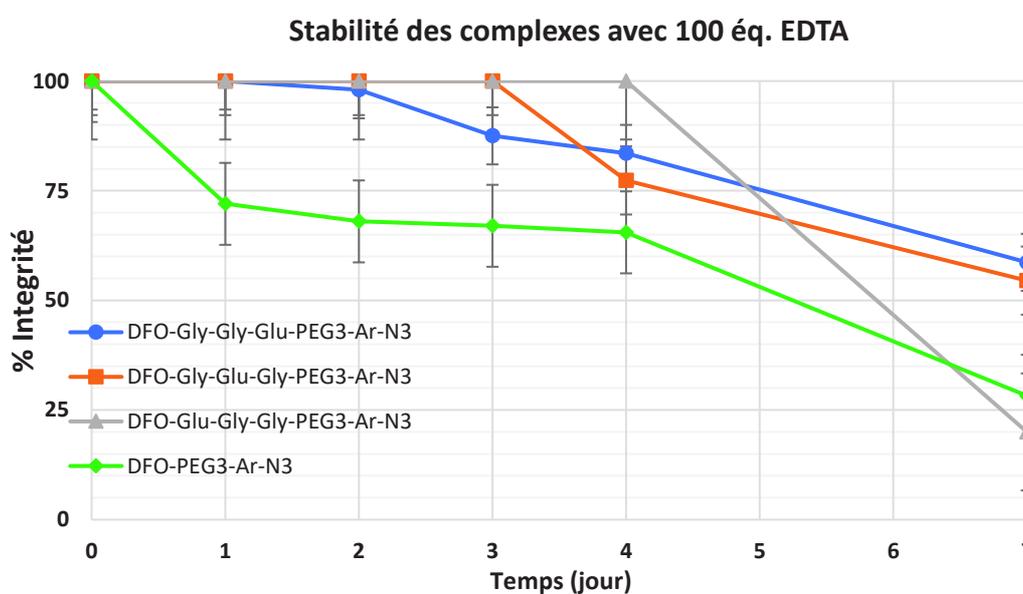


Figure 79 Etude de transchélation face à une solution d'EDTA (100 éq., 10mM, pH 7) des quatre ligands durant 7 jours à 37°C

2.1.3 Stabilité face à la transmétallation

Pour rappel, le DFO peut être utilisé comme thérapie pour diminuer la quantité de Fer dans le sang. Ainsi, lorsqu'on injecte *in vivo* les complexes de Zr-89, ce radionucléide se trouve en compétition avec le Fer. La transmétallation peut alors se produire. Le *challenge* au Fer(+III) est essentiel et se présente comme suit : 100 éq. d'une solution de Fe^{3+} (1 mM) dans l'eau est ajoutée à 4 – 5 MBq des 4 solutions de ligands complexés. De même que les études précédentes, un suivi sur une semaine a été fait et j'obtiens le graphique du **Figure 80**. Le $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}(\mathbf{25})]$ démontre une résistance remarquable à la transchélation après 24 h d'incubation avec 100 éq. de Fe^{3+} avant d'observer une forte transchélation à J+2. Globalement, les trois $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}(\mathbf{23})]$, $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}(\mathbf{24})]$ et $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}(\mathbf{25})]$ montrent une stabilité à J+7 comparé à **16**, la dématallation est moindre pour **23** à J+2 avec 60% de complexe intègre, à partir de 3 jours tous les complexes évoluent de la même manière. Cette étude montre une meilleure stabilité des ligands DFO-Tripeptides résultant de l'augmentation de la coordination du centre métallique par ces ligands heptadentates.

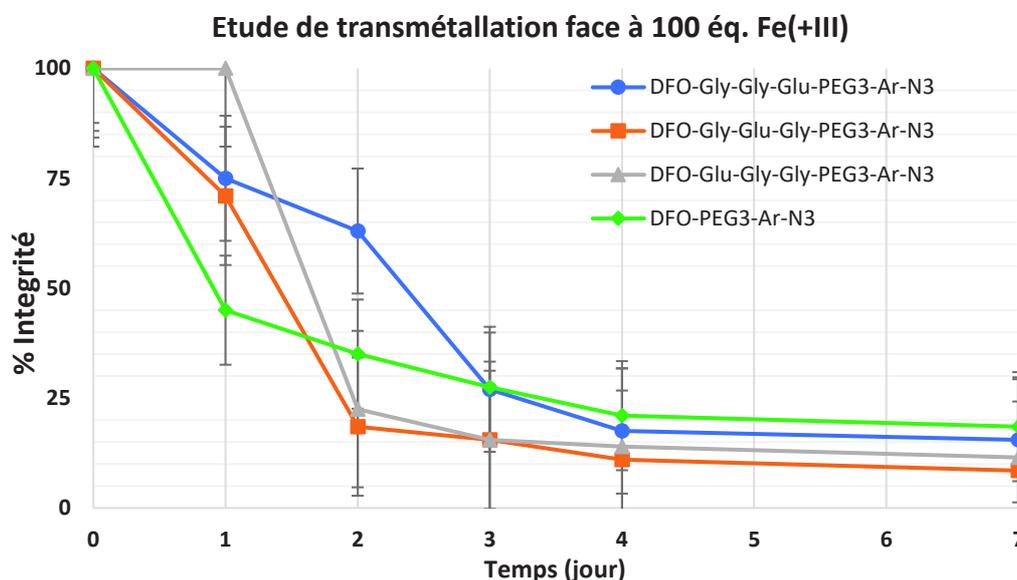


Figure 80 Etude de transmétallation face à une solution de Fe^{3+} (100 éq., 1mM, pH 7) des 4 ligands durant 7 jours à 37°C

2.2 La stabilité thermodynamique d'un complexe métal-ligand, telle que mesurée par la constante de formation ($\log \beta$)

Tous les calculs ont été effectués par l'équipe de Holland, J., en utilisant la théorie fonctionnelle de la densité (DFT) telle qu'elle est mise en œuvre dans la suite de programmes de chimie quantique ab initio de la révision A.03 de Gaussian16.¹³ Toutes les structures ont été optimisées en solution en utilisant un modèle de continuum polarisable (PCM) sans contraintes de symétrie. Le choix du modèle de solvatation reflète les conditions de la phase aqueuse utilisées dans le radiomarquage au Zirconium-89 des molécules portant le ligand DFO. Les structures et les orbitales moléculaires optimisées ont été analysées à l'aide de Chemcraft (version 1.8, build 536b). Pour simplifier les calculs, des structures modèles ont été utilisées dans lesquelles la structure de la Desferrioxamine-tripeptide-PEG₃-ArN₃ était terminée par un groupe méthyle au lieu de la fraction PEG₃-ArN₃ (**Figure 81**) qui est distant par rapport à la première sphère de coordination de l'ion Zr⁴⁺. Les constantes de formation estimées ont été calculées conformément au modèle développé dans leurs travaux publiés en 2020.¹⁴

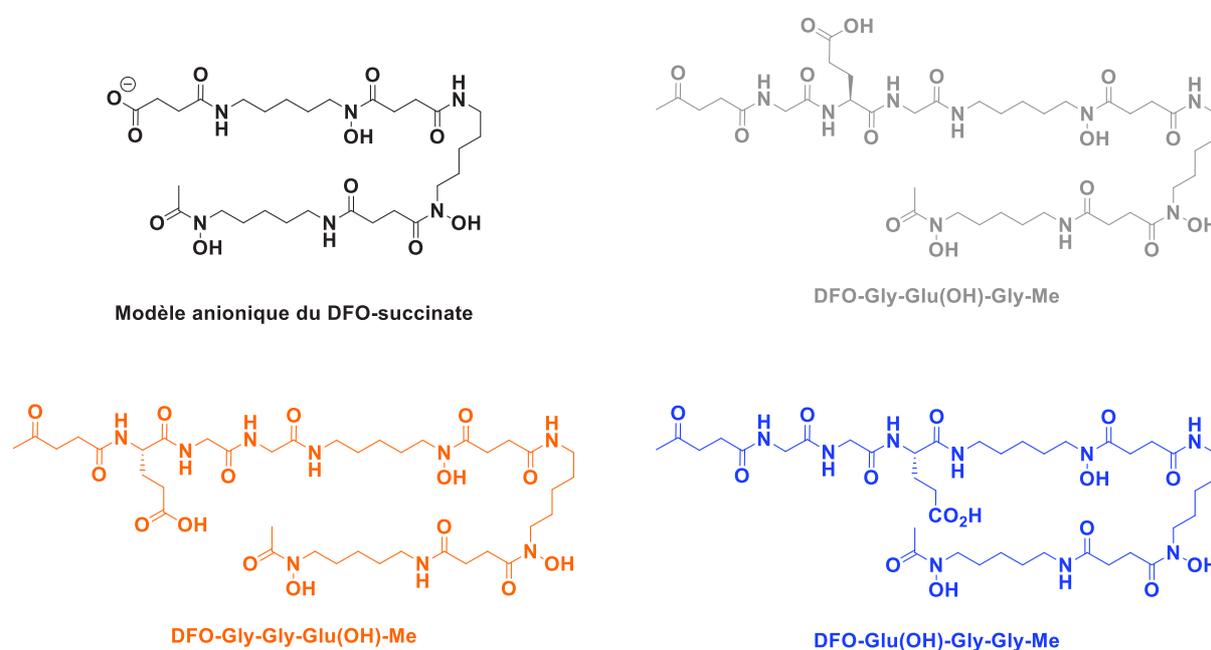
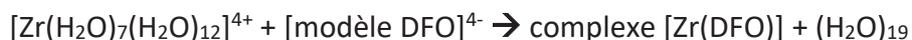


Figure 81 Structures des 4 différents ligands étudiés dont la fraction PEG₃-ArN₃ a été remplacé par un groupe méthyle pour les calculs de la DFT.

