



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Mention : **Génie des Procédés et des Produits et des Molécules**

par **Laurène WAGNER**

Sous la direction de **Dr Samir ACHERAR et Dr Charlotte COLLET**

**Élaboration de chélatant bifonctionnel original utilisable en
theranostic pour le radiomarquage de biomolécules**

07/04/2023

Membres du jury :

Directeur de thèse :	Dr Samir ACHERAR	MC, LCPM, Université de Lorraine, Nancy
Co-directrice de thèse :	Dr Charlotte COLLET	IR, IADI-Nancyclotep, Université de Lorraine, Nancy
Président du jury	Pr Antoine VERGER	Professeur, IADI, Université de Lorraine, Nancy
Rapporteurs :	Pr Claude TAILLEFUMIER	Professeur, ICCF, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand
	Dr Sandrine HUCLIER	MC, Subatech, Université de Nantes, Nantes
Examinatrice :	Dr Cécilia MENARD-MOYON	DR CNRS, IBMC, Université de Strasbourg, Strasbourg

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr Alain Durand et la Dr Marie Christine Averlant-Petit, ancien directeur et actuelle directrice du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire. Je remercie également le Pr Gilles Karcher et la Dr Marjorie Fougère de m'avoir accueilli au sein de Nancyclotep.

Je remercie le Pr Claude Taillefumier et la Dr Sandrine Huclier pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et également le Pr Antoine Verger et la Dr Cécilia Ménard-Moyon pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie chaleureusement mon directeur de thèse, le Dr Samir Acherar et ma co-directrice de thèse, la Dr Charlotte Collet. Merci pour votre confiance et toutes les connaissances et expériences que vous m'avez partagées. Charlotte, merci pour ta bienveillance et ta gentillesse et surtout d'avoir cru en moi, de m'avoir aidé à surmonter les aléas de ces trois années et de m'avoir appris à canaliser mes idées. Samir, merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et tes conseils.

Je remercie également le Pr Antonio Monari et le Dr Raúl Losantos pour la collaboration que j'ai pu réaliser avec eux. Merci de m'avoir introduit à la chimie théorique. Je remercie également le Dr Thierry Bastogne et Julia Budzinski pour l'ensemble du travail que l'on a effectué ensemble autour des plans d'expériences. Merci infiniment pour votre aide et votre patience. Je remercie également le Dr Katalin Selmezi pour m'avoir aidé pour les études RMN et de stabilité des complexes. Enfin je remercie le radiopharmacien Nicolas Véran pour avoir réalisé les études de radiomarquage au lutécium-177.

Un grand merci à tous les membres de Nancyclotep pour m'avoir accueilli parmi eux et m'avoir formé au métier de radiochimiste. Je remercie plus particulièrement Olga, Quentin et Émilie pour tous les bons moments passer dans le laboratoire, ainsi que leurs aides précieuses.

Je souhaite remercier tous les membres du LCPM pour leurs accueils chaleureux. Ce fut un réel plaisir d'avoir pu partager autant de moments conviviaux (et de très bons gâteaux^^) lors des repas et des pauses-café. Je remercie plus particulièrement le Dr Loïc Stefan pour tous les conseils qu'il m'a apporté au cours de ma thèse, Mathilde Achard pour m'avoir formé sur les appareils du laboratoire ainsi qu'Olivier Fabre pour avoir réalisé toutes mes analyses RMN.

Mes remerciements s'adressent ensuite aux membres de la PDTeam, anciens et nouveaux : Albert, Amina, Batoul, Bibigul, Céline, Ludivine, Mathilde, Morgane, Nuri, Philippe. Merci. Ce fût un réel plaisir de travailler à vos côtés, au sein de cette belle équipe soudée.

Je remercie ensuite les doctorants du LCPM pour toutes les activités plus ou moins folles qu'on a pu faire au cours de ma thèse et bien évidemment les pauses-thé : Tristan, Paul, Erika, Anamaria, Djallal, Jihad. J'ai fait la rencontre de personnes incroyables durant ma thèse, Tristan et Ludivine. Ma thèse n'aurait certainement pas été la même sans eux. Merci énormément pour votre soutien quotidien, de m'avoir supporté et pour tous les bons moments et les vacances passées ensemble. Je suis sûre qu'il y en aura encore plein d'autre.

Je remercie également mes amies de toujours, Emeline, Coralie et Clotilde qui seront toujours là pour moi. Bien évidemment je ne pourrais oublier de remercier ma cousine et MJ, même si je pense que vous savez déjà à quel point vous comptez dans ma vie.

Pour finir, je remercie ma famille, et plus particulièrement ma maman qui a toujours été là pour moi. Je te remercie d'avoir eu une confiance aveugle en moi, d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir laissé cette liberté qui m'a permis d'arriver jusqu'ici.

Sommaire

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE 1 : DIAGNOSTIC PAR IMAGERIE MOLÉCULAIRE ET RADIOTHÉRAPIE INTERNE VECTORISÉE.....	7
1. L’approche théranostique en médecine nucléaire	8
1.1. Domaines d’application	8
1.2. La radiothérapie interne vectorisée.....	9
1.3. Le diagnostic en médecine nucléaire	10
1.3.1. La tomographie par émission monophotonique.....	11
1.3.2. La tomographie par émission de positons.....	12
2. Les radiopharmaceutiques.....	14
2.1. Design des radiopharmaceutiques	14
2.2. Les radionucléides.....	16
2.2.1. Notions et définitions de la radioactivité	16
2.2.2. Les moyens de production des radionucléides en médecine nucléaire	18
2.2.3. Les types de désintégrations	19
2.2.3.1. Les émetteurs de positons (β^+).....	20
2.2.3.2. Les émetteurs alpha (α) et bêta moins (β^-).....	23
3. Le radiomarquage des agents de ciblage, cas des biomolécules	25
3.1. Le radiomarquage au fluor-18.....	26
3.1.1. Principe de la radiofluoration	26
3.1.2. Le radiomarquage direct des agents de ciblage	28
3.1.3. Le radiomarquage indirect par l’emploi de groupements prosthétiques (GP)	29
3.2. Le radiomarquage par complexation de radiométaux.....	30
3.2.1. Les chélateurs	30
3.2.1.1. Les chélatants acycliques.....	32
3.2.1.2. Les chélatants cycliques	33
3.2.2. La radiochimie des radiométaux.....	35
3.2.2.1. Radiomarquage au gallium-68.....	36
3.2.2.2. Radiomarquage à l’aluminium-fluor-18	36
3.2.2.3. Radiomarquage au lutécium-177	38
4. Le couplage des agents de ciblage aux chélatants.....	38
4.1. Les stratégies de couplage des biomolécules	38
4.2. Création d’un lien amide	41
4.3. Chimie click	41
4.3.1. La CuAAC.....	41
4.3.2. La SPAAC.....	42
4.3.3. La IEDDA	44
4.3.4. La ligation de Staudinger « traceless »	45
4.3.5. L’addition de thio-Michael.....	45
4.4. Chimie des thiourées.....	46
5. Les agents de ciblage utilisés en théranostic.....	47

5.1.	Ciblage du récepteur α à acide folique (RF α).....	47
5.2.	Ciblage des récepteurs PSMA.....	49
5.3.	Ciblage des intégrines $\alpha_v\beta_3$	51
6.	L'approche théranostique.....	53
6.1.	Principe de la théranostic.....	53
6.2.	L'approche théranostique en médecine nucléaire.....	55
6.3.	Les radiopharmaceutiques théranostiques.....	57
6.3.1.	Les chélateurs cycliques utilisés en théranostic.....	58
6.3.2.	Les agents multi-marquables.....	58
6.3.3.	Les chélatants théranostiques multi-isotopes.....	60
7.	Objectif de la thèse.....	62
CHAPITRE 2 : CONCEPTION ET SYNTHÈSE D'UN NOUVEL AGENT CHÉLATANT BIFONCTIONNEL.....		65
1.	Objectifs.....	66
2.	Intérêt des hydrazines comme plateformes polyfonctionnalisables.....	66
2.1.	L'hydrazine, une plateforme polyfonctionnalisable.....	66
2.2.	Les motifs hydrazine et hydrazide en chimie médicinale.....	67
2.3.	La synthèse d'hydrazines polyfonctionnalisées.....	68
3.	Conception de l'agent chélatant bifonctionnel NO2A-AHM.....	71
4.	Synthèse de NO2A-AHM.....	72
4.1.	Synthèse de l'intermédiaire 5.....	73
4.1.1.	1 ^{ère} stratégie de synthèse de l'intermédiaire 5.....	73
4.1.2.	2 ^{ème} stratégie de synthèse de l'intermédiaire 5.....	74
4.1.3.	3 ^{ème} stratégie de synthèse de l'intermédiaire 5.....	76
4.1.4.	4 ^{ème} stratégie de synthèse de l'intermédiaire 5.....	79
4.2.	Synthèse de NO2A-AHM.....	81
5.	Conclusion du chapitre.....	84
CHAPITRE 3 : ÉTUDE DE COMPLEXATION ET MODÉLISATION MOLÉCULAIRE.....		85
1.	Introduction.....	86
1.1.	La chimie de complexation.....	86
1.2.	La complexation de l'aluminium-fluor, gallium et lutécium par les agents chélatants.....	90
2.	Étude de complexation de NO2A-AHM.....	92
2.1.	Étude de complexation du ^{nat} Ga par NO2A-AHM.....	92
2.1.1.	Mise en place de la complexation.....	92
2.1.2.	Cinétique de formation de ^{nat} Ga-NO2A-AHM et du composé 17.....	94
2.1.3.	Influence des contres-ions du gallium sur la coupure.....	95
2.1.4.	Évaluation chimique de la coupure.....	95
2.1.5.	Proposition de mécanisme de la coupure.....	97
2.2.	Étude de complexation de l'Al ^{nat} F par NO2A-AHM.....	99
2.3.	Étude de complexation de ^{nat} Lu par NO2A-AHM.....	104

2.4.	Étude de complexation d'autres métaux par NO ₂ A-AHM	107
2.5.	Conclusion de l'étude de complexation	108
3.	Modélisation moléculaire	108
3.1.	Modélisation moléculaire des cations trivalents	108
3.1.1.	Modélisation du complexe Al-NO ₂ A-AHM	108
3.1.2.	Modélisation du complexe Ga-NO ₂ A-AHM	111
3.1.3.	Modélisation du complexe Lu-NO ₂ A-AHM.....	114
3.2.	Modélisation moléculaire des complexes avec cations divalents	116
3.2.1.	Modélisation du complexe AlF-NO ₂ A-AHM.....	116
3.2.2.	Modélisation du complexe Cu-NO ₂ A-AHM	118
3.3.	Étude de la défluoration du complexe AlF-NO ₂ A-AHM par modélisation moléculaire	119
4.	Conclusion du chapitre.....	120
CHAPITRE 4 : SYNTHÈSE DES AGENTS DE CIBLAGE MODIFIÉS, COUPLAGE AU NOUVEL ACB ET SYNTHÈSE DES RÉFÉRENCES NON-RADIOACTIVES		
121		
1.	Choix des agents de ciblage.....	122
2.	Modification des agents de ciblage.....	124
2.1.	Stratégie mise en place.....	124
2.2.	Principe de la SPPS.....	128
2.3.	Synthèse d'un agent de ciblage des récepteurs PSMA (20)	131
2.3.1.	Stratégie de synthèse	131
2.3.2.	Synthèse du composé 20.....	132
2.3.2.1.	Création du Motif DUPA	132
2.3.2.2.	Synthèse de l'intermédiaire 4-NC-Lys(Fmoc)-OtBu (24)	133
2.3.2.3.	Formation du lien urée entre Fmoc-E(tBu)-résine Wang et le composé 24.....	135
2.3.2.4.	Couplage des AAs (W et K) sur K(Fmoc)-urée-E(tBu)-Wang résine	136
2.3.2.5.	Clivage et purification du composé 20	137
2.4.	Synthèse du c(RGDfC) (21)	138
2.5.	Synthèse de AF-linker-Cys	140
3.	Couplage des agents de ciblage à l'ACB	142
4.	Synthèse des équivalents non-radioactifs	145
4.1.	Synthèse de Al ^{nat} F-NO ₂ A-AHM-CWKuE (Al ^{nat} F-27) et Al ^{nat} F-NO ₂ A-AHM-c(RGDfC) (Al ^{nat} F-28)	145
4.2.	Synthèse de ^{nat} Lu-NO ₂ A-AHM-CWKuE (^{nat} Lu-27) et Lu-NO ₂ A-AHM-c(RGDfC) (^{nat} Lu-28)	147
5.	Conclusion du chapitre.....	148
CHAPITRE 5 : ÉTUDE DE RADIOMARQUAGE DU NOUVEL ACB.....		
149		
1.	Mise en place de la radiochimie de l'Al ¹⁸ F sur automate de synthèse AllInOne (Trasis) ..	151
1.1.	État de l'art du radiomarquage Al ¹⁸ F	151
1.2.	Objectif	152
1.3.	L'analyse statistique en Radiochimie	153
1.4.	Conditions d'analyse.....	157

1.4.1.	Analyse du radiomarquage par chromatographie sur couche mince (CCM)	158
1.4.2.	Analyse du radiomarquage par Chromatographie Liquide (CL)	159
1.4.3.	Comparaison des deux techniques d'analyse.....	159
1.4.4.	Optimisation de la méthode d'analyse par chromatographie liquide.....	161
1.4.4.1.	Comparaison des conditions d'analyse par chromatographie liquide	161
1.4.4.2.	Influence de l'éthanol	162
1.5.	Radiosynthèse du PSMA-11	163
1.5.1.	Évaluation de l'étape de préparation du [¹⁸ F]NaF de la QMA	164
1.5.2.	Ordre d'ajout des réactifs	167
1.5.2.1.	Analyse de la littérature.....	167
1.5.2.2.	Évaluation de l'ordre d'ajout des réactifs sur le TCRC	169
1.5.2.3.	Impact du co-solvant sur le radiomarquage	170
1.5.3.	Développement de la séquence d'automatisation.....	172
1.5.4.	Optimisation du radiomarquage	173
1.5.4.1.	Choix des paramètres étudiés	173
1.5.4.2.	Évaluation préliminaire de l'impact des facteurs par la méthodologie OVAT	173
1.5.4.2.1.	Emploi de la méthodologie OVAT	173
1.5.4.2.2.	Analyse statistique des résultats de l'étude de criblage.....	175
1.5.4.2.3.	Plan d'optimisation pour l'étude du radiomarquage en mode manuel	177
1.5.4.2.3.1.	Définition du domaine d'étude	177
1.5.4.2.3.2.	Analyse de l'influence des paramètres.....	178
1.5.4.2.3.3.	Prédiction du modèle	180
1.5.4.2.3.4.	Validation du modèle.....	181
1.5.4.2.3.5.	Validation du domaine.....	182
1.5.4.3.	Optimisation du radiomarquage en mode automatique	183
1.5.4.3.1.	Analyse statistique des résultats des essais préliminaires de radiomarquage en mode automatique (étude de criblage)	183
1.5.4.3.2.	Plan d'optimisation pour l'étude du radiomarquage en mode automatique	186
1.5.4.3.3.	Prédiction du modèle.....	188
1.5.4.3.4.	Validation du modèle.....	190
1.5.5.	Purification	190
1.5.5.1.	État de l'art.....	190
1.5.5.2.	Test des cartouches et des volumes de dilution	192
1.5.5.3.	Automatisation de l'étape de purification.....	193
1.5.6.	Automatisation totale.....	193
1.5.7.	Comparaison du radiomarquage manuel vs. automatique	196
2.	Radiomarquage de l'ACB NO2A-AHM	197
2.1.	Radiomarquage à l'Al ¹⁸ F du NO2A-AHM	197
2.2.	Radiomarquage au gallium-68 du NO2A-AHM.....	198
2.3.	Radiomarquage au lutécium-177 du NO2A-AHM.....	201
3.	Conclusion du chapitre.....	203
	CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES.....	205
	PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	211
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	255
	ANNEXES.....	263