Le modèle de réaction est donné par l'équation :



La structure optimisée du ligand anionique modèle a été calculée en optimisant d'abord la géométrie du complexe Zr équivalent, puis en retirant l'ion métallique de la structure et en réoptimisant le ligand anionique. Dans tous les cas, seul l'isomère N-cis-cis2 le plus stable par rapport à la géométrie de coordination du ligand DFO autour de l'ion Zr(+IV) a été pris en compte. Dans l'ensemble, les trois différents ligands ne sont pas vraiment différents les uns des autres en termes de thermodynamique. Le [Zr(DFO-Gly-Gly-Gly-C(O)M)] donne un complexe légèrement plus stable (thermodynamiquement), mais cette différence est à la limite de la signification chimique pour les calculs de la DFT (**Tableau 14**).

Tableau 14 Calcul de l'énergie de réaction de complexations des 4 ligands aux Zr^{4+} avec une géométrie à 7 coordonnées dans la première sphère de coordination du cation métallique

B3LYP/DGDZVP/PCM	Thermodynamique calculée pour la formation complexe ($T = 298.15 \text{ K}$)					Pseudo Log calculé β'	Log β estimé
	$\Delta\varepsilon(\text{SCF}) / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta\text{ZPE} / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta G / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S / \text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$		
[Zr(DFO-succinate)]	-730,8	10,9	-774,9	-729,5	264,7	135,74	45,47
[Zr(DFO-Gly-Gly-Gly-C(O)Me)]	-749,5	8,0	-798,7	-746,8	264,7	139,90	47,57
[Zr(DFO-Gly-Gly-Gly-C(O)Me)]	-763,5	7,9	-810,5	-761,9	264,7	141,98	48,61
[Zr(DFO-Gly-Gly-Gly-C(O)Me)]	-758,9	10,4	-797,0	-756,2	264,6	139,61	47,42

Le 7^{ème} donneur (l'anion carboxylate) stabilise le complexe (par rapport au Zr(DFO) H2= entre -67,0 et -80,5 kJ.mol^{-1} . C'est une quantité assez importante et bien que les ligands ne soient clairement pas aussi stables que certains des ligands à 8 bases de Lewis, ils constituent certainement une amélioration par rapport à de nombreux autres systèmes qui ont été réalisés.

2.3 Conclusion

Les études DFT des différents ligands vont dans le sens de mes démonstrations. Il semble que les différences que l'on voit dans le sérum résultent probablement de la dégradation des ligands / de la libération d'ions métalliques par un mécanisme différent, ou du moins les différentes stabilités sont de nature cinétique.

3 Bibliographie

1. Chmura, A. J., Davidson, M. G., Frankis, C. J., Jones, M. D. & Lunn, M. D. Highly active and stereoselective zirconium and hafnium alkoxide initiators for solvent-free ring-opening polymerization of rac-lactide. *Chem. Commun.*, **2018**, 0, 1293–1295
2. Sahraei, A., Kargar, H., Hakimi, M. & Tahir, M. N. Synthesis, characterization, crystal structures and biological activities of eight-coordinate zirconium(IV) Schiff base complexes. *Transit Met Chem.*, **2017**, 42, 483–489 (2017).
3. Allott, L. et al. Evaluation of DFO-HOPO as an octadentate chelator for zirconium-89. *Chem. Commun.*, **2017**, 53, 8529–8532
4. Pandya, D. N., Pailloux, S., Tatum, D., Magda, D. & Wadas, T. J. Di-macrocyclic terephthalamide ligands as chelators for the PET radionuclide zirconium-89. *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 2301–2303
5. Guérard, F., Lee, Y.-S. & Brechbiel, M. W. Rational Design, Synthesis, and Evaluation of Tetrahydroxamic Acid Chelators for Stable Complexation of Zirconium(IV). *Chemistry – A European Journal*, **2014**, 20, 5584–5591
6. Boros, E., Holland, J. P., Kenton, N., Rotile, N. & Caravan, P. Macrocyclic-Based Hydroxamate Ligands for Complexation and Immunoconjugation of ⁸⁹Zirconium for Positron Emission Tomography (PET) Imaging. *ChemPlusChem.*, **2016**, 81, 274–281
7. Raavé, R. et al. Direct comparison of the in vitro and in vivo stability of DFO, DFO* and DFOcyclo* for ⁸⁹Zr-immunoPET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **2019**, 46, 1966–1977
8. Friend, M. T. & Wall, N. A. Stability constants for Zirconium(IV) complexes with EDTA, CDTA, and DTPA in perchloric acid solutions. *Inorganica Chimica Acta*, **2019**, 484, 357–367
9. Ma, M. T. et al. Tripodal tris(hydroxypyridinone) ligands for immunoconjugate PET imaging with ⁸⁹Zr⁴⁺: comparison with desferrioxamine-B. *Dalton Trans.*, **2015**, 44, 4884–4900
10. Patra, M. et al. An octadentate bifunctional chelating agent for the development of stable zirconium-89 based molecular imaging probes. *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 11523–11525
11. N.Tinianow, J. et al. Evaluation of a 3-hydroxypyridin-2-one (2,3-HOPO) Based Macrocyclic Chelator for ⁸⁹Zr⁴⁺ and Its Use for ImmunoPET Imaging of HER2 Positive Model of Ovarian Carcinoma in Mice. *Theranostics*, **2016**, 6, 511–521
12. Waterhouse, R. N. Determination of lipophilicity and its use as a predictor of blood–brain barrier penetration of molecular imaging agents. *Molecular Imaging & Biology*, **2003**, 5, 376–389
13. Gaussian16 (Revision A.03), Gaussian Inc. Wallingford CT. Gaussian16 (Revision A.03). **2016**
14. Holland, J. P. Predicting the Thermodynamic Stability of Zirconium Radiotracers. *Inorg. Chem.* **2020**, 59, 2070–2082

Chapitre 5 : Projet ZRpNET

En fin de thèse, j'ai pu prendre part à un projet porté par Prof. Chambron en collaboration avec l'IPHC et le Dr. Imperiale allant de la production cyclotronique de l'isotope Zirconium-89 au diagnostic de tumeurs pancréatiques par tomographie d'émission de positons. Ce projet ZRpNET propose la mise-au-point d'une sonde immunoTEP ciblant l'angiogenèse tumorale pour identifier les patients avec une tumeur neuroendocrine du pancréas susceptibles de subir un traitement. Pour cela, j'ai utilisé un dérivé du DFO obtenu dans un mélange racémique permettant de complexer le Zirconium-89 via l'ajout d'un acide hydroxamique cyclique préorganisé. Ce complexe ImmunoTEP permettra l'évaluation non invasive *in vivo* de l'activité angiogenèse tumorale.

1 Problématiques de ce projet

Ce projet ZRpNET est inclus dans le « Développement de nouvelles approches isotopiques pour améliorer le diagnostic et la thérapie en médecine » du grand axe ISOTOP 2020. Les objectifs de ce grand projet sont :

- la synthèse d'un ligand tétrahydroxamate de Zirconium(+IV) formant un complexe très stable à pH physiologique
- la bioconjugaison de ce ligand au Ramucirumab
- la production de $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{oxalate})_4]^{4-}$ à CYRCé
- le radiomarquage et l'imagerie de petit animal ciblant le VEGFR-2 dans un modèle xénogreffe murine de tumeurs neuroendocrines pancréatiques (pNET)

2 Les tumeurs neuroendocrines du pancréas

2.1 Introduction

Les tumeurs neuroendocrines pancréatiques tirent leur origine de cellules pluripotentes du pancréas exocrine, plus exactement ce sont des néoplasmes très vascularisés. Les pNET

représentent jusqu'à 25% de ce type de tumeur et sa représentation chez l'humain ne fait qu'augmenter chaque année dans le monde¹. Les patients présentent alors des métastases dans le foie et les ganglions lymphatiques au moment du diagnostic des pNETs et leur espérance de vie peut aller jusqu'à maximum 3 ans. Aujourd'hui, la streptozotocine seule ou combinée à la doxorubicine permet d'obtenir une bonne réponse et la prolongation de la période de survie sans progression² mais n'est pas optimal.

2.2 Evaluation de l'angiogenèse tumorale dans les pNETs

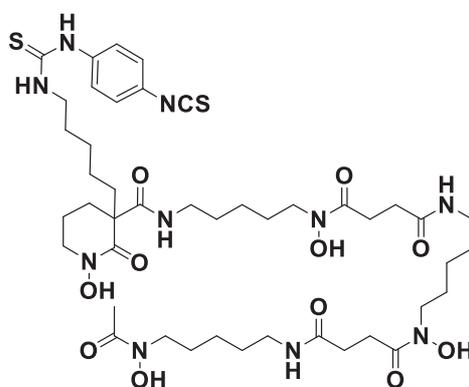
L'angiogenèse joue un rôle important dans le développement des pNETs. Il a été montré que ces pNETs exprimaient les récepteurs du VEGFR-2³. Malgré l'existence de thérapie moléculaire ciblée (le sunitinib, l'inhibiteur tyrosine kinase) ont fait leurs preuves, une progression rapide après régression fut observée chez les patients traités. C'est pourquoi la recherche d'un traitement plus efficace pour les patients en phase préthérapeutique, et une évaluation globale de la réponse thérapeutique pendant le traitement sont nécessaires. L'évaluation globale peut être suivie par TEP et c'est pourquoi l'objectif de ce projet est de radiomarquer le Ramucirumab (anticorps dirigé contre le VEGFR-2) avec du Zirconium-89. Ce vecteur immunoTEP permettrait de cibler spécifiquement l'angiogenèse tumorale dans un modèle murin de pNET.

2.3 La détection des tumeurs endocrines du pancréas

La détection des tumeurs dans un modèle murin se fait à Strasbourg au sein du laboratoire après préparation par mes soins de la sonde immunoTEP. Cette sonde moléculaire radioactive permettra d'obtenir une cartographie *in vivo* de l'augmentation pathologique de l'activité angiogénique avant le traitement, pendant et après. Le ramucirumab (Cyramza®) est un AcM humanisé recombinant dirigé contre VEGFR-2. Son radiomarquage et son injection chez une souris nue porteuse de xénogreffes tumorales évalue l'activité angiogenèse tumorale de manière non invasive. Mais dans un premier temps il est nécessaire de connaître cette sonde et son comportement en milieu physiologique via des études *in vitro*.

3 La bioconjugaison du dérivé du DFO et du Ramucirumab

Cette collaboration récente m'a permis d'entreprendre la bioconjugaison du Ramucirumab avec le ligand par la méthode d'isothiocyanate. Cette méthode nécessite un milieu rigoureusement tamponné à pH 9 et la question du nombre d'équivalents de ligand à mettre en réaction fut posée. En effet, dans leur papier original concernant le DFO*Cyclo-NCS⁴ (**26**, **Figure 82**) ils utilisaient un ratio de ligand anticorps 30 : 1. Cela entraînait notamment la bioconjugaison de 2,3 à 3,7 chélatants/anticorps.



26

Figure 82 DFO*Cyclo-NCS **26**

3.1 La réaction de couplage

Le ramucirumab est à une concentration de 10 mg/mL. Après élimination des excipients par centrifugation, la molécule **26** a été bioconjuguée au ramucirumab, cette fois en utilisant un rapport 6 : 1. Le pH de la solution est ajusté à 9 dans un tampon à 0,1M Na₂CO₃. Après 18h de réaction à 37°C, 800 tr/min, des centrifugations sur filtre 30 kDa sont entreprises pour éliminer l'excédent de **26** via rinçage au PBS. Finalement, le bioconjugué **27** (**Figure 83**) est récupéré dans une solution de PBS pH 7,4.

4 Les études de stabilités de la sonde immunoTEP 27

4.1 Stabilité du ligand dans du plasma murin

30 MBq de Zirconium-89 sont ajoutés dans 500 μ L de tampon HEPES (0,5M, pH 7). Le pH est ajusté à 7,3 avec une solution de Na_2CO_3 1M. Le mélange est incubé à 37°C, l'avancement de la réaction est suivie par radiochromatographie et la chélation complète est observée. Le conjugué radiomarqué est purifié et concentré en utilisant des unités de filtration centrifuge avec un filtre moléculaire de 30 kDa (Amicon Ultra, 0,5 mL, Merck Millipore). L'anticorps radiomarqué est repris dans 350 μ L de tampon PBS pH 7,4. Le conjugué a été quantitativement radiomarqué avec une activité molaire de 22 MBq/nmol. $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}(\mathbf{27})]$ est resté stable 7 jours dans le plasma murin (97%) alors que la quantité intacte de $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}(\text{DFO})@\text{ramucirumab}]$ diminue à environ 85% à J+7 (**Figure 84**).

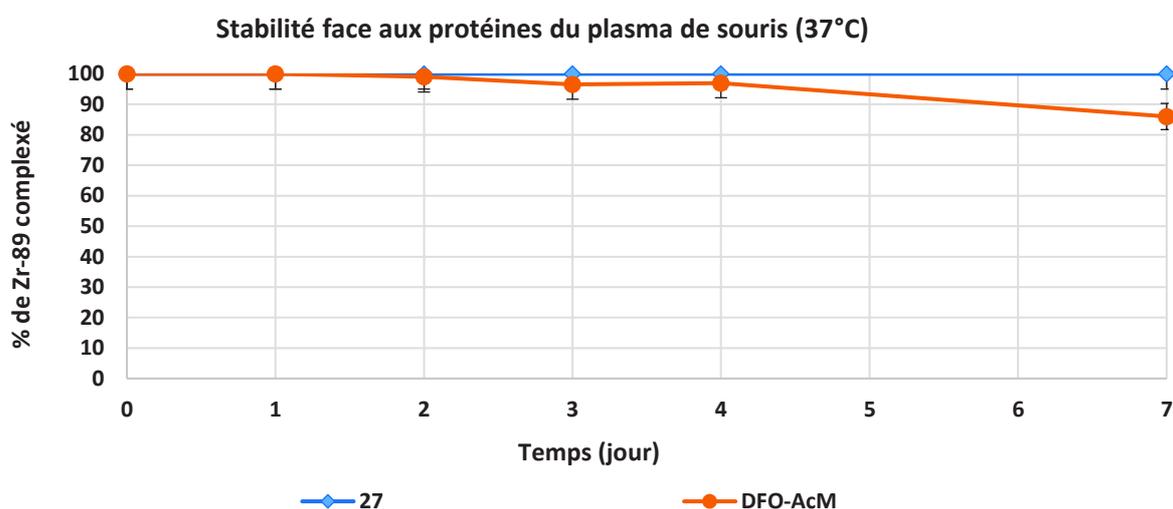


Figure 84 Etude de stabilité de la sonde **27** dans un plasma murin (n=3)

4.2 Stabilité du bioconjugué face à la transchélation

4.2.1 Face à l'EDTA

Au bout de 24h, $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}(\mathbf{27})]$ est encore intègre à 65% en présence d'EDTA alors que $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}(\text{DFO})@\text{ramucirumab}]$ a perdu toute son intégrité au bout du même temps (**Figure 85**).

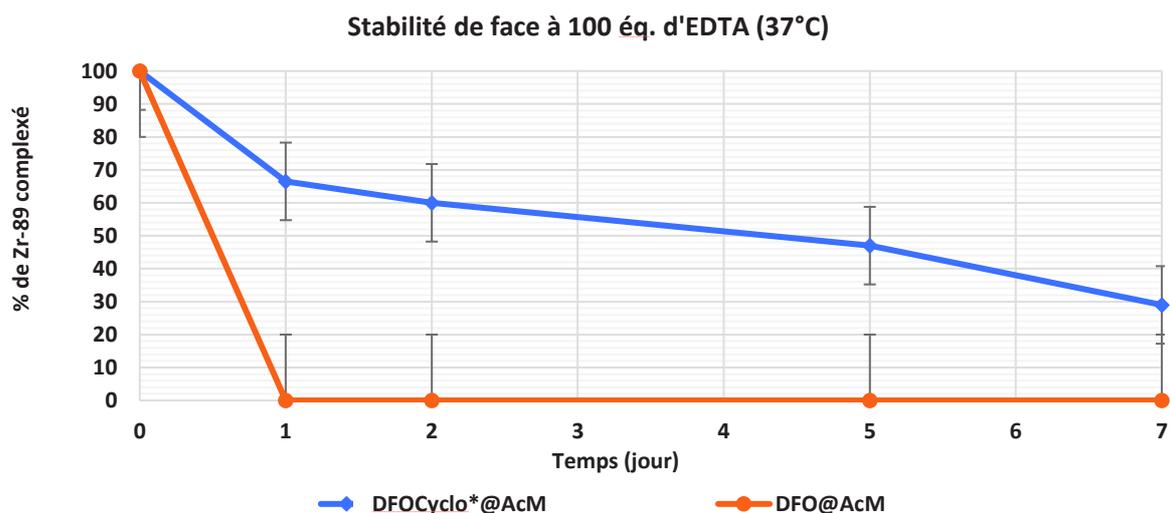


Figure 85 Etude de transchélation de la sonde **27** face à 100 équivalents d'EDTA (n=3)

4.2.2 Face au DFO

Les expériences avec l'EDTA sont devenues une norme pour montrer la résistance d'un nouveau ligand face à la transchélation. Des méthodes concurrentielles de ligand *de novo* face à la Desferioxamine-B doivent être mis en place. Ces méthodes sont généralement utilisées lorsqu'un ligand est conjugué à un anticorps monoclonal puis mis en réaction face au DFO. Par simple purification via une résine PD-10, il est possible d'éluer le DFO ou le complexe $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO})]$ tout en maintenant l'anticorps sur la résine. Une autre méthode consiste à filtrer par centrifugation le milieu réactionnel du $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO})@\text{AcM}]$ pour chasser le $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO})]$ formé. Des études préliminaires au laboratoire démontrent que le DFO conjugué à un anticorps monoclonal peut subir une transchélation d'un DFO exogène à l'anticorps. Après 24h, le Zirconium-89 a été complètement transchélaté en présence de DFO pour les radioimmunoconjugués $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\text{DFO})@\text{ramucirumab}]$. Le $[^{89}\text{Zr}][\text{Zr}(\mathbf{27})]$ est encore intègre à un peu moins de 40% en présence de DFO (**Figure 86**). Toutes ces expériences de stabilité (plasma, DFO et EDTA) ont montré la supériorité du DFO*Cyclo par rapport au DFO.