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4-NC : Chloroformate de 4-nitrophényle	EDC : (1-Ethyl-3- (3-diméthylaminopropyl)carbodiimide)
AA : Acide aminé	EE : Efficacité d'éluion
AAZTA : 1,4-Bis(carboxyméthyl)-6-[bis(carboxyméthyl)]amino-6-méthylperhydro-1,4-diazépine	EP : Efficacité de purification
AB : Entité liant l'albumine	EPPI : Eau pour préparation injectable
Ac : Acétyle	Équiv. : Équivalent
ACB : Agent chélatant bifonctionnel	ESI : Ionisation par électro spray
AF : Acide folique	Et : Éthyle
AIO : AllInOne	EtOH : Éthanol
AMM : Autorisation de mise sur le marché	eV : Electron volt
Arg (R) : L-Arginine	FDG : 2-Désoxy-2-fluoro-D-glucose
Asp (D) : L-Acide aspartique	Fmoc : Fluorènylméthoxycarbonyle
Boc : <i>tert</i> -Butoxycarbonyle	Glu (E) : L-Acide glutamique
Bq : Becquerel	Gly (G) : Glycine
Bz : Benzyle	GP : Groupement prosthétique
CB-TE2A : 4,11-Bis(carboxyméthyl)-1,4,8,11-tétraazabicyclo[6.6.2]hexadécane	H₂dedpa : 1,2-[[6-(Carboxy)-pyridin-2-yl]méthylamino]éthane
CCM : Chromatographie sur couche mince	H₄octapa : Acide <i>N,N'</i> -Bis(6-carboxy-2-pyridylméthyl)éthylènediamine- <i>N,N'</i> -diacétique
CCTM : Chimie Click Thio-Maléimide	HATU : 1-[Bis(diméthylamino)méthylene]- <i>1H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridinium 3-oxidhexafluorophosphate
cd : Corrigé de la décroissance	HBED-CC : Acide <i>N,N'</i> -bis(2-hydroxy-5-(carboxyéthyl)benzyl) éthylènediamine- <i>N,N'</i> -diacétique
CHX-A''-DTPA : Acide <i>N</i> -(2-aminoéthyl)- <i>trans</i> -1,2-diaminocyclohexane- <i>N,N',N''</i> -pentaacétique	HBTU : 2-(<i>1H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate
CL : Chromatographie liquide	HLB : Hydrophilic-Lipophilic Balance
CPMRC : Cancer de la prostate métastatique résistant à la castration	HOBt : Hydrate d'hydroxybenzotriazole
CTP : Catalyseur de transfert de phase	HPLC : Chromatographie liquide haute performance
CuAAC : Cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre(I)	HRMS : Spectromètre de masse à haute résolution
Cys (C) : L-Cystéine	HSAB : Acides et bases durs et mous
DBCO : Dibenzocyclooctyne	ICP-OES : Spectroscopie d'émission de plasma à couplage inductif
DBF-pip : Dibenzofulvène-pipéridine	IEDDA : Réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons
DBU : 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène	IRM : Imagerie par résonance magnétique
DCM : Dichlorométhane	iTLC-SG : CCM sur feuille de cellulose imprégnée de gel de silice
DFO : Deferoxamine	HPLC-MS : HPLC couplée à un spectromètre de masse
DIBO : Dibenzocyclooctyne	Lys (K) : L-Lysine
DIC : <i>N,N'</i> Diisopropylcarbodiimide	mAIO : Mini AllInOne
DIPEA : <i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine	MMP : Métalloprotéases matricielles
DMF : <i>N,N</i> -Diméthylformamide	MRP : Médicament radiopharmaceutique
DMSO : Diméthylsulfoxyde	NaAsc : Ascorbate de sodium
DOTA : Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique	NaOAc : Acétate de sodium
DOTAGA : Acide 2,2',2''-(10-(2,6-dioxotétrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3-yl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7-triyl)triacétique	NC : Non communiqué
DOTATATE : DOTA-tyrosine-3-octreotate	Ncd : Non corrigé de la décroissance
DOTATOC : DOTA-octreotide	
DTPA : Acide diéthylènetriaminepentaacétique	
EA : Efficacité d'accrochage	

NCS : Isothiocyanate
NETA : Acide {4-[2-(bis-carboxyméthylamino)-éthyl]7-carboxyméthyl-[1,4,7]triazonan-1-yl}acétique
NMM : *N*-Méthylmorpholine
NMR/RMN : Résonance magnétique nucléaire
NODAGA : Acide 1,4,7-triazacyclononane,1-glutarique,7-acétique
NOTA : Acide 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-trisacétique
Pbf : 2,2,4,6,7-Pentaméthylidihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS : Phosphate-buffered saline
Pd/C : Palladium sur charbon
PEG : Polyéthylène glycol
Ph : Phényle
Phe (F) : L-Phénylalanine
Phe (f) : D-Phénylalanine
PRC : Pureté radiochimique
PSMA : Antigène prostatique spécifique membranaire
PyBOP : Hexafluorophosphate de benzotriazole-1-yloxytrypirrolidinophosphonium
QMA : Ammonium quaternaire méthylé
Rf : Rapport frontal
RF α : Récepteur α à l'acide folique
RGD : Tripeptide Arg-Gly-Asp
RP-HPLC : HPLC en phase inverse
RRC : Rendement radiochimique
RTIV : Radiothérapie interne vectorisée
SPE : Extraction sur phase solide
S_N : Substitution nucléophile
S_NAr : Substitution nucléophile aromatique
SPAAC : Cycloaddition azoture-alcyne favorisée par déformation
SPPS : Synthèse peptidique sur support solide
t_{1/2} : Temps de demi-vie (période radioactive)
TA/RT : Température ambiante
TACN : 1,4,7-Triazacyclononane
***t*Bu** : *tert*-Butyle
TC : Taux de conversion
TCRC : Taux de conversion radiochimique
TEMP : Tomographie par émission monophotonique
TEP : Tomographie par émission de positons
TETA : Acide 1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane-1,4,8,11-tétraacétique
TFA : Acide trifluoroacétique
THF : Tétrahydrofurane
TIPS : Triisopropylsilane
TNE : Tumeurs neuroendocrines
t_R/R_t : Temps de rétention
Trp (W) : L-Tryptophane
Trt : Trityle
UHPLC : Chromatographie liquide ultra haute performance)
UV : Ultraviolet

PRODUCTIONS
SCIENTIFIQUES

Publications :

- (P1) Wagner, L.; Kenzhebayeva, B.; Dhaini, B.; Boukhlef, S.; Moussaron, A.; Mordon, S.; Frochot, C.; Collet, C.; Acherar, S. Folate-Based Radiotracers for Nuclear Imaging and Radionuclide Therapy. *Coordination Chemistry Reviews* **2022**, *470*, 214702. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214702>.
- (P2) Dhaini, B.; Wagner, L.; Moinard, M.; Daouk, J.; Arnoux, P.; Schohn, H.; Schneller, P.; Acherar, S.; Hamieh, T.; Frochot, C. Importance of Rose Bengal Loaded with Nanoparticles for Anti-Cancer Photodynamic Therapy. *Pharmaceuticals* **2022**, *15* (9), 1093. <https://doi.org/10.3390/ph15091093>.
- (P3) Wagner, L.; Losantos, R.; Selmecezi, K.; Frochot, C.; Karcher, G.; Monari, A.; Collet, C.; Acherar, S.; Design and Synthesis of a New Bifunctional Chelating Agent: Application for Al¹⁸F/¹⁷⁷Lu complexation *Journal of Inorganic Biochemistry* **2023**, 112267. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2023.112267>.

Communications orales :

- (CO1) International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (iSRS) 2022 à Nantes du 29 mai au 2 juin 2022

Wagner, L.; Losantos, R.; Frochot, C.; Karcher, G.; Monari, A.; Collet, C.; Acherar, S. O-14 - Design and Synthesis of a New Bifunctional Chelating Agent for ¹⁸F-Al/¹⁷⁷Lu Radiolabelling: Theranostic Approach. *Nuclear Medicine and Biology* **2022**, *108–109*, S12–S13. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(22\)00072-5](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(22)00072-5).

- (CO2) International congress on Metal Binding Peptide (MBP) 2022 à Nancy du 5 au 8 juillet 2022

Wagner, L.; Losantos, R.; Frochot, C.; Karcher, G.; Monari, A.; Collet, C.; Acherar, S. Design, molecular modeling and synthesis of a novel peptide-based chelating agent for theranostic applications with ¹⁸F-Al and ¹⁷⁷Lu complexation

- (CO3) 11th Barrande Vtlava French-Czech Chemistry Meeting, à Dijon, université de Bourgogne du 28 au 30 août 2022

Wagner, L.; Losantos, R.; Frochot, C.; Karcher, G.; Monari, A.; Collet, C.; Acherar, S. Development of a chelating agent for diagnostic by PET imaging and targeted radionuclide therapy applications

Communication par affiche :

- (CA1) International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (iSRS) 2022 à Nantes du 29 mai au 2 juin 2022

Wagner, L.; Bastogne, T.; Karcher, G.; Acherar, S.; Collet, C. P-163 - Automated ^{18}F -Al-Radiolabelling Optimization of PSMA-11 for PET Imaging Using a Design of Experiments Approach. *Nuclear Medicine and Biology* **2022**, *108–109*, S138–S139. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(22\)00300-6](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(22)00300-6).

- (CA2) 11th Barrande Vtlava French-Czech Chemistry Meeting, à Dijon, université de Bourgogne du 28 au 30 août 2022

Wagner, L.; Losantos, R.; Frochet, C.; Karcher, G.; Monari, A.; Collet, C.; Acherar, S. Development of a chelating agent for diagnostic by PET imaging and targeted radionuclide therapy application

INTRODUCTION

GÉNÉRALE

La médecine nucléaire est une discipline médicale permettant de poser un diagnostic et de traiter diverses pathologies à l'aide de radiopharmaceutiques. Elle utilise des techniques d'imagerie telles que la tomographie par émission de positons (TEP) et la tomographie par émission monophotonique (TEMP) pour diagnostiquer les cancers, les maladies neurodégénératives, des maladies inflammatoires ou des infections bactériennes. La médecine nucléaire emploie également des radiopharmaceutiques pour traiter le cancer par radiothérapie interne vectorisée (RTIV). Le diagnostic par imagerie TEP ou TEMP consiste en l'utilisation d'un radiopharmaceutique comportant un radionucléide émettant un rayonnement β^+ et γ , respectivement. Puis après distribution du radiopharmaceutique dans l'organisme du patient, ce dernier va subir un examen d'imagerie permettant de visualiser les cellules caractéristiques de la pathologie à détecter. Ces radiopharmaceutiques peuvent inclure dans leurs structures un agent de ciblage spécifique de certains biomarqueurs de la pathologie ou permettre de visualiser le métabolisme des cellules cancéreuses. Concernant la RTIV, un radiopharmaceutique marqué par un radionucléide, émetteur de rayonnement α ou β^- et comportant un agent de ciblage reconnaissant spécifiquement les cellules tumorales, est injecté chez le patient. Il provoque des dommages sur l'ADN des cellules cancéreuses induisant ainsi leurs morts cellulaires.

Afin de proposer un traitement le plus efficace et le plus adaptée à chaque patient selon l'avancement de leur cancer, un diagnostic le plus précis possible est nécessaire. L'approche théranostique consiste à réaliser un test compagnon en employant un radiopharmaceutique pour le diagnostic, identique ou très similaire à celui de la thérapie, afin d'adapter au mieux le traitement par RTIV en termes de doses et de nombre d'injections. Il est également possible de suivre le traitement par imagerie pour adapter le traitement en fonction de la réponse du patient.

Les radionucléides les plus employés en imagerie TEP actuellement sont le fluor-18 (^{18}F) et le gallium-68 (^{68}Ga). Le 1^{er} est un halogène fixé aux agents de ciblage par formation de liaisons covalentes tandis que le 2^{ème} est un métal complexé par un agent chélatant fixé à un agent de ciblage. Cependant, depuis une dizaine d'année, une méthode de radiomarquage par chimie de complexation est utilisée pour le radiomarquage au fluor-18. Cette stratégie consiste en l'utilisation d'un adduit $\{\text{AlF}\}^{2+}$ dont l'aluminium sert à la complexation par un agent chélatant et l'atome de fluor-18 jouant le rôle de co-ligand de l'aluminium. Concernant la RTIV, l'un des radionucléides les plus employés est le lutécium-177 (^{177}Lu) qui est un émetteur β^- . Ainsi, l'emploi de radiopharmaceutiques similaires utilisant le fluor-18, le gallium-68 et le lutécium-177 permettrait grandement de développer l'approche théranostique pour le diagnostic et le traitement de cancers.

Afin de proposer une approche théranostique en employant le couple $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ ou $^{18}\text{F}/^{177}\text{Lu}$, un agent chélatant permettant la complexation de l'aluminium-fluor-18 (Al^{18}F), le gallium-68 et le lutécium-177 est indispensable. Cependant, les agents chélatants proposés dans la littérature ne permettent pas de complexer ces trois éléments. Cette thèse consiste donc en l'élaboration d'un nouvel agent chélatant bifonctionnel (ACB) pour le radiomarquage de biomolécules par chimie de complexation. Pour cela, un nouvel ACB a été conçu afin de 1) complexer les 3 radionucléides d'intérêt et 2) être couplé à un large panel d'agents de ciblage afin de pouvoir cibler divers cancers par couplage spécifique *via* des résidus cystéine et une fonction maléimide. Ce nouvel ACB permettra de moduler le radionucléide et l'agent de ciblage afin de s'insérer au mieux dans la médecine personnalisée.

Cette thèse repose sur une approche pluridisciplinaire et a été réalisée en collaboration avec plusieurs laboratoires :

- Le Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), UMR 7375, CNRS, Université de Lorraine, sous la supervision du Dr Samir Acherar. La synthèse du nouvel ACB, les tests de complexation et la synthèse peptidique sur support solide ainsi que les caractérisations des composés ont été effectués au sein de ce laboratoire.
- La plateforme d'imagerie moléculaire Nancyclotep, groupement d'intérêt économique constitué du CHRU de Nancy-Brabois, de l'Université de Lorraine et de l'entreprise pharmaceutique Posifit, sous la supervision du Dr Charlotte Collet. Les études de radiochimie ont été effectuées au sein de cette plateforme.
- Le laboratoire Interfaces Traitements Organisation et DYnamique des Systèmes (ITODYS), UMR 7086, CNRS, Université Paris-Cité, en collaboration avec le Pr Antonio Monari. Les études de modélisation moléculaire ont été effectuées au sein de ce laboratoire.
- La start-up CYBERNANO, en collaboration avec le Pr Thierry Bastogne, rattaché au Centre de Recherche en Automatique (CRAN), UMR 7039, CNRS, Université de Lorraine. Les études de radiochimie menées par plans d'expériences suivies des analyses statistiques des résultats ont été effectuées au sein de cette start-up.
- Le Laboratoire Lorrain de Chimie Moléculaire (L2CM), UMR 7053, CNRS, Université de Lorraine, en collaboration avec le Dr Katalin Selmeczi. Certaines études de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été menées au sein de ce laboratoire.

Le premier chapitre de cette thèse présente le contexte bibliographique dans lequel s'inscrit cette thèse. Il présente l'approche théranostique et les techniques d'imagerie et de thérapie

utilisées en médecine nucléaire. Un focus sur les radionucléides, les radiopharmaceutiques, différentes techniques de radiomarquage et plus particulièrement la radiochimie de complexation par l'utilisation d'ACB est réalisé. Ce chapitre présente également les stratégies permettant la conjugaison des agents de couplage aux agents chélatants. Enfin une dernière partie présente les trois cibles biologiques étudiées ainsi que les cancers qui y sont associés à savoir, le PSMA (Antigène prostatique spécifique membranaire) surexprimé sur les cellules cancéreuses de la prostate, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ surexprimées lors de l'angiogenèse induite par les tumeurs, et le RFA (Récepteur α à l'acide folique), surexprimé par les cellules du cancer de l'ovaire.

Le second chapitre de cette thèse présente la conception du nouvel ACB avec les différentes stratégies de synthèse utilisées.

Le troisième chapitre présente les études de complexation à l'aluminium-fluor, au gallium et au lutécium par le nouvel ACB, ainsi que les études de modélisation moléculaire et de RMN des complexes formés.

Le quatrième chapitre de cette thèse présente le couplage de l'ACB à deux agents de ciblage, obtenus par une stratégie de synthèse peptidique sur support solide (SPPS), permettant la preuve de concept que l'ACB peut être couplé à un large panel d'agents de ciblage. Ce chapitre présente également la synthèse des références non radioactives pour les composés obtenus.

Le cinquième chapitre présente les études de radiochimie menées au cours de cette thèse. Une étude du radiomarquage au gallium-68 du nouvel ACB couplé au c(RGDfC) a été menée. Ce chapitre présente également la mise en place d'une méthode optimisée et robuste de radiomarquage à $Al^{18}F$ en mode manuel et sur automate de synthèse. Une étude d'optimisation a été réalisée sur le PSMA-11, un radiopharmaceutique disponible commercialement, par la méthodologie des plans d'expériences (DoE). Cette méthode a ensuite pu être adaptée pour le radiomarquage à l' $Al^{18}F$ du nouvel ACB.

Enfin, une dernière partie « conclusion et perspectives » résume les principaux résultats obtenus au cours de cette thèse ainsi que les possibles voies d'optimisation de ces travaux.

CHAPITRE 1 : DIAGNOSTIC
PAR IMAGERIE
MOLÉCULAIRE ET
RADIOTHÉRAPIE INTERNE
VECTORISÉE

1. L'approche théranostique en médecine nucléaire

La médecine nucléaire est une spécialité de la médecine consistant à diagnostiquer et traiter des patients par l'utilisation de radiopharmaceutiques. Elle est utilisée dans de nombreux domaines de la médecine comme la cancérologie, la cardiologie, l'étude des maladies neurodégénératives en fonction du médicament radiopharmaceutique (MRP) utilisé. Récemment, l'utilisation de l'approche théranostique, consistant à diagnostiquer et traiter un patient, avec la même molécule vectrice, a émergé en médecine nucléaire et cette approche est appliquée en oncologie.

1.1. Domaines d'application

En France, les cancers sont la deuxième cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires et sont à l'origine de près d'un décès sur six dans le monde avec 10 millions de décès en 2020. Le cancer le plus fréquent est celui du sein avec 2,26 millions de cas en 2020, suivi par celui du poumon (2,21 millions), colorectal (1,93 millions), prostate (1,41 millions) et peau (1,2 millions). En termes de décès, le cancer du poumon est le plus meurtrier avec 1,8 millions de décès dans le monde en 2020.^[1]

Les cellules cancéreuses sont issues de cellules mutées n'assurant plus leurs rôles métaboliques initiales et produisant dès lors des composés chimiques capables de faire dysfonctionner l'organe dans lequel elles se trouvent. Elles se caractérisent également par leur multiplication rapide et désordonnée induisant la formation d'une masse appelée tumeur. L'établissement de l'environnement pré-tumoral conduit au recrutement de cellules inflammatoires qui libèrent un grand nombre de protéines telles que des cytokines, chémokines, facteur de croissance et facteurs pro-angiogéniques permettant le développement et la progression tumorale. Lorsque les cellules cancéreuses atteignent la circulation sanguine, elles peuvent alors migrer vers d'autres organes et s'y développer sous forme de métastases, signe d'un stade avancé de la maladie. Les cellules cancéreuses présentent des modifications comme la surexpression de certains récepteurs membranaires spécifiques à chaque type de cancer.