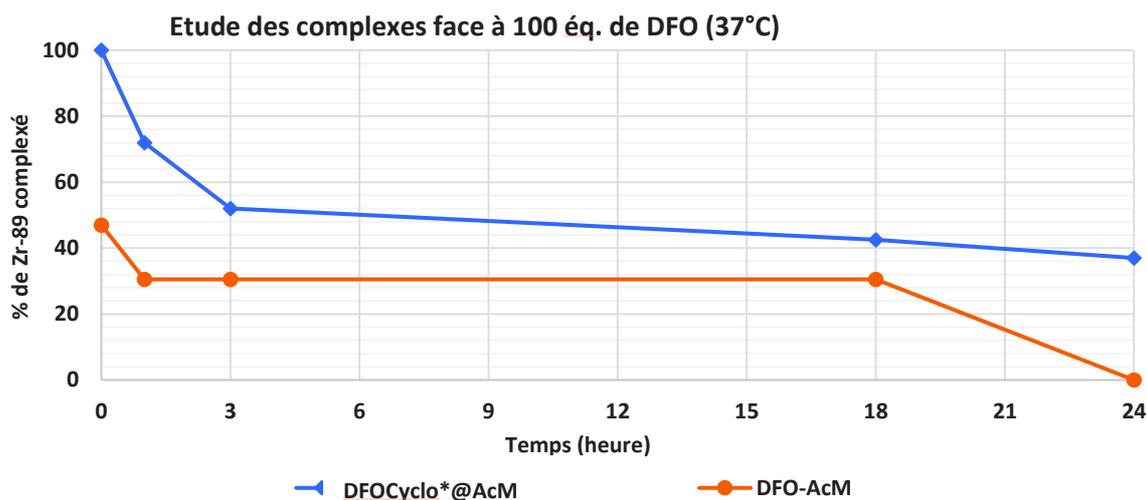


Figure 86 Etude de transchélation de la sonde **27** face à 100 équivalents de DFO (n=1)

5 Imagerie in vivo de **27** dans le modèle murin

3 MBq du radioimmunoconjugué (**27**) dans 150 μ L de PBS pH 7,4 ont été injecté par intraveineuse dans la veine de la queue de la souris. Des expériences préliminaires d'imagerie de souris disponibles d'un hépatocarcinome ont mis en évidence le marquage de la tumeur à J + 5 (**Figure 87**). Ces premières études seront reprises avec des souris portant une tumeur de type pNET et complétées par des études de biodistribution.

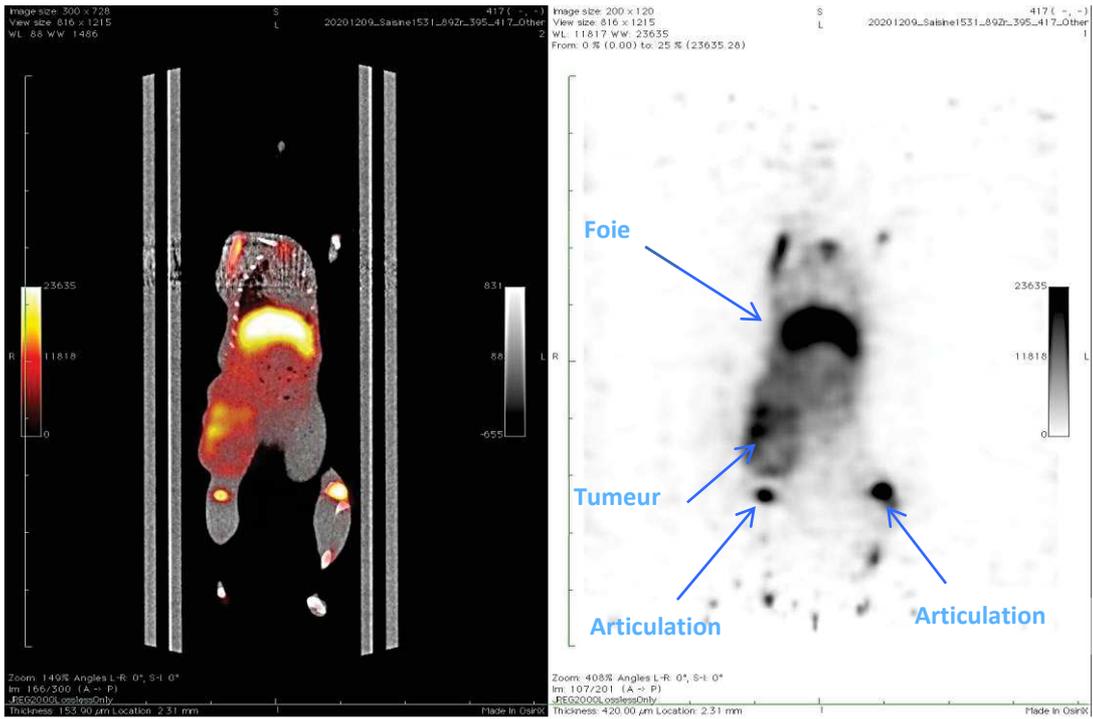


Figure 87 Image TEP d'une souris avec un hépatocarcinome xéno greffé à la cuisse ($n = 1, J + 5$)

6 Bibliographie

1. Lam, K. Y. & Lo, C. Y. Pancreatic endocrine tumour: a 22-year clinico-pathological experience with morphological, immunohistochemical observation and a review of the literature. *Eur. J. of Sur. On.*, **1997**, 23, 36–42
2. Cives, M. et al. The Role of Cytotoxic Chemotherapy in Well-Differentiated Gastroenteropancreatic and Lung Neuroendocrine Tumors. *Curr. Treat. Options in Oncol.*, **2019**, 20, 72
3. Silva, S. R. et al. VEGFR-2 expression in carcinoid cancer cells and its role in tumor growth and metastasis. *Int J Cancer.*, **2011**, 128, 1045–1056
4. Raavé, R. et al. Direct comparison of the *in vitro* and *in vivo* stability of DFO, DFO* and DFOcyclo* for 89Zr-immunoPET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **2019**, 46, 1966–1977

Conclusion générale et perspectives

Dans cette thèse, je présente la production de Zirconium-89 à l'aide d'un cyclotron biomédical et la séparation chimique de ce radiométal d'une cible d'Yttrium-89 pulvérisé sur une pièce de Niobium à l'aide d'un module automatisé. Ce module a dissous le dépôt d'Yttrium dans de l'acide et a ensuite séparé le ^{89}Zr de ^{89}Y en utilisant une colonne de résine d'hydroxamate. Ma méthode a permis de réduire la dose de rayonnement pour le personnel de production, car la séparation a été effectuée à l'intérieur d'une cellule chaude blindée, tandis que le module était contrôlé par un ordinateur portable à l'extérieur. La progression de la séparation est suivie à l'aide de détecteurs de rayonnement dans le module. Le Zirconium-89 peut être produit sous la forme $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}(\text{oxalate})_4]^{4-}$ ou $^{89}\text{Zr}[\text{ZrCl}_4]$. Les analyses effectuées ont montré que la pureté radionucléidique et l'activité spécifique sont comparables voire supérieurs aux résultats publiés dans la littérature. La dégradation du faisceau de protons à une énergie $<13\text{MeV}$ via le dégradeur d'aluminium a réduit considérablement la production de ^{88}Zr à 0.001%. La méthode de pulvérisation d'Yttrium a permis de mieux contrôler la masse d'Yttrium et la section efficace cible de la région. Cela a permis une séparation efficace de Zirconium-89 du matériau cible et un temps de dissolution nettement plus court qui a donné lieu à un produit ayant une activité spécifique élevée.

Le ligand dérivé du DFO **15**, la DFO-Gly-Glu-Gly-NH₂ a montré des propriétés très intéressantes de complexation du Zirconium-89 par rapport au DFO simple. Ces propriétés de complexation rapide, de haute solubilité démontrent que l'utilisation de petit peptide greffé sur la DFO est une voie intéressante pour complexer le Zr(+IV) pour une utilisation en ImmunoTEP.

Les dérivés de la DFO greffée avec un tripeptide composé de deux glycines et d'un acide glutamique ont été synthétisés. Ces ligands ont montré leur aptitude à complexer le Zirconium-89 et se sont révélés supérieurs comparé au DFO. Les dérivés photoactivables de ces composés ont également été synthétisés dans le but de faire un couplage par photochimie et une complexation du Zirconium-89 en une seule étape.

Une de ces molécules va être sélectionnée pour effectuer le radiomarquage prochainement par photochimie sur l'onartuzumab. Une biodistribution sur des souris porteuses de tumeurs MNK-45 (cancer gastrique) sera également entreprise. Les résultats seront présentés lors de la soutenance de thèse.

Partie Expérimentale

All chemicals, unless otherwise noted, were purchased from Sigma-Aldrich, and used as received without further purification.

Ultrapure water produced by a PURELAB Ultra system from ELGA was used throughout (18.2M Ω cm).

NMR spectra were acquired on a Bruker Avance III HD spectrometer operating at 300 MHz and 500 MHz for proton and 126 Hz for carbon. Chemical shifts (δ) are expressed in parts per million (ppm) relative to the resonance of the residual solvent peaks, for example, with DMSO $\delta_H = 2.50$ ppm and $\delta_C = 39.5$ ppm with respect to tetramethylsilane (TMS, δ_H and $\delta_C = 0.00$ ppm). Coupling constants (J) are reported in Hz.

All resonances were assigned by using a combination of 1D and 2D NMR (HSQC, COSY) spectra. Peak multiplicities are abbreviated as follows: s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublets), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), and br (broad).

PET/CT scans were acquired on the IRIS PET from Inviscan (Strasbourg, France)

Column chromatography was performed by using Merck silica gel 60 (63 – 200 μ m) with eluents indicated in the experimental section. Standard thin-layer chromatography (TLC) for synthesis employed Merck TLC plates silica gel 60 on an aluminium base with the indicated solvent system. The spots on TLC were visualised either by UV/visible light (254 nm) or by staining with KMnO₄. The resins for peptide synthesis, coupling reagents, and Fmoc-protected amino acids were obtained from NovaBiochem (Darmstadt, Germany).

Photochemistry

Photochemical conjugation experiments were performed in transparent glass vials at the indicated concentrations. Stock solutions were prepared in H₂O (onartuzumab and DFO-peptide-ArN₃). Photochemical reactions were stirred gently using a magnetic stir bar. Irradiations used three light sources. For pre-conjugation experiments, a high-powered

Rayonet reactor¹ (350 nm, 16 x 8 W Sylvania BLB-lamps, 10 cm diameter) was used. For kinetic studies and for simultaneous one-pot photoradiochemical labelling reactions, portable, high-powered, light-emitting diodes (LEDs at either 365 nm or 395 nm) were used. The LED intensity was adjusted using a UV-LED controller (Opsytec Dr. Gröbel GmbH, Ettlingen, Germany), where 100% corresponded to a power of approximately 263 mW and 355 mW for the 365 nm and 395 nm sources, respectively. LED intensity was measured using a S470C Thermal Power Sensor Head, Volume Absorber, 0.25 - 10.6 μm , 0.1mW - 5W, \varnothing 15 mm. Total irradiance power of the Rayonet reactor was estimated to be approximately 92 mW (approximately 300 mW/cm³). Note that calculation of exact power incident to the reaction is non-trivial because it depends on the specific geometry of the experimental set-up. The temperature of all photochemical conjugation reactions was typically 23 ± 2 °C.

Desferrioxamine B isothiocyanate was obtained from Chematech (Dijon, France) and DFO B mesylate from Sigma-Aldrich.

TLC was carried out on ITLC-SG glass-fiber sheets from PALL Life Sciences (Port Washington, NY, USA), recorded with Gina Star TLC, and analyzed using miniGita software from Raytest (Straubenhardt, Germany)

Synthesis

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (tert-butoxycarbonyl)glycinate (5)

N-BOC-Glycine (3.5 mmol) was dissolved in dry THF (10 mL), N-hydroxysuccinimide (1.51 eq., 5.3 mmol) was added dropwise and stirred at 0°C. A mixture of DCC (1.97 eq., 6.9 mmol) in dry THF (10 mL) was added and the resulting solution was left 10h at room temperature under argon. Glacial acetic acid (3 drops) was added to quench DCC for 1h. The DCU was filtered and the solid was washed with THF (5 mL). The filtrate was concentrated in vacuo to give a white solid. The crude was suspended in 2-propanol (15 mL) for 1h and the resulting solid was collected by filtration. The resulting product was used directly for the next step.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.40 (s, 9H), 2.78 (s, 4H), 4.22 (m, 2H)

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): 25.67, 28.40, 40.44, 80.72, 155.18, 166.26, 168.66

ESI-MS m/z calc. (C₁₁H₁₆N₂NaO₆) 295.091 found 295.09

(R)-5-(benzyloxy)-2-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)acetamido)-5-oxopentanoic acid (6)

A solution of NHBOC-Glu(OBn)-OH (2.38 g, 6.03 mmol, 1 eq.) and glycine methyl ester hydrochloride (453 mg, 6.03 mmol, 1 eq.) in a DMF/Acetonitrile mixture (1:4, 20 mL) was stirred at 0°C. EDC-HCl (234 mg, 6.03 mmol, 1 eq.), HOBt.xH₂O (1.07 g, 6.03 mmol, 1.1 eq.) and diisopropylamine (1.82 mL, 13.22 mmol, 2.2 eq.) was added at 0°C then the mixture was left at room temperature for 18h. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate (100 mL) and the organic layer was washed with 1M HCl solution (3 x 100 mL), 0.5M NaHCO₃ solution (4 x 100 mL) and then brine (100 mL). The upper layer was dried over Na₂SO₄ and dried with rotavap (max temperature 40°C) to obtain a colorless oil (1.8 g, 70% yield).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.43 (s, 9H), 1.96 (m, 1H), 2.16 (m, 1H), 2.53 (m, 2H), 3.74 (s, 3H), 4.02 (t, J = 6.0Hz, 2H), 4.23 (d, J = 6.0Hz, 1H), 5.13 (s, 2H), 7.35 (m, 5H)

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): 28.45, 30.57, 32.07, 41.28, 52.47, 53.32, 66.84, 128.41, 128.45, 128.74, 139.98, 162.60, 170.72

HR-ESI-MS m/z calc. (C₂₀H₂₈N₂NaO₇) 431.1789 found 431.1793

(R)-2-(2-aminoacetamido)-5-(benzyloxy)-5-oxopentanoic acid

The N-BOC-Dipeptide-methyl ester (230 mg) was diluted in a TFA/DCM solution (1:2, 3 mL) and left at room temperature for 1h. The mixture was co evaporated with cyclohexane and left under high vacuum for 3h to give a white salt which was used for next step without further purification.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 3.07 (d, 2H, J = 5.8Hz), 3.64 (s, 3H), 3.94 (m, 2H), 4.59 (m, 1H), 5.11 (m, 2H), 7.30 (m, 5H)

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): 34.83, 41.32, 49.91, 52.58, 67.75, 124.44, 128.70, 128.76, 134.95, 168.50, 170.09

HR-ESI-MS m/z calc. (C₁₅H₂₁N₂O₅) 309.1445 found 309.1454

(S)-(5-(benzyloxy)-2-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)acetamido)-5-oxopentanoyl)glycine (1)

A solution of TFA salt of Glu(OBn)-Gly-OMe dipeptide (400 mg, 1.79 mmol, 1 eq.) and N-BOC-glycine (345 mg, 1.97 mmol, 1.1 eq.) in a DMF/Acetonitrile mixture (1:4, 25 mL) was stirred at 0°C. EDC-HCl (412.2 mg, 2.15 mmol, 1.2 eq.), HOBt.xH₂O (345.9 mg, 2.15 mmol, 1.2 eq.) and diisopropylamine (975 µL, 5.73 mmol, 2.2 eq.) was added at 0°C then the mixture was left at

room temperature for 18h. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate (100 mL) and the organic layer was washed with 1M HCl solution (3 x 100 mL), 0.5M NaHCO₃ solution (4 x 100 mL) and then brine (100 mL). The upper layer was dried over Na₂SO₄ and dried with rotavap (max temperature 40°C) to obtain a colorless oil (418 mg, 46% yield).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.43 (s, 9H), 2.72 (m, 1H), 3.09 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.77 (m, 2H), 4.90 (m, 1H), 5.12 (m, 2H), 7.34 (m, 5H)

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): 28.41, 35.54, 41.44, 44.81, 49.11, 52.45, 67.11, 128.48, 128.57, 128.75, 135.53, 156.48, 169.56, 170.56

HR-ESI-MS m/z calc. (C₂₁H₂₉N₃NaO₈) 474.185 found 474.1852

DFO-Gly-Glu(OBn)-Gly-NHBoc (13)

A solution of NHBoc-Gly-Glu(OBn)-Gly-OH **1** (218 mg, 0.41 mmol), HBTU (193 mg, 0.44 mmol) and N,N'-diisopropylethylamine (290 μL) in dry DMF (3.5 mL) was stirred at 20°C for 1h. The mesylate DFO salt was added and immediately N,N'-diisopropylethylamine (200 μL) in dry DMF (1 mL) was added dropwise. The mixture was left at room temperature for 72h. The resulting mixture was concentrated in vacuo and the resulting solid was treated with cold acetone (5 x 5 mL, -10/15 °C) and cold water (5 x 5 mL). The resulting grey solid was used for next step without purification (24% yield)

ESI-MS m/z calc. (C₂₁H₃₀N₃O₈) 452.203 found 452.20

DFO-Gly-Glu(OBn)-Gly-NH₂ (14)

The NHBoc-Gly-Glu(OBn)-Gly-DFO **13** (50 mg, 5.44 μmol) was treated with TFA (950 μmol), TIS (25 μL) and water (25 μL). The mixture was left 2h and triturated with ethyl ether and concentrated in high vacuum to leave the corresponding TFA salt as an orange/white solid. The corresponding tripeptide-DFO was purified by semi-prep C-18 with 90/10: A/B in 5 min and 30/70 : A/B in 20 min at 20mL/min (A: H₂O.TFA 1%; B: acetonitrile). After lyophilization, a white solid corresponding of the TFA salt of the tripeptide-DFO (12% yield)