De nombreuses stratégies thérapeutiques ont émergé afin de traiter les cancers, cependant, encore aujourd'hui, de nombreux cancers ne sont pas soignables et les traitements existants permettent seulement de prolonger l'espérance de vie. Par exemple, le glioblastome, qui est la forme la plus agressive des tumeurs cérébrales, présente une survie moyenne de 14-15 mois après diagnostic. Les traitements principaux, présentés ci-dessous, peuvent être utilisés seuls ou en combinaison afin d'augmenter les chances de rémission.

- La chirurgie qui permet la résection de la tumeur et qui est préconisée dans 80% des cas.
- La chimiothérapie qui consiste en l'injection d'un composé cytotoxique bloquant la multiplication cellulaire. Cette stratégie provoque néanmoins de nombreux effets secondaires indésirables car les agents cytotoxiques ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses et vont s'attaquer à toutes cellules en division et proliférantes. Des effets secondaires comme des vomissements, diarrhée, alopecie ou anémie sont reportés.^[2,3]
- L'hormonothérapie qui est utilisée pour traiter les cancers hormonaux comme le cancer de l'ovaire ou de la prostate. Elle consiste à inhiber la production de testostérone ou d'œstrogène qui favorise la prolifération des cellules tumorales.^[4]
- La radiothérapie externe qui consiste à envoyer un faisceau de rayonnements ionisants (rayons X) sur la tumeur afin de provoquer des lésions létales de l'ADN. L'inconvénient de cette méthode est que le faisceau va endommager également les cellules saines qui sont sur son passage.^[5]
- La radiothérapie interne aussi appelé la curiethérapie qui consiste à injecter une source radioactive (rayon γ) à l'intérieur du patient (*i.e.*, grain d'iode-131 pour le traitement du cancer de la prostate).

1.2. La radiothérapie interne vectorisée

Depuis quelques décennies, les thérapies ciblées sont à l'étude. Elles consistent à fixer un agent cytotoxique pour les cellules cancéreuses à un agent de ciblage capable de reconnaître spécifiquement les cellules cancéreuses. Cette stratégie est en plein essor puisqu'elle permet de grandement limiter les effets secondaires des autres types de thérapie en limitant la toxicité au niveau des organes et cellules saines. De plus, cela permet de concentrer les agents thérapeutiques au plus proche de la tumeur pour augmenter l'efficacité thérapeutique.

La radiothérapie interne vectorisée (RTIV) est un type de thérapie ciblée contre le cancer. Elle s'inspire de la radiothérapie interne utilisée depuis les années 1940 pour soigner les maladies de la thyroïde comme l'hyperthyroïdie et le cancer de la thyroïde à l'aide d'iode-131 capable de s'accumuler dans la thyroïde. La stratégie de traitement consiste en une injection intraveineuse d'un radiopharmaceutique possédant un agent de ciblage capable de reconnaître spécifiquement une protéine à la surface des cellules cancéreuses et d'un radionucléide émettant des rayonnements α ou β^- capables de léser l'ADN des cellules cancéreuses pour provoquer leurs morts cellulaires.^[6] Cette stratégie est principalement utilisée pour traiter les cancers au

stade métastatique pour lesquels aucune résection chirurgicale n'est possible ou comme traitement de dernière chance. Cependant, des essais cliniques ont montré des résultats prometteurs établissant la RTIV comme un potentiel traitement de choix dans les décennies à venir.

Nous observons un engouement particulier envers ce traitement par les compagnies pharmaceutiques qui investissent fortement dans le développement de cette nouvelle stratégie thérapeutique. La plupart des émetteurs α et β^- émettent également des rayonnements γ permettant un suivi du traitement par imagerie. Ainsi, il est possible d'observer les effets du traitement après une première dose. Ce traitement étant en plein essor, quelques radiopharmaceutiques possèdent une autorisation de mise sur le marché (AMM) comme le [^{177}Lu]Lu-DOTATATE (Lutathéra[®]) pour le traitement des tumeurs neuroendocrines (TNE).^[7] De nombreux autres sont actuellement en phase d'essais cliniques, comme le [^{177}Lu]Lu/[^{225}Ac]Ac-PSMA-617 utilisé pour le traitement du cancer de la prostate métastatique résistant à la castration (CPMRC).^[8,9]

1.3. Le diagnostic en médecine nucléaire

Le diagnostic de cancer chez un patient se déroule en plusieurs étapes et nécessite l'utilisation de plusieurs outils diagnostics complémentaires. Ils permettent d'établir un bilan renseignant la nature de la lésion cancéreuse, son agressivité et sa capacité de propagation.

Les premières étapes du diagnostic d'un cancer consistent en un examen clinique afin de doser des biomarqueurs tumoraux associés (examens sanguin et urinaire). La confirmation du diagnostic est réalisée à l'aide d'une biopsie ou de techniques d'imagerie médicale (scanner, échographie, endoscopie, IRM (imagerie par résonance magnétique)).^[10]

La médecine nucléaire est un domaine de la médecine capable de poser un diagnostic en utilisant des techniques d'imagerie moléculaire par identification de lésions cancéreuses spécifiques grâce à des agents d'imagerie moléculaire. Les techniques de la tomographie par émission monophotonique (TEMP), aussi connu sous le nom de scintigraphie, et de la tomographie par émission de positons (TEP) emploient respectivement des radionucléides émettant des rayonnements γ et β^+ . L'imagerie TEMP a été développée en 1963 et fut le premier examen médical employant l'injection d'un radiopharmaceutique. L'imagerie TEP, quant à elle, a été développée en 1974 et a rapidement supplanté l'imagerie TEMP puisqu'elle permet l'obtention d'images plus résolues (meilleure sensibilité, faible bruit de fond) (Tableau 1).^[11,12] Les techniques d'imagerie conventionnelles comme le scanner peuvent être complémentaires

avec les techniques d'imagerie nucléaire afin de superposer une image anatomique à l'image fonctionnelle pour localiser la lésion cancéreuse avec plus de précision.

Tableau 1 : Caractéristiques des techniques d'imagerie employées en médecine nucléaire

Technique	Résolution Spatiale (mm)	Sensibilité (M)	Coût
TEMP	1 – 2 (préclinique), 8 – 10 (clinique)	10^{-10} à 10^{-11}	\$\$
TEP	1 – 2 (préclinique), 5 – 7 (clinique)	10^{-11} à 10^{-12}	\$\$\$
Scanner	0,05 – 0,2 (préclinique), 0,5 – 1 (clinique)	NC	\$\$

1.3.1. La tomographie par émission monophotonique

L'imagerie TEMP a été développée en 1963 et fut le premier examen médical employant l'injection d'un radiopharmaceutique. Elle repose sur l'injection d'un radiopharmaceutique dans l'organisme du patient suivie de sa localisation dans l'organisme. Le radionucléide employé émet un rayonnement γ qui, en se désintégrant, est détecté par des caméras gamma placées autour du patient. Enfin, une image 3D est reconstituée (Figure 1). Un collimateur peut également être employé pour augmenter la résolution des images.^[13] Les radionucléides employés émettent des photons avec une énergie de l'ordre de 100-200 keV.^[6]

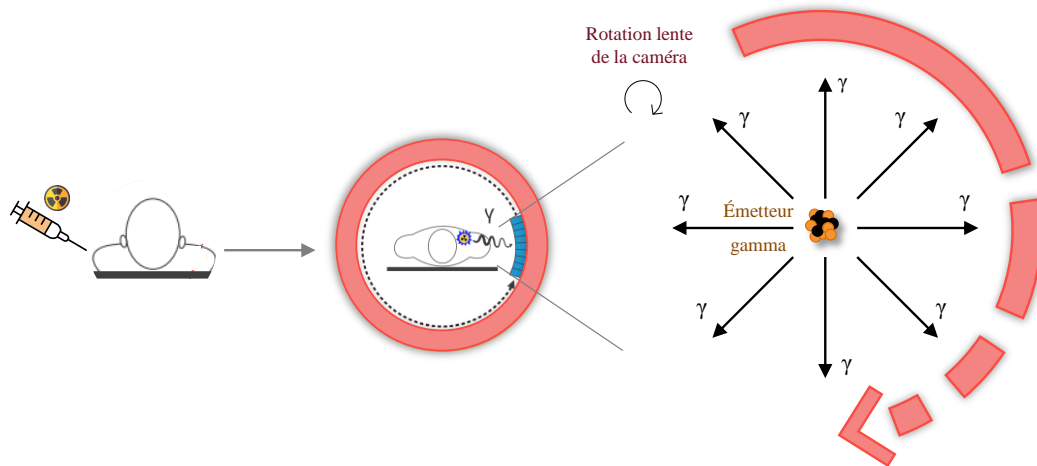


Figure 1 : Principe de l'imagerie TEMP

Les principaux radionucléides utilisés sont le technetium-99 métastable (^{99m}Tc) puisque 80% des radiopharmaceutiques employés en TEMP l'utilise. L'utilisation de l'indium-111 (^{111}In) et de l'iode-123/131 (^{123}I et ^{131}I) est également reportée. La sensibilité élevée, la pénétration tissulaire illimitée et le bon contraste offert par l'imagerie TEMP en fait un outil diagnostique de choix pour le diagnostic de cancer et de maladie neurologique ou cardiaque. La très forte sensibilité de cette technique permet d'injecter des quantités d'activité très faibles.

Depuis le développement de l'imagerie TEMP corps entier, un regain d'intérêt pour cette technique est observé et le développement de nouveaux radioconjugués au technétium ou à l'indium est en cours. De même, le couplage de l'imagerie TEMP à un scanner (tomodensimètre) a permis grandement d'améliorer la fiabilité du diagnostic avec les γ -radiopharmaceutiques déjà présents sur le marché. En effet, la superposition des deux images permet un repérage anatomique précis. Un regain d'utilisation de cette technique se fait également sentir depuis le développement de la RTIV et de son *monitoring* par imagerie. Les principaux radiopharmaceutiques employés en TEMP sont l' ^{131}I I, l' ^{123}I I ou le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Tc-pertechnetate pour le diagnostic du cancer de la thyroïde,^[14,15] le ^{123}I -FP-CIT (DATscan[®]) pour détecter la maladie de Parkinson,^[16] le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Tc-HMPAO (Ceretec[®]) pour le diagnostic de maladies cérébrovasculaires, démences, épilepsies et traumatismes crâniens,^[17] le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Tc-Sestamibi (Cardiolite[®]) pour détecter les maladies cardiaques, le cancer du sein et l'adénome parathyroïdien,^[15,18] et le ^{111}In In-pentetreotide (OctreoScan[®]) pour le diagnostic des TNE.^[19]

1.3.2. La tomographie par émission de positons

La TEP est une technique d'imagerie médicale employant un MRP possédant un radionucléide émetteur de positon (β^+). Le principe de détection de la TEP est basé sur une réaction nucléaire dans l'organisme du patient lors de laquelle un positon est annihilé par un électron du milieu (après avoir parcouru une certaine distance, appelée le parcours libre) et émettant dans des directions diamétralement opposées, deux photons γ ayant une énergie de 511 keV. La détection de leur coïncidence par une couronne de détection à scintillation placée en anneau autour du patient permet de localiser de manière très sensible leur point d'émission (Figure 2).^[20] Un système de collimation électronique permet d'identifier les photons appariés et de dessiner une ligne de réponse passant par le site d'émission des photons. Les coïncidences détectées sont stockées sous forme de sinogrammes et permettent une reconstruction des images en 3D. Un examen dure de 10 à 30 minutes et peut fournir des images corps entier. La reconstruction d'une image *via* une échelle de couleur montre la concentration en radiopharmaceutique sur le lieu d'émission de l'ensemble des photons collectés.^[11] Depuis 20 ans, l'utilisation combinée d'un scanner à la TEP permet la superposition d'une image structurelle et fonctionnelle permettant de mieux situer le dysfonctionnement dans l'organisme et ainsi améliorer les diagnostics.^[21,22] Les principaux radionucléides utilisés sont le fluor-18 puisque 80% des MRP employés en TEP l'utilise. Une forte augmentation de l'utilisation du gallium-68 et, en moindre mesure, d'autres éléments comme le carbone-11 (^{11}C) est observée. La TEP permet l'obtention d'images très résolues mais cette résolution dépend fortement de la nature du radioélément employé. En effet,

le fluor-18 fournit des images TEP à haute résolution spatiale puisque son parcours libre est assez court (0,19 – 0,8 mm). Le gallium-68, quant à lui, possède un parcours libre plus grand que celui du fluor-18 (0,67 – 3,32 mm). Ce parcours libre varie également en fonction de la nature du tissu dans lequel se trouve le radioélément. Ainsi, la résolution est moindre dans les tissus mous et les poumons et plus élevée dans les tissus durs comme les os.^[23] La TEP est donc un outil de choix pour le diagnostic de cancer et le suivi thérapeutique. Cet outil est également utilisé pour détecter des maladies inflammatoires, auto-immunes,^[24,25] neurodégénératives telle que Alzheimer,^[26,27] ou encore des infections bactériennes.^[28]

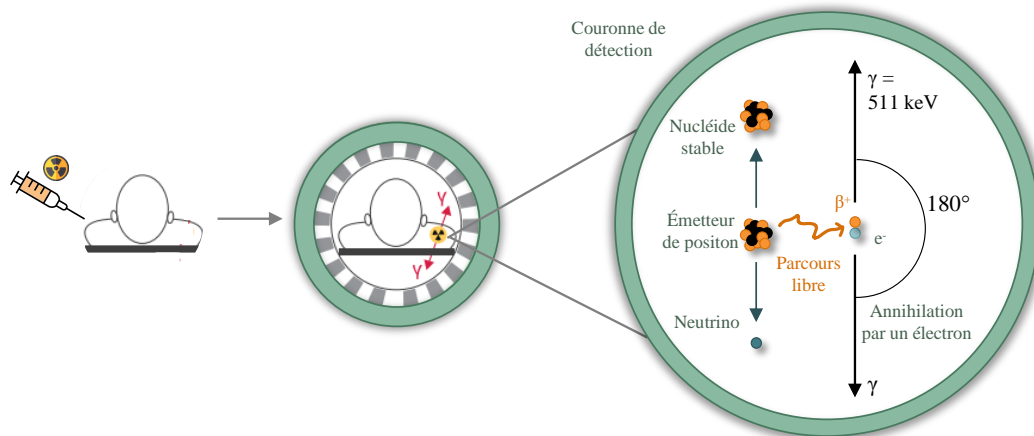


Figure 2 : Principe de l'imagerie TEP

Grâce à l'obtention d'images de meilleures résolutions, l'imagerie TEP a rapidement gagné en popularité au détriment de l'imagerie TEMP. Ainsi, bien plus d'études sur le diagnostic par imagerie TEP et de radiopharmaceutiques TEP sur le marché sont recensés. Le [¹⁸F]FDG (2-désoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose) est le radiotracteur le plus utilisé pour l'imagerie TEP puisqu'environ 80% des examens TEP sont réalisés avec ce radiotracteur. Ce radiopharmaceutique est un dérivé du glucose, nutriment essentiel des cellules, et est particulièrement consommé par les cellules à fort métabolisme glucidique comme les cellules cancéreuses. Le [¹⁸F]FDG, internalisé dans les cellules, ne peut pas entrer dans la voie de métabolisation du glucose, de par ses modifications structurales, et s'accumule donc dans les cellules. Ce radiotracteur est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique, ce qui lui confère un intérêt tout particulier dans le diagnostic de tumeurs cérébrales comme le glioblastome. Cependant, le [¹⁸F]FDG se fixe facilement aux cellules à fort métabolisme glucidique, comme celles du cerveau, du tube digestif, de l'appareil urinaire ou aux cellules inflammatoires et hypoxiques. Le cerveau étant un grand consommateur de glucose, le contraste lésionnel par rapport à un tissu sain est faible, ce qui limite son utilisation en neuro-

oncologie.^[29] Cependant, la non-spécificité du [¹⁸F]FDG est un inconvénient majeur pour l'identification des types de tumeurs.

On retrouve également l'utilisation de nombreux autres ¹⁸F-radiopharmaceutiques possédant une AMM comme le [¹⁸F]NaF utilisé dans le diagnostic de l'arthrose douloureuse des articulations facettaires, le [¹⁸F]FET ([¹⁸F]fluoroéthyl-L-tyrosine) pour le diagnostic des tumeurs cérébrales^[30] ou le [¹⁸F]FDOPA ([¹⁸F]-3,4-dihydroxy-6-fluoro-L-phénylalanine) pour le diagnostic de maladies neurodégénératives ou pour le diagnostic de tumeurs cérébrales.^[31] Les ⁶⁸Ga-radiopharmaceutiques utilisés en routine clinique sont le souvent dérivés de la somatostatine [⁶⁸Ga]Ga-DOTATOC^[32] pour le diagnostic des TNE et le [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11^[33-37] pour le diagnostic du cancer de la prostate (Tableau 2).

Tableau 2 : Liste des principaux radiopharmaceutiques employés en imagerie TEP^[38]

Radiopharmaceutiques	Application
[¹⁸ F]FDG	Divers cancers
[¹⁸ F]F-choline	Cancer de la prostate, carcinome hépatocellulaire
[¹⁸ F]FLT	Tumeurs cérébrales, cancer tête et cou
[¹⁸ F]F-DOPA	Tumeurs cérébrales, maladies neurodégénératives, TNE, cancer de la thyroïde
[¹⁸ F]FET	Tumeurs cérébrales
[¹⁸ F]FES	Cancer du sein
[⁶⁸ Ga]Ga-DOTATOC	TNE
[⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11	Cancer de la prostate

FLT : 3'-Fluoro-3'-déoxy-L-thymidine, FES : 16 α -17 β -Fluoroestradiol

2. Les radiopharmaceutiques

2.1. Design des radiopharmaceutiques

La réalisation d'un examen diagnostique par imagerie TEP ou TEMP et un traitement par RTIV nécessite l'utilisation d'un composé injectable nommé radiopharmaceutique. Il existe de nombreux radiopharmaceutiques qui diffèrent par la nature de leurs modes d'acheminement vers les cellules cancéreuses^[6] (Figure 3) :

- Les radionucléides seuls comme l'iode-131, préconisé pour le traitement des maladies thyroïdiennes, est capable de s'internaliser dans les cellules par des ports ioniques membranaires ou par diffusion passive à travers la membrane cellulaire.
- Les peptides ou les anticorps. Ces composés reconnaissent spécifiquement des récepteurs membranaires des cellules tumorales et peuvent activer un mécanisme

d'internalisation cellulaire *via* la voie de l'endocytose. Il faut idéalement que ce récepteur soit uniquement exprimé à la surface des cellules cibles.

- Les nanoparticules et les microsphères, décorées à leur surface par des agents de ciblage, peuvent reconnaître les cellules tumorales. Elles peuvent être internalisées (en l'absence d'agent de ciblage) par les cellules grâce à l'effet de perméation et de rétention.

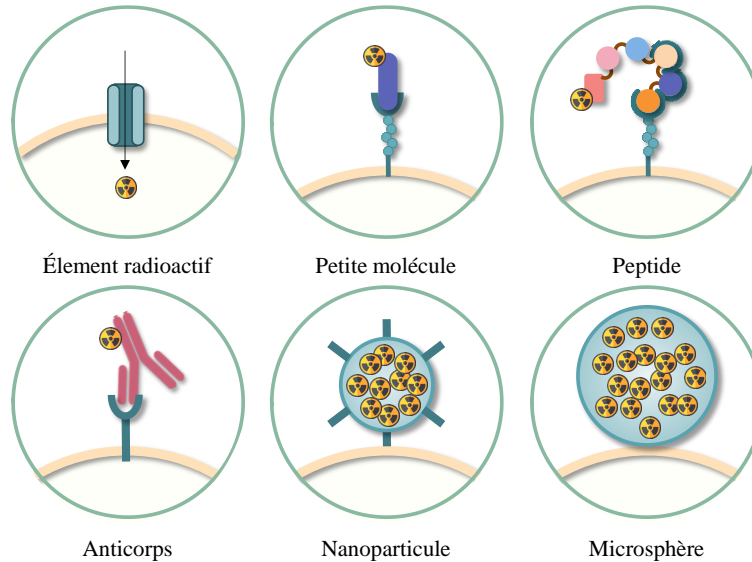


Figure 3 : Différentes stratégies de délivrance de radiopharmaceutiques

Les nouveaux radiopharmaceutiques développés aujourd'hui pour une application théranostique sont majoritairement constitués des éléments suivants (Figure 4) :

- Un **radionucléide** qui sert de sonde pour visualiser le traceur pour le diagnostic ou pour détruire les cellules dans le cas de la RTIV.
- Un **agent radiomarquable** (groupement prosthétique (GP)) ou agent chélatant bifonctionnel (ACB) qui incorpore l'isotope radioactif indispensable à l'acquisition des images. Leurs différentes natures seront décrites dans la Partie 3.2.1 du Chapitre 1.
- Un **bras espaceur** jouant également un rôle fondamental car il instaure une distance entre les agents de ciblage et radiomarquable, supprimant d'éventuelles gênes stériques pouvant diminuer l'affinité pour la cible. Par ailleurs, sa structure aide les chercheurs à moduler le caractère hydrophile ou lipophile du radiopharmaceutique mais aussi à augmenter sa biodisponibilité et faciliter sa métabolisation.^[39]
- Un **agent de ciblage** qui varie selon la pathologie présumée du patient. Ainsi, selon l'agent de ciblage utilisé, des tumeurs cancéreuses, des maladies auto-immunes^[25] ou inflammatoires,^[24] des maladies neurodégénératives^[27] et même des infections bactériennes peuvent être détectées.^[28]

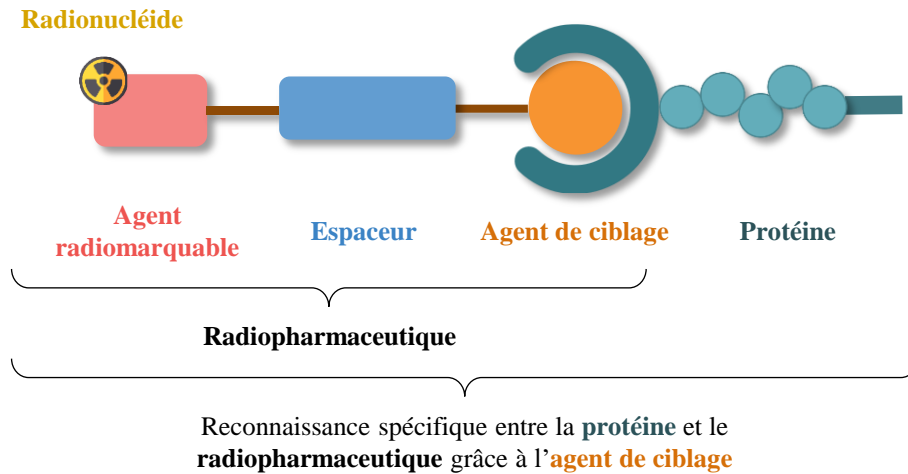


Figure 4 : Mécanisme d'action d'un radiopharmaceutique de ciblage

Plusieurs paramètres entrent en compte dans le développement du radiopharmaceutique « idéal » comme se lier spécifiquement à la cible avec une forte affinité. Le radiopharmaceutique doit également être stable sur la durée de l'examen médical et du traitement.

Un ACB est composé d'un agent radiomarquable et d'un bras espaceur qui permet une accroche avec l'agent de ciblage. Un précurseur de marquage est composé d'un ACB lié à un agent de ciblage (*i.e.*, agent radiomarquable lié à un agent ciblage *via* un espaceur). Un radiopharmaceutique correspond à un précurseur de marquage marqué par un radionucléide.

Les radiopharmaceutiques à usage diagnostique doivent montrer une fixation spécifique pour leurs cibles et le moins de captation aspécifique possible. Ils doivent être stables durant toute la durée de l'examen. Quant aux radiopharmaceutiques thérapeutiques, ils doivent également être les plus spécifiques possibles afin de ne pas montrer de toxicité envers des organes sains. Ils doivent être stables durant deux à trois temps de demi-vie ($t_{1/2}$) minimum. La dose employée et son nombre, doivent permettre de détruire les cellules cancéreuses.

2.2. Les radionucléides

2.2.1. Notions et définitions de la radioactivité

La radioactivité est un phénomène physique par lequel un radionucléide (un atome instable) se transforme en un autre isotope (stable ou instable) après désintégration du noyau radioactif. Les modes de désintégration α , β^+ , β^- et γ sont les plus courants et sont suivis par la grande majorité des éléments radioactifs (Figure 5). Il existe cependant d'autres types de désintégration comme la capture électronique ou désintégration ϵ , la fission nucléaire ou la transmutation avec éjection d'un proton ou d'un neutron. Des particules (proton, neutron ou électron), de l'énergie (photons

et énergie cinétique) et des rayonnements ionisants (α , β^+ , β^- ou γ) peuvent être émis durant la désintégration.

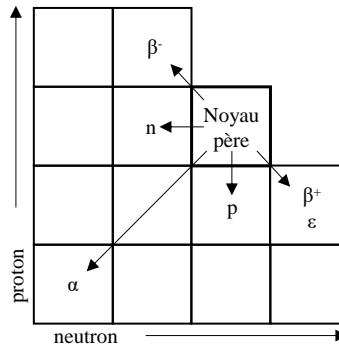


Figure 5 : Modes de désintégration nucléaire (n = neutron, p = proton)^[40]

Les sources radioactives sont caractérisées par leur activité, notée A , qui correspond au nombre de désintégrations nucléaires qu'elles subissent par unité de temps. Les radionucléides se désintègrent suivant la loi de décroissance exponentielle (E1) corrélée à la relation (E2) :

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-\lambda t} \quad (E1)$$

$$A(t) = A_0 \cdot e^{-\lambda t} \quad (E2)$$

Avec $N(t)$: nombre de radionucléides à l'instant t , N_0 : nombre de radionucléides initial (à l'instant $t = 0$), λ : constante de désintégration, $A(t)$: activité à l'instant t et A_0 : activité initiale (à l'instant $t = 0$).

La constante de désintégration λ est caractéristique de chaque radionucléide et permet de déterminer son $t_{1/2}$. Ce $t_{1/2}$ est propre à chaque radionucléide et correspond à la durée après laquelle 50% des radionucléides d'un échantillon se sont désintégrés. Il peut se calculer avec l'équation (E3) :

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda} \quad (E3)$$

On peut quantifier la radioactivité à l'aide de plusieurs unités de mesure :

- Le becquerel (Bq) est une unité qui exprime l'activité d'une source radioactive et mesure le nombre de désintégrations par seconde (1 désintégration par seconde = 1 Bq). On peut lui associer l'activité volumique qui correspond à l'activité d'une source radioactive rapportée à son volume (Bq/L).
- Le gray (Gy) mesure la dose absorbée, à savoir, la quantité de rayonnements ionisants absorbée par les tissus humains (J/kg). On lui associe le débit de dose correspondant à la dose absorbée par kg et par unité de temps (Gy/s).

- Le sievert (Sv) permet d'évaluer, d'un point de vue biologique, l'impact des rayonnements ionisants sur le corps humain, soit la dose équivalente. Ainsi, la dose équivalente est pondérée en fonction de la nature du rayonnement, de leur énergie (facteur de pondération : $\gamma < \beta < p < n < \alpha$ (p : proton, n : neutron). En pondérant cette dose équivalente par un facteur de sensibilité des tissus, on obtient la dose efficace.

2.2.2. Les moyens de production des radionucléides en médecine nucléaire

Pour une application médicale, les radionucléides sont principalement produits à l'aide :

- de réacteurs nucléaires de recherche permettant de produire des radionucléides qui décroissent par émission β^- . La majorité des radionucléides produits par un réacteur nucléaire suivent l'équation « élément de départ (n, γ) radionucléide souhaité ».^[41]
- d'un cyclotron qui est un accélérateur électromagnétique circulaire à haute fréquence de particules permettant de produire des radionucléides qui décroissent par émission β^+ ou par capture électronique (Figure 6). La majorité des radionucléides produits par un cyclotron suivent l'équation « élément de départ (p,xn) radionucléide souhaité ».^[42] Il est capable de propulser des particules chargées (protons, neutrons, électrons) à de très grandes vitesses à l'aide d'un champ électromagnétique. Ces particules hautement énergétiques (de l'ordre du MeV) vont ensuite bombarder une cible de sorte que la réaction nucléaire ait lieu, produisant ainsi le radionucléide souhaité. Les cibles peuvent être de nature solide, liquide ou gazeuse.
- d'un synchrotron qui est un autre type d'accélérateur de particules que le cyclotron. Il accélère des protons qui vont bombarder sur une source solide plus ou moins épaisse afin de produire les radionucléides d'intérêts. Il est utilisé pour la production de terbium-149/152/155 par spallation de feuille de tantale.^[43-45]
- de générateurs, qui sont des sources de radionucléides fils produits à partir de radionucléides pères (Figure 6). Les plus utilisés en médecine nucléaire sont les générateurs $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ et $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$.^[46] Ils fonctionnent sur le principe de la chromatographie ionique. L'élément parent produit, à l'aide d'un cyclotron ou d'un réacteur nucléaire, est adsorbé sur une phase stationnaire et se désintègre en l'élément fils d'intérêt (Tableau 3). Pour le récupérer, une phase mobile vient éluer l'élément fils en passant au travers de la phase stationnaire.

Tableau 3 : Caractéristiques des deux générateurs les plus employés en médecine nucléaire

	Générateur $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	Générateur $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$
Élément père	Molybdenum-99	Germanium-68
Élément fils	Technetium-99m	Gallium-68
Phase stationnaire	Al_2O_3	SnO_2
Phase mobile	HCl ou NaCl	HCl

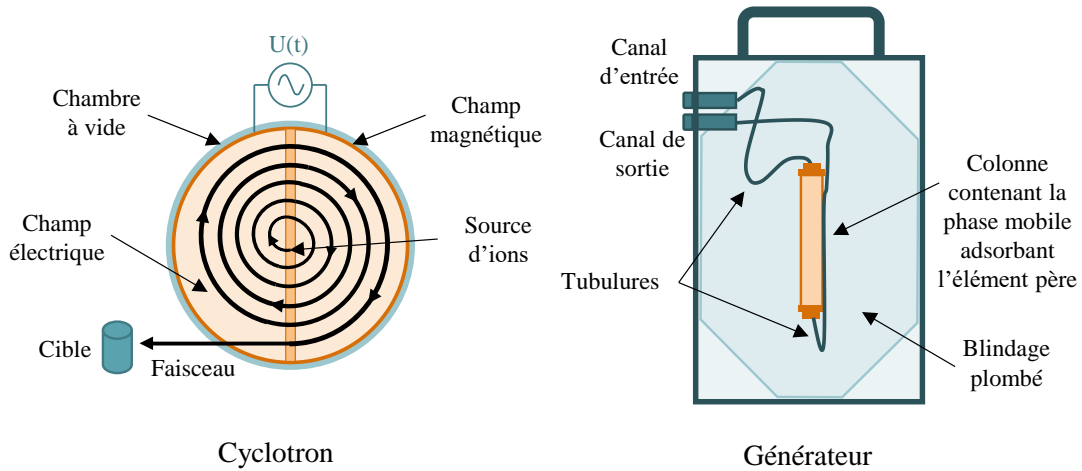


Figure 6 : Principes de fonctionnement d'un cyclotron et d'un générateur

2.2.3. Les types de désintégrations

Dans leur revue sur les terres rares employés en médecine nucléaire, Orvig et Kostelnik présentent le tableau périodique des éléments avec un code couleur en fonction de l'application de chaque radioélément en médecine nucléaire.^[47] De nombreux métaux de transition, halogènes, non-métaux, alcalins et alcalino-terreux possèdent des caractéristiques intéressantes pour l'imagerie TEP (Figure 7). Le nombre d'éléments ayant les caractéristiques nécessaires pour l'imagerie TEMP sont quant à eux limités. Seulement 9 éléments peuvent être employés en α -thérapie tandis qu'il existe de nombreux métaux de transition et lanthanides intéressants pour la β -thérapie. Il est à noter que l'élément le plus versatile est le terbium puisqu'avec 4 radionucléides différents (terbium-149/152/155/161), l'ensemble des techniques de médecine nucléaire peuvent être balayées. Parmi tous ces éléments, peu sont étudiés étant donné la difficulté de leur production et donc de leurs faibles disponibilités pour la recherche et les services de médecine nucléaire.

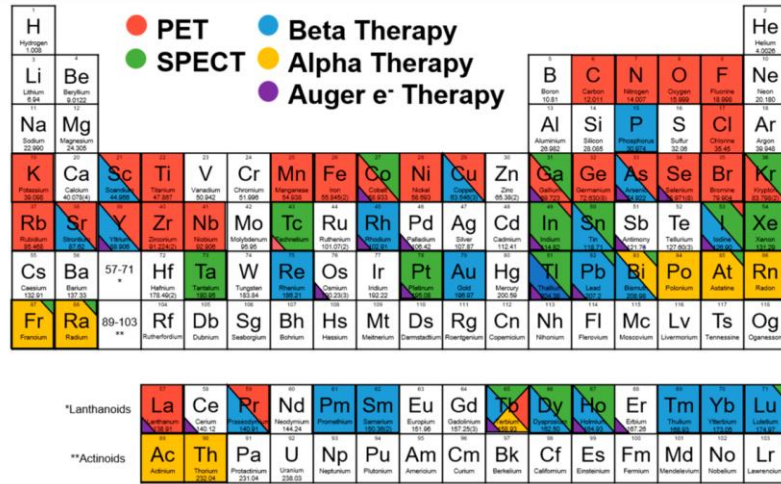


Figure 7 : Tableau périodique des éléments ayant des propriétés physiques compatibles avec une application en médecine nucléaire. Reproduit de [47] avec permission de American Chemical Society, Copyright 2019

Puisque cette thèse s'intéresse à l'imagerie TEP et la RTIV, seuls les modes de désintégration α , β^+ et β^- seront décrits dans ce chapitre.