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ = 1.29 (m, 6H), 1.52 (m, 6H), 1.62 (m, 5H), 1.69 (m, 2H), 2.05 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.19 (m, 1H), 2.49 (m, 3H), 2.57 (m, 2H), 2.65 (m, 1H), 2.79 (m, 3H), 3.16 (m, 7H), 3.84 (s, 1H), 4.42 (m, 1H), 5.18 (s, 2H), 7.45 (m, 5H)

^{13}C NMR (400 MHz, D_2O): 19.21, 23.08, 25.42, 26.10, 27.62, 29.96, 30.42, 39.16, 40.31, 42.56, 47.66, 47.84, 53.09, 67.20, 135.39, 165.94, 167.43, 170.98, 171.21, 173.39, 173.57, 173.81, 174.57, 174.80

ESI-MS m/z calc. ($\text{C}_{41}\text{H}_{68}\text{N}_9\text{O}_{13}$) 894.49 found 894.49

DFO-Gly-Glu(OH)-Gly-NH₂ (15)

The TFA salt tripeptide Gly-Glu(OBn)-Gly-DFO **14** (1 mg, 1.11 μmol , 1 eq.) in methanol (1 mL) was sonicated for 10 min. Then Pd/C (0.25 mg, 2.35 μmol , 2.1 eq.) was added and the resulting mixture was maintained under H_2 for 4 hours. After completion, the mixture was filtered (porosity 4) at atmospheric pressure and the filter is washed with methanol. The total volume of methanol was evaporated under reduced pressure and the resulting oil was washed with acetonitrile, sonic, centrifuged to recover the corresponding salt.

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ = 1.21 (m, 6H), 1.44(m, 6H), 1.55 (m, 5H), 1.62 (m, 2H), 2.05 (s, 3H), 2.22 (m, 2H), 2.41 (m, 4H), 2.72 (m, 3H), 3.10 (m, 7H), 3.53 (m, 5H), 3.80 (m, 3H), 4.30 (m, 1H)

^{13}C NMR (400 MHz, D_2O): 19.21, 23.08, 25.42, 26.10, 27.62, 29.96, 30.42, 39.16, 40.31, 42.56, 47.66, 47.84, 53.09, 135.39, 165.94, 167.43, 170.98, 171.21

ESI-MS m/z calc. ($\text{C}_{34}\text{H}_{62}\text{N}_9\text{O}_{13}$) 804.45 found 804.45

Complexation of deprotected 15 with cold Zr

Modified procedure reported by Patra *et al.*, a solution of ZrCl_4 (0.33 mg, 0.41 μmol , 1.16 eq.) in 0.1 M HCl (125 μL) was added to a stirred solution of ligand deprotected DFO-Tripeptide, (1 mg, 1.41 μmol , 2.78 eq.) in 0.1 M HCl (125 μL). The pH of the solution was adjusted to 7.5 by slow addition of 0.1 M K_2CO_3 and stirred at RT overnight. The mixture was dried under very high vacuum to give a white powder. The product was confirmed with HR-MS also confirming complex formation.

ESI-HR-MS m/z calc. ($\text{C}_{34}\text{H}_{57}\text{KN}_9\text{O}_{13}\text{Zr}$) 928.275 found 928.2754

benzyl (S)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-4-((2-methoxy-2-oxoethyl)amino)-4-oxobutanoate (9)

A solution of N-BOC-Asp(OBn)-OH (396 mg, 1.22 mmol, 1 eq.) and glycine methyl ester hydrochloride (153 mg, 1.22 mmol, 1 eq.) in a DMF/Acetonitrile mixture (1:4, 20 mL) was stirred at 0°C . EDC-HCl (234 mg, 1.22 mmol, 1 eq.), HOBT.xH₂O (191 mg, 1.34 mmol, 1.1 eq.)

and diisopropylamine (460 μ L, 2.68 mmol, 2.2 eq.) was added at 0°C then the mixture was left at room temperature for 18h. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate (100mL) and the organic layer was washed with 1M HCl solution (3 x 100 mL), 0.5M NaHCO₃ solution (4 x 100 mL) and then brine (100 mL). The upper layer was dried over Na₂SO₄ and dried with rotavap (max temperature 40°C) to obtain a colorless oil (232 mg, 48% yield).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.46 (s, 9H), 2.73 (m, 1H), 3.07 (m, 1H), 3.74 (s, 3H), 4.01 (d, 2H, J = 5Hz), 4.58 (s, 1H), 5.13 (m, 2H), 7.34 (m, 5H)

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): 28.9, 36.29, 41.58, 50.61, 52.68, 67.06, 128.51, 128.62, 128.83, 135.50, 169.93, 171.07

HR-ESI-MS m/z calc. (C₁₉H₂₆N₂NaO₇) 417.164 found 417.1632

(S)-(4-(benzyloxy)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-4-oxobutanoyl)glycine

At 0°C, the NHBOC-Gly-Asp(OBn)-Gly-OMe (400 mg, 0.89 mmol, 1 eq.) was stirred in THF (12 mL). To this solution, a mixture of LiOH.H₂O (56 mg, 1.33 mmol, 1.5 eq.) in water (12 mL) was added slowly and kept cold for 1h. After disappearance of starting material, the mixture was acidified to pH 3.5 and mixture was extracted with ethyl acetate to give an off-white product (144 mg, 45% yield)

NHBOC-Gly-Asp(OBn)-Gly-OH (2)

NHBOC-Gly-Asp(OBn)-OH (2.38 g, 6.03 mmol) was dissolved in dry THF (10 mL), N-hydroxysuccinimide (833 mg, 7.24 mmol, 1.2 eq) was added dropwise and stirred at 0°C. A mixture of DCC (1.27 g, 6.63 mmol, 1.1 eq.) in dry THF (10 mL) was added and the resulting solution was left 10h at room temperature under argon. Glacial acetic acid (3 drops) was added to quench DCC for 1h. The DCU was filtered and the solid was washed with THF (5 mL). The filtrate was concentrated in vacuo to give a white solid. The crude was suspended in 2-propanol (15 mL) for 1h and the resulting solid was collected by filtration. The resulting product was used directly for the next step.

Simultaneously, in another rounded bottom flask, glycine (453 mg, 6.03 mmol, 1 eq.) and NaHCO₃ (1.72 g, 20.5 mmol, 3.4 eq.) were stirred in water (10 mL). The succinate intermediate crystallized was dissolved in acetone (10mL) and added to the aqueous solution over 15 min and stirred for 1h. After evaporation of acetone under vacuum (max temperature was set at 30°C, the aqueous mixture was extracted with diethyl ether (20 mL). The remaining aqueous

solution was then acidified at pH 2-3 with HCl 1M. Then the acidic aqueous solution was extracted with diethyl ether (3 x 20 mL) and all the combined organic phase was washed with brine and dye under high vacuum at RT to leave a white foam (626 mg, 23% yield)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 1.37 (s, 9H), 2.50 (m, 2H), 3.32 (m, 2H), 3.84 (m, 2H), 4.36 (m, 1H), 5.17 (m, 2H), 7.35 (m, 5H)

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): 28.40, 34.50, 35.94, 43.1, 53.8, 66.6, 79.76, 127-129, 155.99, 177.65

ESI-MS m/z calc. ($\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_8$) 452.203 found 452.20

(S)-4-(benzyloxy)-2-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)acetamido)-4-oxobutanoic acid (7)

A solution of TFA salt of Asp(OBn)-Gly-OMe dipeptide (400 mg, 1.79 mmol, 1 eq.) and N-BOC-glycine (345 mg, 1.97 mmol, 1.1 eq.) in a DMF/Acetonitrile mixture (1:4, 25 mL) was stirred at 0°C. EDC-HCl (412 mg, 2.15 mmol, 1.2 eq.), HOBt.xH₂O (346 mg, 2.15 mmol, 1.2 eq.) and diisopropylamine (975 μL , 5.73 mmol, 3.2 eq.) was added at 0°C then the mixture was left at room temperature for 18h. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate (100mL) and the organic layer was washed with 1M HCl solution (3 x 100 mL), 0.5M NaHCO_3 solution (4 x 100 mL) and then brine (100 mL). The upper layer was dried over Na_2SO_4 and dried with rotavap (max temperature 40°C) to obtain a colorless oil (420 mg, 52% yield).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 1.43 (s, 9H), 1.61 (m, 2H), 2.04 (m, 1H), 2.19 (m, 1H), 2.49 (m, 1H), 2.62 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.99 (m, 2H), 4.56 (m, 1H), 5.15 (m, 2H), 7.35 (m, 5H)

^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3): 28.41, 30.46, 30.59, 30.71, 41.27, 52.50, 66.83, 128.41, 128.45, 128.74, 135.85, 157.76, 171.28

HR-ESI-MS m/z calc. ($\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{NaO}_8$) 488.2003 found 488.2004

Loading and incorporation of the coupling system to produce AA₃-AA₂-AA₁ system

In a plastic syringe equipped with Teflon filters, the 2-chlorotriethylchloride resin (100-200 mesh, 1.71 mmol/g) was inflated in CH_2Cl_2 (3 x 1 min). The first Fmoc protected amino acid (Fmoc-AA₁-OH, 2 eq.) was solubilized in CH_2Cl_2 with DIPEA (3 eq.) then the mixture was incorporated in the syringe as a coupling system. The syringe was shaken for 10 min and 7 eq. of DIPEA was added and the shaking was continued for 45 min. 0.5 mL of methanol was added to cap unreacted functional groups on the resin and the resulting mixture was shaken for 10 min. The resin was filtrered and washed with CH_2Cl_2 (x3), DMF (x3) and CH_2Cl_2 (x3). The loading

capacity was estimated with a small amount of resin. A Fmoc deprotection was done and the quantity of Fmoc group was estimated by absorbance titration.