2.2.3.1. Les émetteurs de positons (β^+)

Les émetteurs de positons sont des radioisotopes ayant un noyau comportant un excès de protons par rapport à leurs neutrons, leur conférant ainsi leur instabilité et leur radioactivité. Ils peuvent retourner dans un état d'énergie plus stable lors d'une désintégration de type β au cours de laquelle un proton (p^+) est converti en un neutron (n). Cette transformation émet alors un positon β^+ et un neutrino (ν_e) d'après l'équation (E4) :

$$p^+ \rightarrow n + \beta^+ + \nu_e \quad (E4)$$

Il est à noter qu'un positon est un électron possédant une charge positive, d'où son autre nom d'antiélectron. Ce type de désintégration est souvent associé à une désintégration ϵ . Les émetteurs de positons les plus utilisés en imagerie TEP sont le fluor-18, le carbone-11 et le gallium-68, mais d'autres radionucléides sont également utilisés comme l'azote-13, l'oxygène-15, le scandium-44, le cobalt-55, le cuivre-64, le zirconium-89 ou le terbium-152. Ils possèdent chacun une énergie, un $t_{1/2}$ et un mode de production qui leurs sont propres (Tableau 4). Le zirconium-89, possédant un $t_{1/2}$ relativement long, est utilisé pour le radiomarquage d'anticorps ayant un temps de distribution dans l'organisme plus lent que les peptides.

Tableau 4 : Caractéristiques physicochimiques des radionucléides utilisés en imagerie TEP

Isotope	t _{1/2}	Mode de désintégration	E _{max} (keV)	Production	Nombre d'oxydation	Nombre de coordination	Réf.
¹¹ C	20,3 min	β ⁺ (99,79%) CE (0,21%)	970	¹⁴ N(p,α) ¹¹ C	0	NA	[48]
¹³ N	9,97 min	β ⁺ (100%)	1200	¹⁶ O(p,α) ¹³ N	-1	NA	[49]
¹⁵ O	124 s	β ⁺ (100%)	1740	¹⁴ N(d,n) ¹⁵ O	0	NA	[50]
¹⁸ F Al ¹⁸ F	109,8 min	β ⁺ (95%) CE (3%)	β ⁺ , 635 γ, 1655	¹⁸ O(p,n) ¹⁸ F	1- 2+	NA 6	[51,52]
⁴⁴ Sc	4,04 h	β ⁺ (94%) CE (6%)	γ, 1157 β ⁺ , 632	Générateur ⁴⁴ Ti/ ⁴⁴ Sc ⁴⁴ Ca(p,xn) ⁴⁴ Sc ⁴⁴ Ca(p,n) ⁴⁴ Sc	3+	8-9	[42,53]
⁵⁵ Co	17,5 h	β ⁺ (76%)	β ⁺ , 570	⁵⁵ Ni(p,α) ⁵⁵ Co ⁵⁶ Fe(p,n) ⁵⁵ Co ⁵⁴ Fe(d,n) ⁵⁵ Co	2+	6	[54]
⁶⁴ Cu	12,7 h	β ⁺ (19%) CE (41%) β ⁻ (40%)	β ⁺ , 653	⁶⁴ Ni(p,n) ⁶⁴ Cu	2+	6	[55]
⁶⁸ Ga	67,7 min	β ⁺ (89%) CE (11%)	β ⁺ , 830	Générateur ⁶⁸ Ge/ ⁶⁸ Ga ⁶⁸ Zn(p,n) ⁶⁸ Ga	3+	6	[42,46]
⁸⁹ Zr	78,4 h	β ⁺ (23%) CE (77%)	β ⁺ , 890	⁸⁹ Y(p,n) ⁸⁹ Zr	4+	8	[56,57]
¹⁵² Tb	17,5 h	β ⁺ (17%)	β ⁺ , 1080	Spallation de feuille de Ta ¹⁵⁵ Gb(p,n) ¹⁵⁵ Tb ¹⁵⁹ Tb(p,5n) ¹⁵⁵ Dy → ¹⁵⁵ Tb	3+	6-9	[43]

CE : Capture électronique ; n : Neutron ; p : Proton ; d : Deuteron ; α : Particule alpha ; xn : Un ou plusieurs neutrons ; NA : Non applicable

Le fluor-18 est majoritairement produit par un cyclotron par l'équation suivante (E5) :



L'équation (E5) peut être écrite de manière réduite par ¹⁸O(p,n)¹⁸F. Ainsi, une source d'eau enrichie ¹⁸O est bombardée dans le cyclotron par une faisceau de protons hautement énergétiques et produit du ¹⁸F ainsi qu'un neutron comme sous-produit de la réaction nucléaire. Le fluor-18 est récupéré sous forme d'anion [¹⁸F]fluorure dans la solution d'eau enrichie. Il est également possible de produire du fluor-18 à l'aide d'une source de néon selon l'équation ²⁰Ne(d,α)¹⁸F, permettant l'obtention de [¹⁸F]F₂ gazeux.^[58]

Le gallium-68 est un émetteur de positons utilisé en imagerie TEP et il est produit à l'aide d'un générateur ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga.^[46] Le germanium-68 est un radionucléide se désintégrant par capture électronique en produisant un atome instable de gallium-68. La capture électronique correspond à un mode de désintégration des radionucléides déficitaires en neutrons, où un proton du noyau

va absorber un électron d'une de ses couches électroniques pour devenir un neutron. Après capture électronique, un neutrino est émis pour conserver le nombre atomique A d'après l'équation (E6) :



Dû au $t_{1/2}$ long du germanium-68 (271 jours), les générateurs permettent une production de gallium-68 sur une période de 6-12 mois. Du fait de la grande disponibilité dans le commerce de ces générateurs et des propriétés physiques intéressantes du gallium-68 ($t_{1/2}$: 67,7 min), le nombre de ${}^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceutiques à l'étude a augmenté de manière exponentielle.

Tableau 5 : Comparaison du gallium-68 et fluor-18 pour leurs utilisations en imagerie TEP

Avantages	Inconvénients
Fluor-18	
Production par cyclotron à grande échelle, permettant la réalisation de nombreux d'examens par lot	Coûts d'installation, de fonctionnement et de maintenance d'un cyclotron élevés
Possibilité d'acheminement vers des centres hospitaliers proches ne possédant pas de cyclotrons	Production uniquement <i>via</i> un cyclotron
Multiple possibilité de radiomarquage : radiomarquage direct des agents de ciblage ou par complexation Al^{18}F , radiomarquage indirect <i>via</i> un GP	Optimisation des radiosynthèses complexes. Rendement radiochimique (RRC) faible (1-50%) et temps de synthèse élevé (2-4 h) pour un radiomarquage par formation de liaisons covalentes
Fort intérêt en théranostic avec la méthode de radiomarquage Al^{18}F Très bonne résolution spatiale	Utilisation en théranostic nécessitant l'emploi de précurseurs différents par rapport aux précurseurs thérapeutiques si marquage direct des biomolécules ou <i>via</i> GP
Gallium-68	
Radiochimie de complexation permettant de meilleurs RRC pour un protocole de synthèse plus simple et plus court	Rendement positronique inférieur et énergie positronique supérieure du gallium-68 impactant la qualité de l'image et, par conséquent, la qualité du diagnostic, Plus faible résolution spatiale (2,4 vs. 1,4 mm) induisant un bruit de fond
Facilité de production à l'aide de générateurs. Installation ne nécessitant pas de grosses infrastructures	Disponibilité, coût des générateurs élevé, courte durée d'utilisation par rapport à un cyclotron
Possibilité de production par un cyclotron ou un générateur selon les équipements sur site	Diminution de la performance des générateurs ${}^{68}\text{Ge}/{}^{68}\text{Ga}$ au cours de leur utilisation
Fort intérêt en théranostic puisque le gallium peut être complexé dans les mêmes cages que les émetteurs α et β^- pour la thérapie (<i>i.e.</i> , DOTA)	

De même, de par leur portabilité, leur coût accessible et leur facilité d'utilisation, de nombreux services de médecine nucléaire se sont dotés de ces générateurs ainsi que les laboratoires de recherche en radiochimie, permettant une démocratisation progressive de l'utilisation des ^{68}Ga -radiopharmaceutiques pour le diagnostic par imagerie TEP.^[59] Il est également possible de produire du gallium-68 à l'aide d'un cyclotron et d'une source de zinc-68 par la réaction nucléaire suivante $^{68}\text{Zn}(p,n)^{68}\text{Ga}$.

Le fluor-18 et le gallium-68 sont ainsi tous deux utilisés en routine clinique et présentent des avantages et inconvénients l'un par rapport à l'autre (Tableau 5).^[60]

2.2.3.2. Les émetteurs alpha (α) et bêta moins (β^-)

Les émetteurs α se désintègrent en produisant un noyau d'hélium (He) composé de deux protons et de deux neutrons. Cette désintégration peut être vue comme une fission nucléaire, un noyau père X produisant deux noyaux fils, Y et He, selon l'équation (E7) :



Avec A : Nombre de masse (protons et neutrons), et Z : Numéro atomique

Ces émetteurs possèdent une pénétration tissulaire très limitée (40 – 100 μm), due à une masse relativement importante, réduisant fortement la vitesse de la particule. Ces rayonnements sont très énergétiques (5 – 9 MeV) et possèdent un transfert linéaire d'énergie de l'ordre de 80 keV/ μm . Ils peuvent exciter et ioniser la matière environnante et ainsi causer d'important dégâts au niveau de l'ADN.^[61]

Les émetteurs β^- se désintègrent en produisant un électron. Ils peuvent retourner dans un état d'énergie plus stable lors d'une désintégration de type β au cours de laquelle un neutron n est converti en un proton p^+ . Cette transformation émet alors un électron e^- et un neutrino ν_e d'après l'équation (E8) :



Ces émetteurs sont moins énergétiques que les rayonnements α (transfert d'énergie linéaire de 0,2 keV/ μm) mais ionisent également la manière environnante. L'énergie émise lors d'une désintégration est comprise entre 50 et 2300 keV. Le parcours dans la matière de ce rayonnement est plus élevé que pour les particules α (0,05 – 12 mm).^[61] Ainsi les émetteurs β^- peuvent, comme pour les émetteurs α , être employés en thérapie.

Les émetteurs α et β^- les plus utilisés en imagerie RTIV sont l'actinium-225 et le lutécium-177 mais on retrouve également l'utilisation du cuivre-67, du scandium-47, de l'yttrium-91, du terbium-149/161 et du rhénium-188. Ils possèdent chacun une énergie, un $t_{1/2}$ et un mode de production qui leurs sont propres (Tableau 6).

Tableau 6 : Caractéristiques physicochimiques des radionucléides utilisés en RTIV

Isotope	$t_{1/2}$	Mode de désintégration	E (keV)	Production	Nombre d'oxydation	Nombre de coordination	Réf.
⁴⁷ Sc	3,35 j	β^- (100%) γ	β^- , 441, 600 γ , 159	⁴⁷ Ti(n,p) ⁴⁷ Sc ⁴⁶ Ca(n, γ) ⁴⁷ Ca \rightarrow ⁴⁷ Sc	3+	8-9	[42,53]
⁶⁷ Cu	61,8 h	β^- (100%)	β^- , 395, 484, 577	⁶⁷ Zn (n,p) ⁶⁷ Cu ⁶⁸ Zn (p,2p) ⁶⁷ Cu ⁶⁷ Zn(γ ,p) ⁶⁷ Cu	2+	6	[57,62,63]
⁹⁰ Y	2,67 j	β^- (100%)	β^- , 2280	⁹⁰ Zr(n,p) ⁹⁰ Y Générateur ⁹⁰ Sr/ ⁹⁰ Y	3+	8-9	[64-66]
¹⁴⁹ Tb	4,12 h	α (17%) β^+ (7%) CE (76%)	α , 3967 β^+ , 730	Spallation de feuille de Ta ¹⁵² Gd(p,4n) ¹⁴⁹ Tb ¹⁴² Nb(¹² C,5n) ¹⁴⁹ Dy \rightarrow ¹⁴⁹ Tb	3+	6-9	[43,67]
¹⁶¹ Tb	6,89 j	β^- (100%) γ	β^- , 154 γ , 25, 49, 57, 74	¹⁶⁰ Gb(n, γ) ¹⁶¹ Gd \rightarrow ¹⁶¹ Tb	3+	6-9	[42,43]
¹⁷⁷ Lu	6,65 j	β^- (100%) γ	β^- , 177,385, 498 γ , 113, 208	¹⁷⁶ Lu(n, γ) ¹⁷⁷ Lu ¹⁷⁶ Yb(n, γ) ¹⁷⁷ Yb \rightarrow ¹⁷⁷ Lu	3+	6-9	[42,65]
¹⁸⁸ Re	16,9 h	β^- (100%) γ	β^- , 2120 γ , 155	Générateur ¹⁸⁸ W/ ¹⁸⁸ Re ¹⁸⁷ Re(n, γ) ¹⁸⁸ Re	1+	6-8	[68]
²¹¹ At	7,2 h	α (41,8%) CE (58,2%)	5869	²⁰⁹ Bi(α ,2n) ²¹¹ At	1-	-	[57,61]
²¹² Bi	61 min	α (36,0%) β^- (64,0%)	α 6050	Générateur ²²⁴ Ra/ ²¹² Bi	3+	7-9	[57,61]
²¹³ Bi	46 min	α (2,2%) β^- (97,8%)	5549	Générateur ²²⁵ Ac	3+	7-9	[57,61]
²²⁴ Ra	3,36 j	α (95%) γ (4,1%)	5700	Générateur ²²⁸ Th/ ²²⁴ Ra	3+	6-9	[57,61]
²²⁵ Ac	9,9 j	α (99%) γ (1%)	α 5637 γ 241	Générateur ²²⁹ Th/ ²²⁵ Ac	3+	6-9	[57,61]

CE : Capture électronique ; n : Neutron ; p : Proton ; γ : Particule gamma

Le lutécium-177 est un élément du groupe des lanthanides, très souvent utilisé en RTIV en raison de son émission β et de son rayonnement γ qui permettent un suivi efficace du traitement par imagerie TEMP. Son $t_{1/2}$ de 6,65 jours lui confère des capacités thérapeutiques sur un temps relativement long, comparé à d'autres radionucléides. Il peut être produit à l'aide de deux voies indépendantes de production, la voie de production directe utilisant la réaction nucléaire ¹⁷⁶Lu(n, γ)¹⁷⁷Lu ou la voie de production indirecte utilisant la réaction nucléaire ¹⁷⁶Yb(n, γ)¹⁷⁷Yb

→ ^{177}Lu (Figure 8).^[42,69] Dans la voie directe de production, le lutécium-176 se désintègre par capture de neutrons pour donner du lutécium-177 avec des rendements de production et d'activité spécifique élevés. La voie de production indirecte consiste en la production d'ytterbium-177 à partir d'une cible d'ytterbium-176 enrichie se désintégrant par capture de neutrons. L'ytterbium-177 se désintègre dans un second temps en lutécium-177 qui doit ensuite être séparé de la cible par différents procédés comme l'extraction à l'aide d'un solvant ou par chromatographie. La production de lutécium-177 par voie indirecte a un coût plus élevé que par voie directe car elle implique l'utilisation d'une cible enrichie, des volumes d'irradiation plus importants, des temps d'irradiation plus longs et la nécessité de capacités de traitement radiochimique élaborées.^[70]

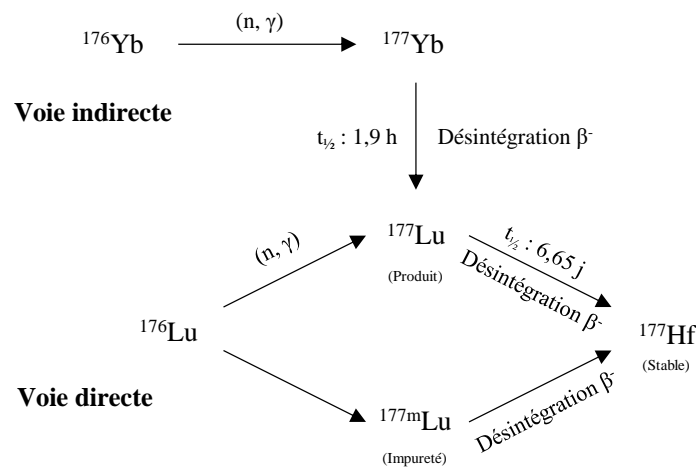


Figure 8 : Voies de production du lutécium-177^[70]

3. Le radiomarquage des agents de ciblage, cas des biomolécules

Il existe deux grands types de radiochimie, en fonction de la nature des radionucléides. Les radionucléides, de types halogènes (*i.e.*, fluor-18, iode-123/131) ou de types autres non-métaux comme le carbone-11, l'azote-13 ou l'oxygène-15, peuvent être fixés sur un précurseur de marquage par la formation de liaisons covalentes tandis que les radiométaux (*i.e.*, gallium-68, cuivre-64, lutécium-177), doivent être complexés à l'aide d'agents chélatants. Il existe deux stratégies de radiomarquage direct ou indirect, qui dépendent du type de radionucléides (Figure 9). Le radiomarquage direct consiste à fixer le radionucléide sur le précurseur de marquage et constitue la dernière étape de la radiosynthèse. Le radiomarquage indirect consiste au marquage d'un agent radiomarquable puis de son couplage à un agent de ciblage. Le radiomarquage direct

est utilisé pour le radiomarquage de tous types de radionucléides tandis que le radiomarquage indirect est réservé aux radiohalogènes ou aux autres non-métaux *via* l'emploi de GP.