Elongation of the peptide chain on resin cycle

The Fmoc-amino-acid-2-chlorotritylchloride resin was shaken with a solution of 20% of piperidine in DMF for 10 min. The resin was washed then refilled with 20% piperidine in DMF and shaken for 5 min, then another 5 minutes to deprotect the N-terminus. The resin was then washed with CH₂Cl₂ (x3) DMF (x3) and CH₂Cl₂ (x3) and dried. The syringe was loaded with Fmoc-AA_n-OH (3 eq.) and HBTU (2.9 eq.), a solution of DIPEA (6 eq.) in DMF was added to the resin. The resulting mixture was stirred for 90 min. After completion, the resin was washed with DMF (x3) and CH₂Cl₂ (x3). Deprotection of Fmoc was made as described and the coupling cycles were repeated with the appropriate amino acids to provide a tripeptide.

N₃-Ar-(PEG)₃-OH coupling on the resin

HBTU was loaded in the syringe and diluted with an N₃-Ar-(PEG)₃-OH (1.44 éq.) and DIPEA (6 éq.) solution in DMF (5 mL). The syringe was shaken for 90 min. After completion, the cleavage of the resin was operated with a 1% TFA solution in CH₂Cl₂ by shaking for 3 minutes at room temperature followed by filtration. The treatment was repeated as many times as the resin was colored and then the resin was washed with CH₂Cl₂ (x5). Solvents were evaporated in vacuum to obtain the crude N₃-Ar-(PEG)₃-AA₃-AA₂-AA₁-OH. N₃-Ar-(PEG)₃-AA₃-AA₂-AA₁-OH was purified by flash chromatography on C-18 using MeOH (0.1% TFA)/H₂O (0.1% TFA) with the gradient 0% to 100% MeOH (0.1% TFA).

(17) Glu(O^tBu) = AA₁, 28% yield

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.92 – 7.79 (m, 2H), 7.19 – 7.05 (m, 2H), 4.45 (dd, *J* = 9.2, 4.9 Hz, 1H), 3.92 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.68 – 3.50 (m, 10H), 3.47 (td, *J* = 6.5, 2.1 Hz, 4H), 3.23 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.62 – 2.44 (m, 4H), 2.42 – 2.28 (m, 2H), 2.16 (dtd, *J* = 16.0, 7.5, 5.1 Hz, 1H), 2.01 – 1.80 (m, 3H), 1.72 (p, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 175.83, 174.47, 173.64, 172.39, 171.63, 168.85, 144.64, 132.18, 130.12, 119.94, 81.65, 71.42, 71.12, 70.16, 69.80, 52.83, 44.07, 43.31, 38.68, 37.80, 32.49, 32.04, 31.88, 30.31, 28.34, 27.84.

(18) Glu(O^tBu) = AA₂, 52% yield

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.43 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.19 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 8.13 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.92 – 7.81 (m, 3H), 7.20 – 7.12 (m, 2H), 4.29 (td, *J* = 8.4, 5.1 Hz,

1H), 3.82 – 3.64 (m, 4H), 3.55 – 3.40 (m, 10H), 3.36 (t, $J = 6.4$ Hz, 3H), 3.30 (q, $J = 6.6$ Hz, 3H), 3.06 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.34 (s, 4H), 2.28 – 2.17 (m, 2H), 1.93 (qd, $J = 8.2, 3.3$ Hz, 1H), 1.74 (p, $J = 6.4$ Hz, 3H), 1.60 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.37 (s, 9H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 172.52, 171.90, 171.64, 171.17, 169.30, 165.41, 142.28, 131.31, 79.74, 69.93, 69.70, 68.45, 68.21, 42.42, 40.78, 36.89, 35.99, 31.29, 30.85, 29.45, 27.29

(19) Glu(O^tBu) = AA₃, 53% yield

^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.92 – 7.79 (m, 2H), 7.18 – 7.06 (m, 2H), 4.30 (dd, $J = 9.0, 5.2$ Hz, 1H), 4.02 – 3.85 (m, 4H), 3.68 – 3.50 (m, 10H), 3.47 (t, $J = 6.1$ Hz, 4H), 3.22 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.64 – 2.43 (m, 4H), 2.44 – 2.29 (m, 2H), 2.21 – 2.07 (m, 1H), 1.89 (dp, $J = 12.9, 6.4$ Hz, 3H), 1.71 (p, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.43 (s, 9H).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 175.64, 174.36, 173.72, 172.57, 171.97, 168.83, 144.62, 132.14, 130.11, 119.93, 81.66, 71.39, 71.09, 70.14, 69.79, 54.66, 43.51, 41.76, 38.68, 37.82, 32.59, 31.90, 30.27, 28.32, 27.55

N₃-Ar-(PEG)₃- AA_n-AA_n-AA_n-DFO general procedure

The N₃-Ar-(PEG)₃- AA₃-AA₂-AA₁-OH was solubilized in DMF and HATU (1.5 eq.) and DIPEA (4 eq.) was added. The mixture was stirred for 40 minutes and then DFO (1.2 eq.) was added. The resulting solution was left for 16h at room temperature. After completion of the reaction, the mixture was dried in vacuo and purified by flash chromatography with C-18 column using MeOH (0.1% TFA) / H₂O (0.1% TFA) with the gradient 0% to 100% MeOH (0.1% TFA) to give a white solid for AA₂ = AA₃ = Glu(O^tBu) and a yellow oil for AA₁ = Glu(O^tBu).

(20) Glu(O^tBu) = AA₁, 80% yield

^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.92 – 7.79 (m, 2H), 7.13 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.45 (dd, $J = 9.2, 5.0$ Hz, 1H), 3.92 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.68 – 3.51 (m, 10H), 3.47 (td, $J = 6.5, 2.1$ Hz, 4H), 3.23 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.60 – 2.45 (m, 4H), 2.40 – 2.28 (m, 2H), 2.16 (dtd, $J = 15.9, 7.5, 5.0$ Hz, 1H), 2.00 – 1.80 (m, 3H), 1.72 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.43 (s, 9H).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 175.83, 174.48, 174.46, 173.64, 172.39, 171.59, 168.85, 144.64, 132.16, 130.12, 119.94, 81.65, 71.42, 71.17, 71.08, 70.16, 69.80, 52.78, 44.07, 43.31, 38.68, 37.80, 32.49, 32.04, 31.88, 30.35, 30.28, 28.34, 27.84.

(21) Glu(O^tBu) = AA₂, 53% yield

^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 9.71 – 9.40 (m, 2H), 8.37 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 8.20 – 7.92 (m, 2H), 7.79 (dd, $J = 14.5, 7.1$ Hz, 2H), 7.70 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 7.56 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 7.11 (d, $J = 8.1$ Hz,

2H), 4.24 – 4.01 (m, 1H), 3.88 – 3.16 (m, 20H), 3.16 – 2.79 (m, 6H), 2.50 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.39 – 2.05 (m, 7H), 1.89 (s, 3H), 1.69 (dt, $J = 13.5, 7.1$ Hz, 2H), 1.52 (p, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.48 – 1.37 (m, 3H), 1.31 (s, 9H), 1.14 (q, $J = 7.9$ Hz, 4H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 172.27, 171.97, 171.70, 171.41, 171.30, 170.11, 169.55, 168.31, 165.18, 142.11, 131.18, 129.03, 118.85, 79.67, 69.78, 69.55, 68.28, 68.05, 52.22, 46.94, 42.23, 42.04, 38.44, 36.70, 35.81, 31.18, 30.68, 29.90, 29.33, 28.77, 27.75, 27.58, 26.80, 26.03, 23.48, 20.35.

(22) Glu(O^tBu) = AA₃, 66% yield

^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.44 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 8.22 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 8.13 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.00 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.90 – 7.87 (m, 2H), 7.83 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.77 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 7.67 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.24 – 7.12 (m, 2H), 4.19 (td, $J = 8.1, 5.3$ Hz, 2H), 3.77 – 3.60 (m, 3H), 3.57 – 3.41 (m, 13H), 3.37 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.30 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.10 – 2.95 (m, 6H), 2.57 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.43 – 2.17 (m, 8H), 1.96 (s, 3H), 1.74 (p, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.59 (p, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.50 (q, $J = 7.6$ Hz, 4H), 1.38 (s, 12H), 1.30 – 1.11 (m, 5H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 172.13, 171.99, 171.95, 171.75, 171.61, 171.40, 171.34, 170.17, 169.32, 169.04, 168.40, 165.21, 162.33, 142.13, 131.19, 129.05, 118.86, 79.65, 69.81, 69.78, 69.59, 69.54, 68.29, 68.07, 52.11, 47.10, 46.80, 38.48, 38.44, 36.72, 35.83, 35.80, 31.29, 30.70, 30.66, 29.92, 29.37, 29.33, 28.83, 28.77, 27.76, 27.59, 26.89, 26.05, 23.52, 23.48, 20.36.

N₃-Ar-(PEG)₃-AA_n-AA_n-AA_n-DFO deprotection

A solution of 1mL TFA in water was added to N₃-Ar-(PEG)₃-AA_n-AA_n-AA_n-DFO and 1 mL of MeOH was added to solubilize the mixture. After 4h of stirring, the resulting mixture was precipitate in the freezer for 24 hours in ether, then dialysis and lyophilization. The white solid for AA₁=AA₂=AA₃= Glutamic acid

(23) Glu = AA₁, 86% yield

^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 9.70 – 9.57 (m, 2H), 8.45 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 8.26 (q, $J = 4.5$ Hz, 1H), 8.16 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.93 – 7.82 (m, 3H), 7.82 – 7.74 (m, 2H), 7.19 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 4.19 (td, $J = 8.5, 5.0$ Hz, 1H), 3.75 – 3.64 (m, 3H), 3.56 – 3.25 (m, 26H), 3.16 – 2.91 (m, 7H), 2.57 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.41 – 2.14 (m, 8H), 1.96 (s, 3H), 1.74 (p, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.59 (p, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.49 (p, $J = 7.3$ Hz, 3H), 1.38 (h, $J = 7.2$ Hz, 4H), 1.33 – 1.11 (m, 5H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 173.89, 172.36, 171.97, 171.40, 171.32, 170.70, 170.14, 169.69, 168.74, 165.20, 142.12, 131.18, 129.04, 118.86, 72.50, 69.79, 69.76, 69.57, 69.52, 68.28,

68.04, 63.09, 51.94, 50.20, 47.09, 46.79, 42.36, 42.14, 38.48, 38.43, 36.70, 35.81, 30.69, 30.59, 30.14, 29.91, 29.35, 29.31, 28.82, 28.67, 27.58, 26.03, 23.51, 23.43, 20.36.

(24) Glu = AA₂, 89% yield

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 9.80 – 9.60 (m, 2H), 8.46 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.21 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 8.09 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.3 Hz, 3H), 7.79 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 7.64 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.24 – 4.13 (m, 1H), 3.75 – 3.59 (m, 4H), 3.57 – 3.25 (m, 27H), 3.12 – 2.96 (m, 6H), 2.57 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 2.39 – 2.20 (m, 8H), 1.96 (s, 3H), 1.76 (dp, *J* = 13.4, 6.9 Hz, 3H), 1.59 (p, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.49 (p, *J* = 7.5 Hz, 3H), 1.38 (h, *J* = 7.0 Hz, 4H), 1.21 (q, *J* = 7.6 Hz, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 173.99, 172.33, 171.99, 171.48, 171.44, 171.41, 171.37, 170.16, 170.14, 169.62, 168.38, 165.23, 142.15, 131.21, 129.07, 118.88, 69.81, 69.78, 69.59, 69.54, 68.30, 68.07, 52.38, 51.72, 47.11, 46.81, 42.29, 42.06, 36.73, 35.84, 30.77, 30.64, 30.10, 29.96, 29.37, 29.32, 28.84, 28.74, 27.62, 26.77, 26.06, 23.53, 23.48, 20.38.

(25) Glu = AA₃, 87% yield

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 9.73 – 9.54 (m, 2H), 8.44 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.22 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.13 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.02 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.83 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.77 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 7.68 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.19 (td, *J* = 8.1, 5.3 Hz, 1H), 3.75 – 3.60 (m, 4H), 3.57 – 3.42 (m, 15H), 3.37 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H), 3.30 (q, *J* = 6.6 Hz, 3H), 3.14 – 2.95 (m, 7H), 2.57 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H), 2.45 – 2.21 (m, 9H), 1.96 (s, 3H), 1.74 (p, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.59 (p, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.49 (h, *J* = 6.3 Hz, 4H), 1.39 (h, *J* = 7.8 Hz, 5H), 1.21 (q, *J* = 7.7 Hz, 5H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 173.99, 172.11, 172.08, 171.98, 171.66, 171.38, 171.31, 170.14, 169.04, 168.40, 165.19, 142.12, 131.18, 129.04, 118.86, 69.79, 69.76, 69.57, 69.53, 68.27, 68.05, 52.19, 47.09, 46.79, 42.28, 42.02, 38.47, 38.43, 36.70, 35.81, 30.70, 30.66, 30.10, 29.91, 29.35, 29.32, 28.82, 28.76, 27.58, 26.85, 26.03, 23.50, 23.47, 20.36.

In vitro studies

⁸⁹Zr radiolabeling of chelates

[⁸⁹Zr][Zr(oxalate)₄]⁴⁻ solution was neutralized with Na₂CO₃ 1 M to pH = 7.4. To 100 μL PBS (pH 7.4) was added N₃-Ar-(PEG)₃- tripeptide-DFO (2.5 μL of a 1 mM) in a water /DMSO solution (95/5). To this solution was added 5 MBq of [⁸⁹Zr][Zr(oxalate)₄]⁴⁻ adjusted to pH 7.4 with 1 M Na₂CO₃. The mixture was incubated at room temperature for 30 min. The progress of the reaction was then assayed using radioTLC, and complete chelation was observed.

Stability Assay

The stability of both N₃-Ar-(PEG)₃- tripeptides-DFO and N₃-Ar-(PEG)₃- DFO was assessed in plasma by adding 5 MBq of radiolabeled chelate to 100 μL of mouse plasma.

The mixtures were incubated at 37 °C. Aliquots were analyzed by radioTLC after 24, 48, 72, 96 and 168 h. All samples were prepared in triplicate.

Transchelation Studies Using EDTA

The stability of N₃-Ar-(PEG)₃- tripeptides-DFO and N₃-Ar-(PEG)₃- DFO was assessed in the presence of EDTA by adding 100 equivalents of EDTA (pH 7.4) to 5 MBq of radiolabeled chelate diluted to 100 μL with PBS. The mixtures were incubated at 37 °C.

Aliquots were analyzed by radioTLC after 24, 48, 72, 96 and 168 h to determine the percentage of the intact ⁸⁹Zr-ligand complex. All the studies were done in triplicate.

Transmetalation Studies

The stability of N₃-Ar-(PEG)₃- tripeptides-DFO and N₃-Ar-(PEG)₃- DFO was assessed in the presence of FeCl₃ by adding 100 equivalents of FeCl₃ (1 mM solution) to 5 MBq of radiolabeled chelate diluted to 100 μL with PBS. The mixtures were incubated at 37 °C. Aliquots were analyzed by radioTLC after 24, 48, 72, 96 and 168 h to determine the percentage of the intact ⁸⁹Zr-ligand complex. All the studies were done in triplicate.

Florian Moulin

Développement du Zirconium-89 pour le radiomarquage d'anticorps monoclonaux pour la tomographie par émission de positons.

La production et la demande en Zirconium-89 (temps de demi-vie 78h, $E_{\text{moy. } \beta^+} = 395 \text{ keV}$) ne cesse de croître grâce à sa compatibilité avec l'imagerie d'anticorps par tomographie par émission de positons (TEP). Via le cyclotron strasbourgeois CYRCé, nous proposons un système automatisé de production efficace de l'isotope du Zirconium avec une grande pureté radionucléique et une haute activité spécifique. Pour cela, une pièce de Niobium sur lequel a été pulvérisé d'Yttrium naturel et a été bombardé par un faisceau de proton. Les rendements de productions et la séparation chimique du métal désiré ont été comparé avec d'autres méthodes de production.

Pour l'immunoTEP, le chélateur le plus utilisé pour radiomarquer des anticorps au Zirconium-89 est la Desferrioxamine B (ou DFO). Ce ligand présente une stabilité *in vivo* limitée. Ce problème de démétallation du ligand entraîne une accumulation de la radioactivité au niveau des os. Nous proposons une synthèse d'un dérivé du DFO couplé à un tripeptide. Ce complexe heptadentate bifonctionnel présente une amine libre en bout de chaîne permettant sa conjugaison à un anticorps monoclonal. Des études de stabilités et de comparaison *in vitro* ont été entreprises

Mots- clefs ^{89}Zr , immunoTEP, DFO, anticorps monoclonal, cyclotron

The production and demand for Zirconium-89 (half-life time 78h, $E_{\text{moy. } \beta^+} = 395 \text{ keV}$) continues to grow due to its compatibility with antibody imaging by positron emission tomography (PET). Via the Strasbourg cyclotron CYRCé, we offer an automated system for efficient production of the Zirconium isotope with high radionucleic purity and high specific activity. For this purpose, a piece of Niobium on which natural Yttrium was sprayed and was bombarded with a proton beam. Production yields and chemical separation of the desired metal were compared with other production methods.

For immunoPET, the most commonly used chelator for radiolabelling antibodies to Zirconium-89 is Desferrioxamine B (or DFO). This ligand has limited *in vivo* stability. This problem of ligand demetallization leads to an accumulation of radioactivity in the bones. We propose the synthesis of a DFO derivative coupled to a tripeptide. This bifunctional heptadentate complex has a free amine at the end of the chain allowing its conjugation to a monoclonal antibody. *In vitro* stability and comparison studies were undertaken.

Key-words ^{89}Zr , immunoPET, DFO, monoclonal antibodies, cyclotron