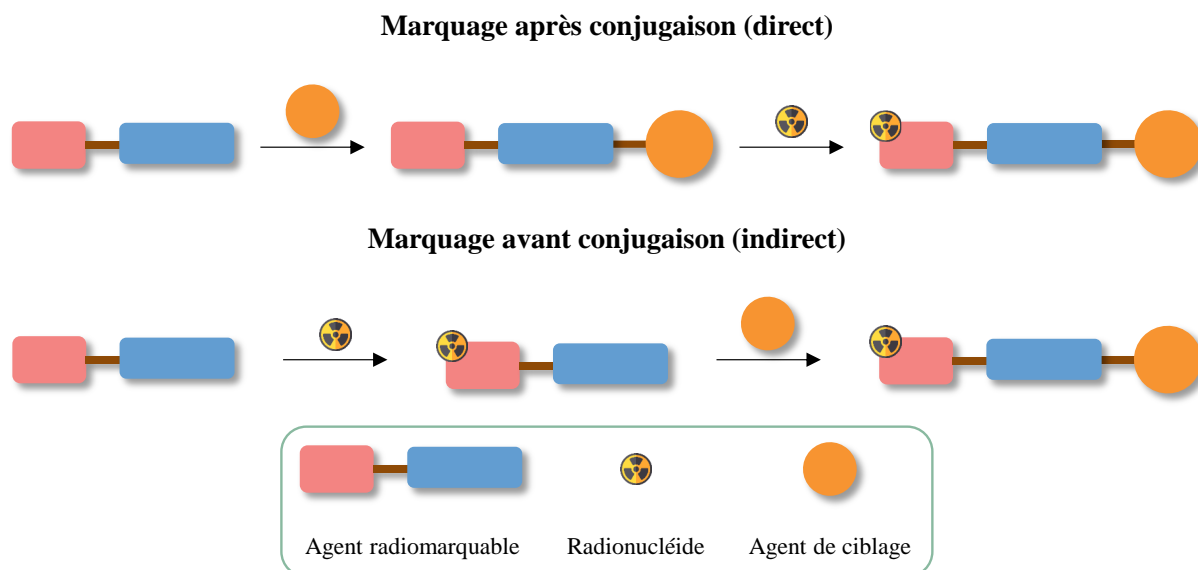


Figure 9 : Stratégies de radiomarquage direct et indirect

3.1. Le radiomarquage au fluor-18

3.1.1. Principe de la radiofluoration

Le fluor-18 est un halogène, ce qui implique qu'il est incorporé sur des agents de ciblage par une liaison covalente sur différents atomes tels que le carbone, le bore ou le silicium. De nombreuses méthodes de radiomarquage des biomolécules au fluor-18 ont été développées au fil des décennies, notamment le radiomarquage direct et indirect par l'emploi de GP. Récemment, des nouvelles méthodes de radiomarquage par chimie de complexation au fluor-18 pour le marquage des biomolécules ont été développées *via* la stratégie aluminium-fluor-18.

Dans le cas des liaisons C-F, la radiofluoration nucléophile est la principale réaction employée, notamment la fluoration par substitution nucléophile (S_N) aliphatique et aromatique (S_{NAr}).^[58] Il existe des méthodes de radiomarquage par échange isotopique ou par fluoration électrophile, mais leurs utilisations restent limitées. La radiofluoration nucléophile utilise l'ion [^{18}F]fluorure comme nucléophile, mais celui-ci n'est pas un bon nucléophile, il est donc nécessaire de l'activer afin d'augmenter sa réactivité.

Deux méthodes principalement utilisées pour activer les fluorures sont :

- l'utilisation de kryptans, des cages chélatantes complexant l'ion potassium K^+ pour exacerber la réactivité du contre-ion [^{18}F]fluorure. Les kryptans les plus utilisés sont le

Kryptofix[®]222 (K₂₂₂) et l'éther couronne (18-crown-6) (1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadécane) (Figure 10A),

- l'utilisation d'un contre-ion ayant un environnement stérique important tel que le tétrabutylammonium. Cet agent est essentiellement utilisé dans le cadre de la radiofluoration par des catalyseurs de transfert de phase.

Le principe de la radiofluoration par réaction de S_N est résumé dans la Figure 10B.

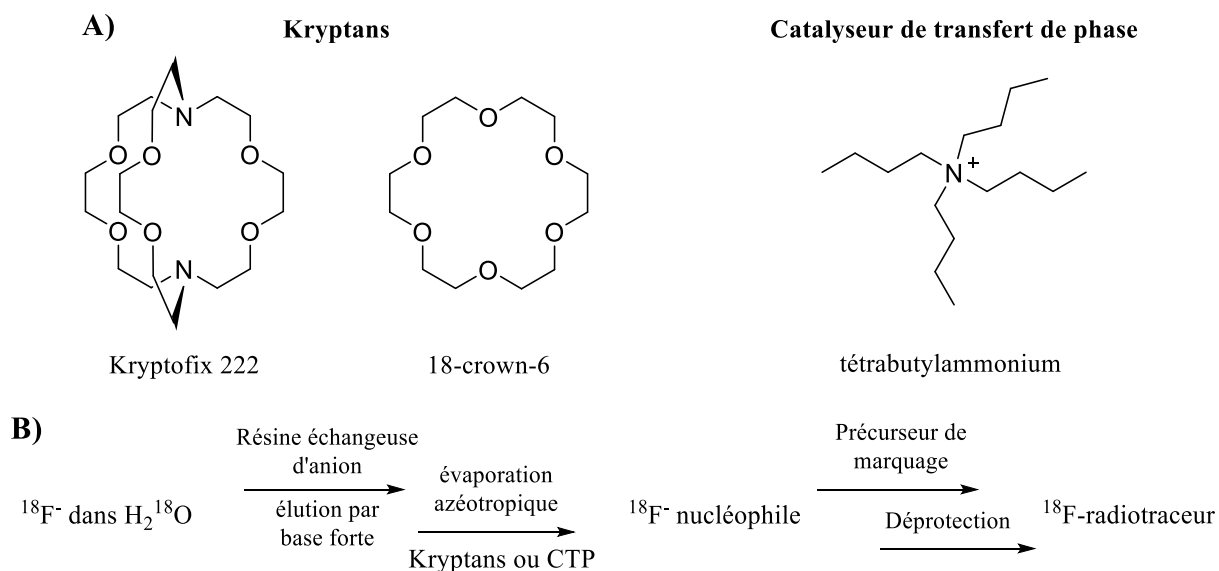


Figure 10 : **A)** Exemples de catalyseurs pour l'activation du fluorure. **B)** Principe de la radiofluoration par S_N (CTP : catalyseur de transfert de phase)

La radiofluoration nucléophile aliphatique consiste en une réaction de type S_N2 avec substitution d'un groupe partant, le plus souvent un sulfonate (*e.g.*, triflate, tosylate, mésylate), par un ion [¹⁸F]fluorure activé. Cette stratégie nécessite la protection des groupements fonctionnels nucléophiles présents sur la molécule qui pourraient entrer en compétition avec l'ion [¹⁸F]fluorure (*e.g.*, un acide, un alcool, une amine). Des étapes de déprotection supplémentaires sont donc nécessaires ce qui augmente le temps de radiosynthèse.

Le [¹⁸F]FDG est synthétisé par cette méthode de radiofluoration par S_N2. Il est synthétisé en 30 minutes avec un RRC supérieur à 50% corrigé de la décroissance (cd) par S_N du groupe partant triflate présent sur le précurseur triflate de mannose peracétylé, suivie d'une étape de déprotection des fonctions alcool en milieu basique (Schéma 1).

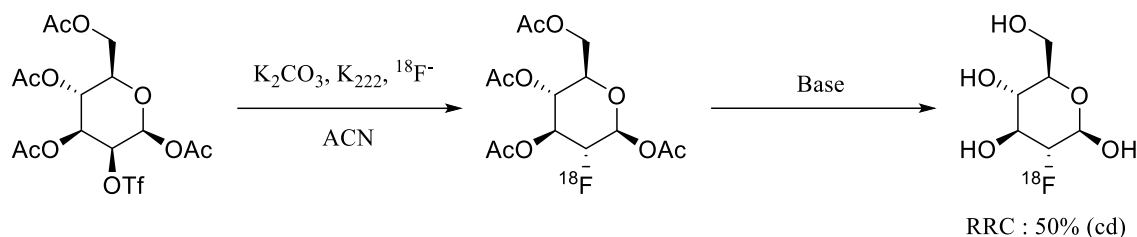


Schéma 1 : Radiosynthèse du [¹⁸F]FDG^[16,71]

La radiofluoruration par S_NAr est également très répandue. Elle nécessite l'utilisation de composés aromatiques activés par des groupements attracteurs d'électrons comme des groupements nitro, cyano ou carbonyle en position ortho- ou para- en fonction du site de radiofluoruration souhaité (3-NO₂ < 4-Ac < 4-CHO < 4-CN ≈ 4-CF₃ < 4-NO₂). Un chauffage important est nécessaire (120 – 180°C dans le DMSO) contrairement aux S_N2. La synthèse du [¹⁸F]F-DOPA par S_NAr, proposé par l'équipe de Lemaire, est réalisée en 4 étapes avec un RRC de l'ordre de 36% (cd) et un excès énantiérique >97% (Schéma 2).^[72,73]

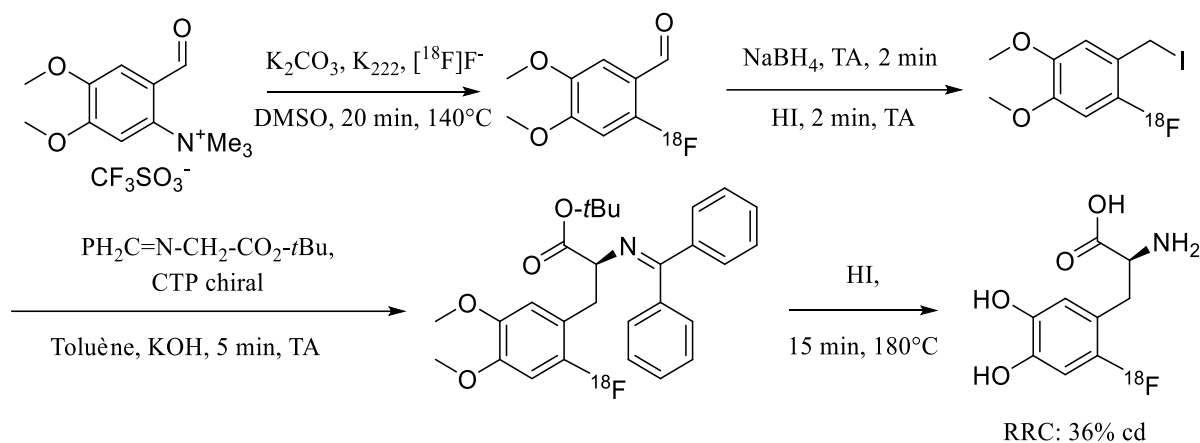


Schéma 2 : Synthèse du [¹⁸F]DOPA par S_NAr^[72,73]

3.1.2. Le radiomarquage direct des agents de ciblage

Certaines biomolécules peuvent être radiomarquées directement au fluor-18 mais les conditions opératoires utilisées pour le radiomarquage nécessitant des conditions drastiques (température élevée, pH très acide), elles ne sont pas compatibles avec tous les agents de ciblage. Cette stratégie possède l'avantage de réaliser des radiofluorations rapides et de rendre leurs automatisations possibles. L'exemple suivant, utilisé pour le diagnostic du cancer de l'ovaire, montre le radiomarquage au fluor-18 de l'acide folique (AF) à 140°C, suivi d'une déprotection des groupements protecteurs en milieu acide (Schéma 3).^[74] Le RRC obtenu est de 4% (cd) pour un temps de radiosynthèse de 80 min.

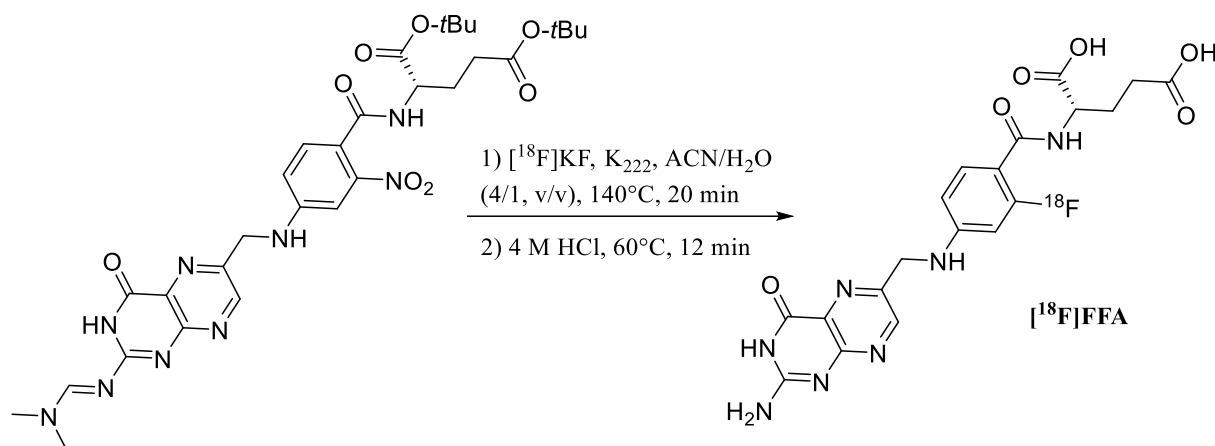


Schéma 3 : Radiofluoration de l'acide folique par S_NAr ^[74]

3.1.3. Le radiomarquage indirect par l'emploi de groupements prosthétiques (GP)

Une seconde stratégie de radiomarquage, dite indirecte, a permis le développement d'un large panel de radiotraceurs. Elle consiste à radiomarquer une petite molécule (GP) insensible aux conditions de radiomarquage puis de la coupler à une biomolécule. Le GP doit pouvoir être radiomarqué avec des RRC élevés (25 – 90%) en une seule étape et posséder une fonction spécifique pour le couplage à la biomolécule. Les réactions de bioconjugaison sont réalisées en conditions douces (Chapitre 1, Partie 4.). Cependant, certaines de ces réactions de bioconjugaison nécessitent une modification chimique de la biomolécule, alors que d'autres permettent l'utilisation d'une biomolécule naturelle.

Les GP sont synthétisés à l'aide des différents types de radiofluoration présentés ci-dessus (Chapitre 1, Partie 3.1.). La Figure 11 présente les principaux GP employés en radiochimie du fluor-18.^[51,71,75,76] Les synthèses de certains GP ont été développées sur automate de synthèse, ce qui a contribué à leurs utilisations pour la recherche clinique. Nous pouvons, par exemple, citer le $[^{18}F]FBA$ ($[^{18}F]$ fluorobenzaldéhyde) ou le $[^{18}F]FA$ ($[^{18}F]$ fluoroaldéhyde).^[77-79] Le radiomarquage indirect présente l'inconvénient de nécessiter 2 étapes chimiques (radiomarquage et bioconjugaison), ce qui se traduit par un RRC plutôt faible (1 – 50%) et des temps de radiosynthèse longs (2 – 4 h) dus à la nécessité d'avoir des étapes de purification par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC).

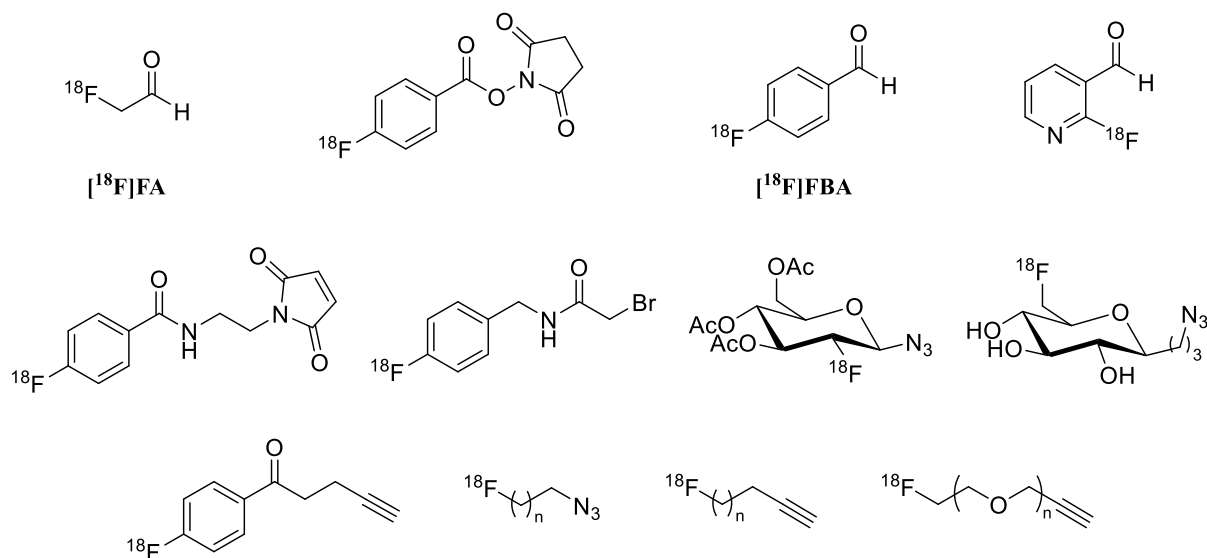


Figure 11 : Liste des principaux GP radiomarqués au fluor-18 utilisés pour le radiomarquage d'agents de ciblage

Cette stratégie est bien adaptée aux biomolécules mais les temps de radiosynthèse trop longs et les RRC trop faibles poussent sans cesse les équipes de recherche à optimiser ces stratégies par l'emploi, par exemple, de catalyseurs. Avec l'émergence de nouveaux radiométaux et l'augmentation de leurs disponibilités, de nouveaux radiopharmaceutiques se développent. Nous notons ainsi l'émergence du radiomarquage direct par complexation des radiométaux. Comparé à celle utilisant des GP, cette stratégie nécessite une seule étape ce qui diminue fortement les temps de radiosynthèse. Cependant, l'emploi d'ACB est indispensable pour cette stratégie.

3.2. Le radiomarquage par complexation de radiométaux

3.2.1. Les chélateurs

Les agents chélatants ont la capacité de complexer différents éléments comme des métaux. De nombreux agents ont été développés et sont catégorisés comme chélateurs cycliques et acycliques. Ils doivent pouvoir former des complexes suffisamment stables avec le radiométal d'intérêt pour produire un radioconjugué stable.

La complexation permet un radiomarquage rapide des précurseurs de marquage et ne nécessite pas d'étapes de protection/déprotection. Les radiocomplexations peuvent également être réalisées dans des tampons aqueux. Elles sont réalisées à des températures comprises entre 30 et 105°C. Cette stratégie comporte donc de nombreux avantages par rapport au radiomarquage

par formation de liaisons covalentes comme un temps de radiosynthèse plus court (1 h pour la radiosynthèse, suivi des tests contrôle-qualité), une facilité d'automatisation du radiomarquage et l'utilisation d'une faible quantité de précurseurs (20 µg contre une dizaine de mg pour une radiofluoration en mode manuel).

Au fil des décennies, de nombreux agents chélatants ont été développés afin d'élargir le panel de radionucléides pouvant être utilisés en imagerie ainsi qu'en RTIV. Ces agents chélatants ont été évalués pour la plupart, pour la complexation de différents radiométaux afin de les utiliser dans une approche théranostique. La majorité des agents chélatants développés pour le radiomarquage comportent des atomes donneurs électronégatifs (majoritairement l'oxygène et l'azote) permettant la formation d'une liaison de coordination avec un métal.

Les agents chélatants peuvent être dérivés en ajoutant une fonction permettant leur couplage à un agent de ciblage par bioconjugaison (Chapitre 1, Partie 4) formant ainsi des ACB utilisables pour radiomarquer des agents de ciblage. Ainsi, différents agents de ciblage peuvent être couplés à un même ACB afin de moduler le choix du couple radionucléides/agents de ciblage en fonction de la pathologie à diagnostiquer et traiter. Les bras espaceurs peuvent être fixés sur le squelette carboné de l'agent chélatant comme l'ACB de l'Alfatide II (maintien du nombre de sites de coordination à 6) ou sur l'un des sites de coordination permettant la formation de liaisons covalentes comme l'ACB du PSMA-617 (passage de 8 à 7 sites de coordination). Dans ce dernier cas, l'ACB possède un site de coordination en moins, ce qui peut impacter négativement la stabilité des complexes formés (Figure 12).

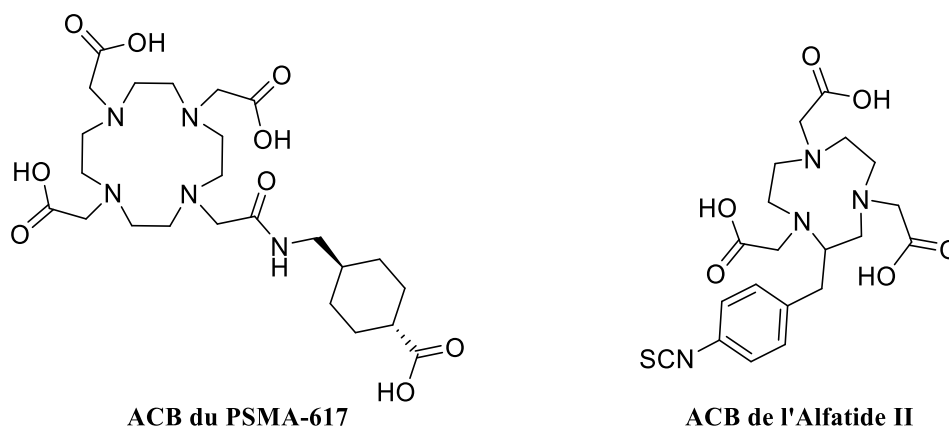


Figure 12 : Sites de fixation des bras espaceurs sur les ACB du PSMA-617 et Alfatide II

3.2.1.1. Les chélatants acycliques

Les chélatants acycliques les plus répandus en radiochimie sont l'acide *N,N'*-bis(2-hydroxy-5-(carboxyéthyl)benzyl) éthylènediamine-*N,N'*-diacétique (HBED-CC) présent dans le [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11,^[34] le DTPA présent dans le [¹¹¹In]In-FolateScan,^[80] utilisés en routine clinique ou encore la deferoxamine (DFO) permettant le radiomarquage d'anticorps au zirconium-89.^[81] Les chélatants acycliques possèdent une grande flexibilité permettant un radiomarquage à température modérée (25-60°C). Cependant, cette flexibilité peut jouer en la défaveur du radioconjugué puisque les complexes obtenus peuvent être moins stables *in vivo* que ceux avec des chélatants cycliques (Figure 13). D'autres agents chélatants acycliques ont également été développés mais sont beaucoup moins répandus que les trois précédemment cités. Le chélatant CHX-A''-DTPA (acide *N*-(2-aminoéthyl)-*trans*-1,2-diaminocyclohexane-*N,N',N''*-pentaacétique) permet l'obtention de complexes stables avec des radionucléides ayant des diamètres importants et ayant besoin d'un nombre de sites de coordination élevé comme l'indium-111, le lutécium-177 ou l'yttrium-90. Les agents chélatants H₂dedpa 1,2-[[6-(carboxy)-pyridin-2-yl]méthylamino]éthane) et H₄octapa (acide *N,N'*-bis(6-carboxy-2-pyridylméthyl)éthylènediamine-*N,N'*-diacétique) sont basés sur des squelettes carbonés très similaires et permettent d'obtenir des complexes stables avec respectivement le gallium-68 et le cuivre-64 pour l'un et le lutécium-177 et l'indium-111 pour l'autre. En effet, H₂dedpa possède 6 sites de coordination tandis que H₄octapa en possède 8, permettant la complexation de radiométaux différents.

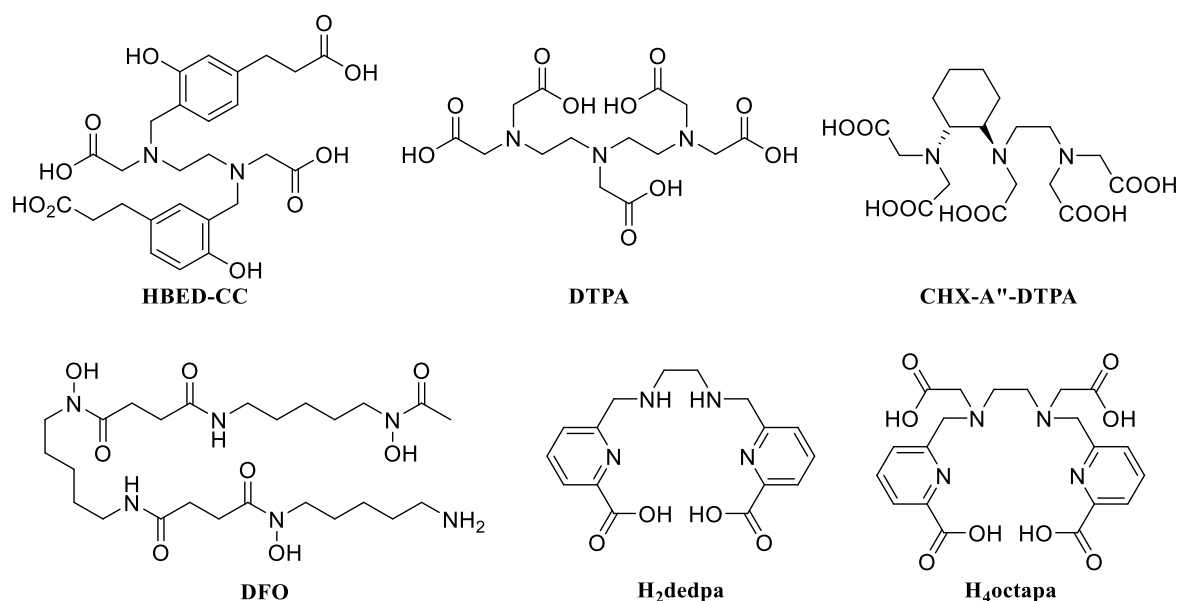


Figure 13 : Structures chimiques des chélatants acycliques utilisés pour la synthèse de radioconjugués.

Le Tableau 7, adapté de la revue bibliographique de Price et Orvig, décrit le nombre de liaisons de coordination pouvant être réalisées avec un agent chélatant ainsi que les radionucléides les plus adaptés pour chaque agent.^[64]

Tableau 7 : Propriétés de complexation de chélatants acycliques pour certains radiométaux

ACB	Donneurs	Liaisons de coordination	Radio métal	Stabilité ^a	Constante de stabilité ^b	Conditions de radiomarquage
HBED-CC	N ₂ O ₄	6	Al ¹⁸ F		NC	30-50°C, 5-20 min, pH 4,0-5,5
			^{67/68} Ga		38,5	25°C, 10-20 min, pH 4,0-4,5
			^{44/47} Sc		NC	25°C, 10 min, pH 6,0
			¹¹¹ In		27,9	25°C, 10-20 min, pH 4,0-7,0
DTPA	N ₃ O ₅	8	^{67/68} Ga		24,3/25,5	25°C, 30 min, pH 3,5
			⁶⁴ Cu		21,4	40°C, 60 min, pH 6,5
			^{44/47} Sc		NC	25°C, 10 min, pH 6,0
			¹¹¹ In		29,0	25°C, 5-10 min, pH 4,5-5,5
			⁸⁹ Zr		35,8-36,9	25°C, 60 min, pH 7,0
			¹⁷⁷ Lu		22,6	25°C, 10-20 min, pH 5,5
			^{86/90} Y		21,2/22,0	25°C, 10-20 min, pH 5,5
			^{212/213} Bi		35,6	25°C, 10-20 min, pH 5,0
CHX-A''- DTPA	N ₃ O ₅	8	^{67/68} Ga		NC	85°C, 20 min, pH 5,5
			¹¹¹ In		NC	25-60°C, 30-60 min, pH 5,5
			¹⁷⁷ Lu		NC	37-75°C, 30-60 min, pH 5,0-5,5
			^{86/90} Y		NC	37-75°C, 30-60 min, pH 5,0-5,5
			^{212/213} Bi		NC	25°C, 10-20 min, pH 5,0
DFO	O ₆	6	^{67/68} Ga		28,6	25°C, 30 min, pH 3,5
			⁸⁹ Zr		NC	25°C, 60 min, pH 7,0-7,5
H ₂ dedpa	N ₄ O ₂	6	^{67/68} Ga		28,1	25°C, 5-10 min, pH 4,5
			⁶⁴ Cu		19,2	25°C, 5-10 min, pH 5,5
H ₄ octapa	N ₄ O ₄	8	¹¹¹ In		26,8	25°C, 5-10 min, pH 4,5
			¹⁷⁷ Lu		20,1	25°C, 5-10 min, pH 4,5

^a Complexation : vert : optimale, orange : non optimale, rouge : ne permettant pas l'obtention de complexes stables, ^b : log K_{ML}, NC : non communiqué

3.2.1.2. Les chélatants cycliques

Les chélatants cycliques possèdent l'avantage de former des complexes plus stables que ceux acycliques de par la plus forte rigidité du complexe formé (Figure 14). Cependant, les agents acycliques possèdent une plus grande flexibilité permettant un radiomarquage à température modérée (25 – 60°C). Le choix de l'agent chélatant employé pour la complexation d'un

radionucléide dépend du nombre de liaisons de coordination que le radiométal peut former ainsi que son rayon atomique. Ainsi, un radionucléide ayant un grand rayon atomique comme l'actinium-225 ne pourra pas être complexé par des chélatants cycliques tel que le NOTA (acide 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-trisacétique), car ce dernier possède un petit diamètre et ne peut former que 6 liaisons de coordination avec un métal. En revanche, un chélatant cyclique tel que l'acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique (DOTA), possédant un diamètre plus important et 8 sites de coordination, permet l'obtention de complexes stables. DOTA est le chélatant cyclique le plus utilisé car il permet le radiomarquage de nombreux radionucléides (*i.e.*, gallium-68, lutécium-177, actinium-225). Cependant, NOTA et son analogue NODAGA (acide 1,4,7-triazacyclononane,1-glutarique,7-acétique) sont également très répandus pour le radiomarquage de radionucléide de faible diamètre comme le gallium-68, le cuivre 64/67 ou l'Al¹⁸F. Des chélatants cycliques de plus gros diamètre tel que TETA (acide 1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane-1,4,8,11-tétraacétique) ont été développés pour le radiomarquage de radionucléides de gros diamètre comme le lutécium-177 mais les complexes formés ne présentent pas une stabilité suffisante pour une utilisation en clinique. Les chélatants CB-TE2A (4,11-bis(carboxyméthyl)-1,4,8,11 tétraazabicyclo[6.6.2]hexadécane) et AAZTA (1,4-bis(carboxyméthyl)-6-[bis(carboxyméthyl)]amino-6-méthylperhydro-1,4-diazépine) sont prometteurs pour la complexation du cuivre-64 ou du gallium-68.

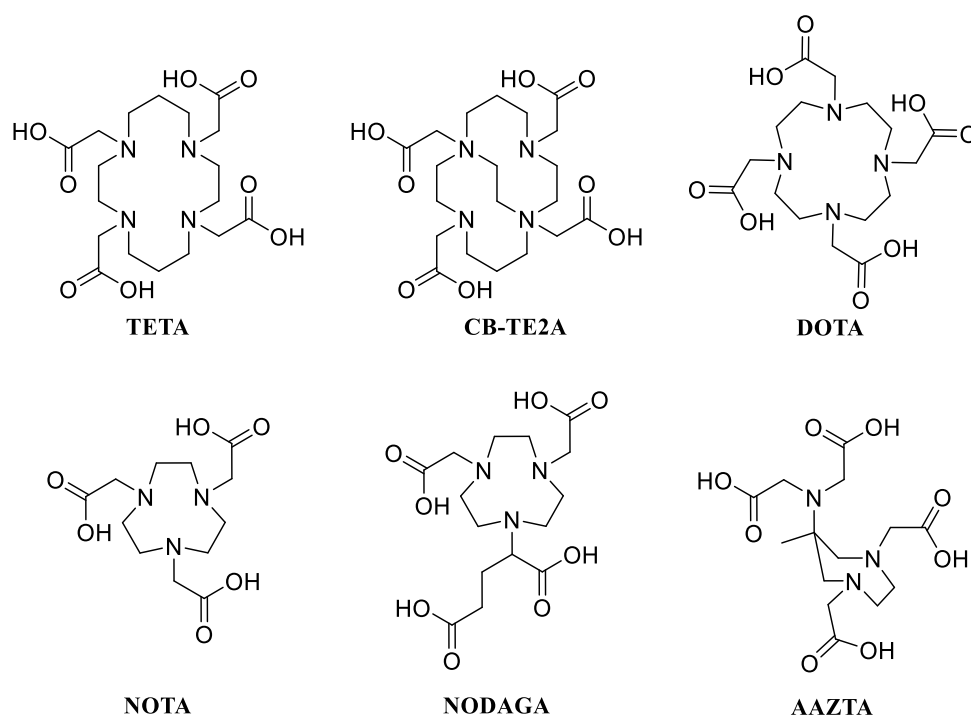


Figure 14 : Structures chimiques des chélatants cycliques utilisés pour la synthèse de radioconjugués.

Le Tableau 8 adapté de la revue bibliographique de Price et Orvig ci-dessous décrit les nombres de liaisons de coordination pouvant être réalisées avec un agent chélatant cyclique ainsi que les radionucléides les plus adaptés pour chaque agent.^[64]

Tableau 8 : Propriétés de complexation de chélatants cycliques pour certains radiométaux

ACB	Donneurs	Liaisons de coordination	Radio métal	Stabilité ^a	Constante de stabilité ^b	Conditions de radiomarquage
TETA	N ₄ O ₄	8	^{67/68} Ga		19,7	NC
			⁶⁴ Cu		21,9	25°C, 60 min, pH 5,0-7,0
			¹¹¹ In		21,9	NC
			¹⁷⁷ Lu		15,3	NC
			^{86/90} Y		14,8	NC
CB-TE2A	N ₄ O ₂	6	⁶⁴ Cu		NC	95°C, 360 min, pH 6,0-7,0
DOTA	N ₄ O ₄	8	^{67/68} Ga		21,3	37-90°C, 10-30 min, pH 4,0-5,5
			⁶⁴ Cu		22,2	25-90°C, 30-60 min, pH 5,5-6,5
			^{44/47} Sc		27,0	95°C, 20-30 min, pH 4,0
			¹¹¹ In		23,9	37-100°C, 15-60 min, pH 4-6
			¹⁷⁷ Lu		23,5	25-100°C, 15-90 min, pH 4-6
			^{86/90} Y		24,3-24,9	25-100°C, 15-90 min, pH 4,0-6,0
			^{212/213} Bi		NC	95-100°C, 5 min, pH 6,0-8,7
			²¹² Pb		NC	25-75°C, 30-60 min, pH 4,0-5,5
			²²⁵ Ac		NC	37-60°C, 30-120 min, pH 6,0
NOTA NODAGA	N ₃ O ₃	6	^{67/68} Ga		31,0	25°C, 30-60 min, pH 4,0-5,5
			⁶⁴ Cu		21,6	25°C, 30-60 min, pH 5,5-6,5
			^{44/47} Sc		16,5	95°C, 20-30 min, pH 4,0
			¹¹¹ In		26,2	60-95°C, 20-30 min, pH 4,0-5,0
AAZTA	N ₂ O ₄	6	^{67/68} Ga		NC	25°C, 1-5 min, pH 4,0-6,8

^a Complexation : vert : optimale, orange : non optimale, rouge : ne permettant pas l'obtention de complexes stables, ^b : log K_{ML}, NC : Non communiqué

3.2.2. La radiochimie des radiométaux

Le radiométal le plus utilisé en imagerie TEP est le gallium-68. Depuis la découverte de la stratégie de radiomarquage Al¹⁸F, de nombreux radiopharmaceutiques utilisant cette nouvelle stratégie voient le jour. Concernant la RTIV, le lutécium-177 est le radionucléide le plus employé. Cependant, du fait de ses propriétés physiques intéressantes et sa facilité de production, l'actinium-225 est de plus en plus utilisé et de nombreux essais cliniques employant des radioconjugués radiomarqués à l'actinium-225 sont décrits dans le cadre d'essais cliniques.

3.2.2.1. Radiomarquage au gallium-68

Le gallium-68, utilisé sous sa forme $^{68}\text{Ga}^{3+}$, forme six liaisons de coordination avec les agents chélatants induisant des complexes octaédriques. Les chélateurs cycliques DOTA et NOTA sont principalement utilisés mais également le chélateur acyclique HBED-CC. Malgré le grand diamètre du DOTA, celui-ci est capable de former des complexes relativement stables avec le gallium-68 mais cela nécessite des conditions de radiomarquage assez dures (température de 90 – 105°C), ce qui n'est pas idéal pour le radiomarquage de biomolécules. Cependant, un temps de réaction court (5 – 15 min) limite grandement la dégradation possible des agents de ciblage. Le radiomarquage du NOTA se fait, quant à lui, à une température plus douce (TA – 50°C). Les complexes formés avec du DOTA sont moins stables que ceux obtenus avec du NOTA, qui possède un diamètre plus adapté à celui du rayon atomique du gallium. Ainsi, le $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTATATE}$ et le $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTATOC}$ sont deux exemples de radioconjugués actuellement sur le marché, utilisant un chélateur cyclique DOTA pour la complexation du gallium-68. Le $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ possède également une AMM pour le diagnostic par imagerie TEP du cancer de la prostate. De nombreux ^{68}Ga -radiopharmaceutiques sont actuellement testés cliniquement comme $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ABY-025}$,^[82] et le $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-F(ab')_2\text{-trastuzumab}}$ ^[83] pour le diagnostic du cancer du sein, le $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-Bombesin}$ ^[84] pour le diagnostic du cancer de la prostate et le $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-Alfatide II}$ ^[85] pour le diagnostic du cancer des poumons et de la tuberculose. L'Alfatide II est composé de deux agents de ciblage comprenant le motif de reconnaissance RGD (L-arginine-glycine-L-acide aspartique). Des essais précliniques avec le $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-RGD}_2$ ont également été conduits.^[86]

3.2.2.2. Radiomarquage à l'aluminium-fluor-18

La stratégie de radiomarquage à l' Al^{18}F a été décrite pour la première fois en 2009 par McBride *et al.* pour le radiomarquage du composé NOTA-IMP449 pour le ciblage du carcinome du colon.^[87,88] Cette stratégie innovante tire donc les avantages du radiomarquage par chimie de complexation. Ainsi, des RRC plus élevés et des temps de radiosynthèse bien plus courts que ceux de la radiofluoruration par formation de liaisons C-F, Si-F ou B-F peuvent être observés.

Cette stratégie est basée sur le fait que le fluor possède une forte affinité pour l'aluminium (Al-F : 670 kcal/mol), la liaison Al-F étant plus forte que la liaison C-F. L'aluminium est un élément faisant partie de la famille des métaux et forme des liaisons de coordination avec des agents chélatants (Chapitre 1, Partie 3.2.1). L'aluminium peut former 6 liaisons de coordination et les complexes résultants possèdent une géométrie octaédrique. Ainsi, dans le cadre du radiomarquage à l' Al^{18}F , l'atome d'aluminium forme une liaison de coordination avec le fluor-

18 et cinq liaisons de coordination avec un agent chélatant. Cette technique suscite aujourd'hui un très grand intérêt car elle permet de combiner les avantages des propriétés physiques du fluor-18 et du radiomarquage par chimie de coordination. En effet, comme décrit dans la Partie 2.2.3.1. du Chapitre 1, le fluor-18 permet l'obtention d'images de meilleures qualités, comparé au gallium-68. Ce radiomarquage peut être effectué dans un tampon aqueux et ne nécessite donc pas l'utilisation de solvants aprotiques polaires anhydres. De même, les conditions de chauffage sont moins drastiques puisque des réactions de 10 – 15 min entre 50 – 105°C sont décrites, alors que pour la création de liaisons C-F, des températures de 80 – 160°C sont souvent rapportées.^[89] L'inconvénient de cette stratégie dépend cependant de la stabilité des complexes formés avec l'Al¹⁸F. Ainsi, le choix de l'agent chélatant est crucial pour l'obtention d'un complexe stable et pour limiter toute défluoration qui pourrait induire une fixation du fluor-18 au niveau des os.

Tableau 9 : Exemples de radiopharmaceutiques radiomarqués à l'Al¹⁸F ayant été testés cliniquement

Traceur à Al ¹⁸ F	Cible	Indication	Conclusions majeurs	Réf.
NOTA-octreotide	Récepteur à la somatostatine	TNE	Fort taux de fixation tumorale, bon ratio tumeur/bruit de fond et meilleur que le [¹⁸ F]FDG, résultats similaires à la TEP au [⁶⁸ Ga]Ga-NOTA-octreotide, distribution dans la rate	[90-94]
FAPI-74	FAP	Cancer du poumon	Distribution dans la tumeur, les reins et le foie, conclusions similaires au [⁶⁸ Ga]Ga-FAPI-74	[95]
PSMA-BCH	PSMA	Cancer de la prostate	Bonne visualisation de la tumeur, accumulation dans les reins	[96]
Alfatide II	Intégrine α _v β ₃	Cancer du sein	Bonne visualisation des lésions cancéreuses	[97]
		Cancer du poumon non à petites cellules, métastases lymphoïdes	Meilleure spécificité par rapport au [¹⁸ F]FDG. Difficulté à distinguer les lésions tumorales et l'inflammation. Bonne détection des lésions métastatiques	[98-101]
		Glioblastome	Bonne visualisation des lésions, bon ratio tumeur/bruit de fond	[102]

Les agents chélatants utilisés pour le radiomarquage à l'Al¹⁸F reportés dans la littérature sont des chélateurs acycliques comme la cage HBED^[103-105] ou des cages cycliques de petits diamètres comme la cage NOTA^[90,93,106-109] ou son analogue NODAGA.^[110] Des agents chélatants de plus gros diamètre ne permettent pas l'obtention de complexes stables, c'est le

cas pour la cage DOTA par exemple. Une étude détaillée des conditions de préparation des radiopharmaceutiques radiomarqués à l' ^{18}F sera présentée dans le Chapitre 5 dédié à la mise en place d'une méthode de radiomarquage automatisée du PSMA-11 à l' ^{18}F . De nombreuses équipes se sont donc intéressées à cette nouvelle stratégie de radiomarquage pour le développement de radiopharmaceutiques. De nombreux résultats prometteurs ont permis d'entreprendre de nombreux essais cliniques comme avec le ^{18}F -Alfatide II, le ^{18}F -AlF-PSMA-11, différents agents de ciblage des intégrines $\alpha_v\beta_3$ comme le ^{18}F -AlF-NOTA-RGD₂ ou le ^{18}F -AlF-FAPI-74 (Tableau 9). Ainsi, en un peu plus d'une dizaine d'année, cette technique novatrice a permis de développer des radiopharmaceutiques marqués au fluor-18 permettant le diagnostic de nombreux types de cancers.

3.2.2.3. Radiomarquage au lutécium-177

Le lutécium-177 est un radiométal de la famille des lanthanides qui est utilisé sous sa forme $^{177}\text{Lu}^{3+}$. Il peut former de six à neuf liaisons de coordination et peut être complexé par des chélateurs cycliques présentant un grand diamètre (DOTA, TETA) et également par des chélateurs acycliques comme le CHX-A''-DTPA.^[111,112] Cependant, la cage DOTA est la cage la plus répandue pour la complexation du lutécium-177. Le lutécium-177 a également été complexé à une petite cage cyclique comme le NOTA, mais de la décomplexation a été observée par certaines équipes^[112,113] bien que des résultats contrastés soient rapportés.^[114] La faible stabilité du complexe ^{177}Lu -NOTA pourrait être due à un diamètre trop petit de la cage NOTA par rapport au rayon ionique du lutécium et au nombre insuffisant de sites de coordination (5-6) pour saturer complètement sa sphère électronique. Les ^{177}Lu -radiopharmaceutiques utilisés en routine clinique sont le ^{177}Lu -DOTATATE dérivé de la somatostatine pour le traitement des TNE et son *monitoring*, ainsi que le ^{177}Lu -PSMA-617 pour le traitement des CPMRC. De nombreux ^{177}Lu -radiopharmaceutiques sont actuellement testés cliniquement pour la RTIV comme ^{177}Lu -PSMA-I&T pour le cancer de la prostate ainsi que le ^{177}Lu -DOTA-JR11 pour les TNE.^[6]

4. Le couplage des agents de ciblage aux chélatants

4.1. Les stratégies de couplage des biomolécules

Les biomolécules peuvent présenter naturellement ou artificiellement des fonctions chimiques pouvant être employées dans des réactions de bioconjugaison. Les réactions de bioconjugaison entre les chélateurs et les agents de ciblage (*i.e.*, petites biomolécules, peptides, anticorps) sont

la plupart du temps des réactions sélectives ne nécessitant pas de protections des autres fonctions chimiques sur la biomolécule. Il est nécessaire que les réactions de bioconjugaison soient réalisées dans des conditions douces, qu'elles soient rapides et régiosélectives et, si possible, bioorthogonales. Les réactions de bioconjugaison couramment utilisées en radiochimie pour le développement de biomolécules radiomarquées sont les réactions de chimie click, de formation de liens amide et thiourée.

Le terme chimie click est apparu pour la première fois en 1998 dans une publication du groupe de Sharpless faisant référence au bruit que peut faire deux objets qui s'associent.^[115] La chimie click est très utilisée dans le domaine de la chimie médicinale et de la chimie verte, mais se retrouve également dans la synthèse de polymères ou encore de cristaux liquides. Les règles qui permettent de savoir si une réaction fait partie de la famille de la click sont :

- Un temps de synthèse court,
- Des conditions de synthèse douces (température ambiante, solvant aqueux),
- Un rendement élevé voir quantitatif,
- Pas ou peu de formation de sous-produits,
- Pas de purification ou purification simplifiée,
- Économie d'atome,
- Une réaction spécifique et sélective
- Vitesse de réaction très élevée (constante de vitesse 10^{-3} - 10^5 mol/s)

L'avantage de la chimie click est sa biocompatibilité qui permet de coupler des biomolécules à des ACB sans risquer leur dégradation. De plus, étant sélective et spécifique, des réactions de chimie click peuvent être réalisées sur des composés dont les fonctions réactives ne sont pas protégées. Cela évite donc des étapes supplémentaires de protection/déprotection, ce qui simplifie les stratégies de synthèse, améliore les rendements globaux et limite les réactions secondaires indésirables.

Les réactions de bioconjugaison, telles que la formation de lien urée, de carbazates ou d'aziridines, amination réductrice, ouverture d'époxydes, sont très peu utilisées pour le couplage entre un agent de ciblage et un agent chélatant. Ainsi, le Tableau 10 et les sections ci-dessous présentent les réactions de bioconjugaison communément utilisées pour la synthèse de précurseurs de radiomarquage, à savoir la chimie click, la formation de liens amide et thiourée.

Tableau 10 : Réactions de bioconjugaison utilisées pour le couplage d'un agent chélatant et d'un agent de ciblage^[76,116,117]

Réaction	Réactif 1	Réactif 2	Produit	Remarque
Amidation à l'aide d'un acide carboxylique (couplage peptidique)	R_1-NH_2			Activation de l'acide par un groupement <i>N</i> -hydroxysuccinimide
Formation de thiourée	R_1-NH_2	$R_2-N=C=S$		Isocyanate plus réactif que le thioisocyanate mais moins stable, sujet à hydrolyse
CuAAC (Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition) (10 ⁻¹⁰ mol/s)	$R_1-C\equiv C$	R_2-N_3		Bioorthogonale, réaction rapide, conditions douces, régiosélectivité, présence de cuivre
SPAAC (Strain-Promoted-Azide-Alkyne-Cycloaddition) (10 ⁻²⁻¹ mol/s)		R_2-N_3		Bioorthogonale, possibilité de couplage <i>in vivo</i> , cinétique plus lente que CuAAC, formation de deux régioisomères
IEDDA (Inverse Electron-Demand Diels-Alder reaction) (10 ⁻¹⁰ mol/s)			 Dégagement de N ₂	Bioorthogonale, conditions douces, réaction de chimie click la plus rapide, possibilité de couplage <i>in vivo</i>
Ligation de Staudinger (10 ⁻³ mol/s)		R_2-N_3		Bioorthogonale, conditions douces, cinétique rapide
Ligation de Staudinger « traceless »		R_2-N_3		Bioorthogonale, conditions douces, cinétique rapide, le groupement phénylphosphine n'est pas présent sur la molécule comme pour la ligation classique
Addition de thio-Michael (10 ²⁻¹⁰ mol/s) : ici, addition de thio-maléimide	R_1-SH			Réaction rapide, conditions douces, obtention de deux diastéréoisomères, réaction réversible, non bioorthogonale

4.2. Création d'un lien amide

La liaison peptidique (fonction amide) permet de lier les acides aminés (AA) d'une chaîne peptidique. Cette liaison est stable mais est sujette à hydrolyse par les peptidases et protéases présentes dans les cellules. De nombreux radiopharmaceutiques utilisent cette liaison peptidique pour lier des agents de ciblage aux ACB. Nous pouvons par exemple citer le PSMA-11 qui utilise la formation de deux liens amides pour lier i) le motif de reconnaissance DUPA à l'espaceur et 2) l'espaceur à la cage HBED-CC, mais également le PSMA-617 qui emploie également la formation de deux liens amide pour coupler i) la cage DOTA à l'espaceur possédant un groupement naphthalène et 2) l'espaceur au motif DUPA (Figure 15).

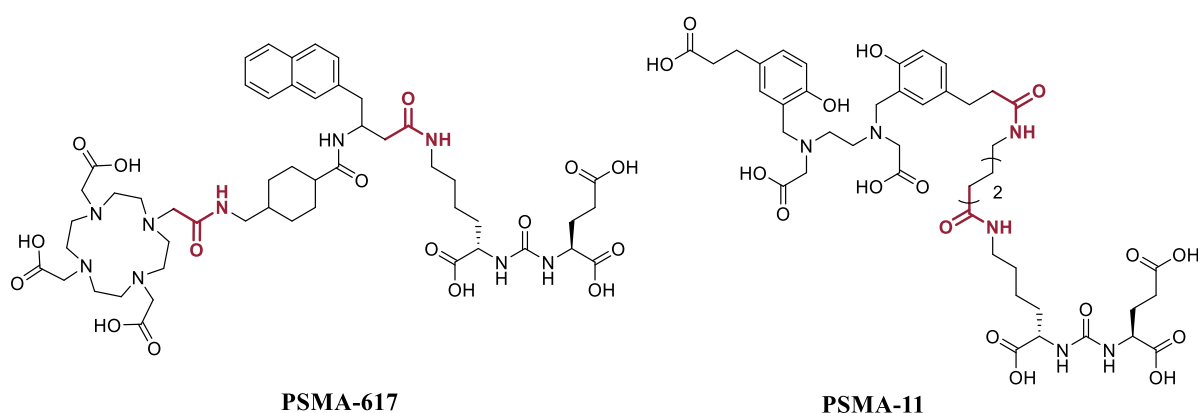


Figure 15 : Structures chimiques du PSMA-11 et du PSMA-617

4.3. Chimie click

4.3.1. La CuAAC

La cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre(I) (CuAAC), qui est la plus répandue des réactions de chimie click, est une réaction de cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre. Elle correspond à une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture (dipôle) et un alcyne terminal (dipolarophile) conduisant à la formation d'une fonction 1,2,3-triazole disubstituée en 1,4 ou en 4,5. Cette réaction a été améliorée par l'équipe de Sharpless afin d'être réalisée à température ambiante, en solvant aqueux et de ne conduire qu'au régioisomère 1,4.^[115] Le cuivre (II) est réduit *in situ* en cuivre (I) par un agent réducteur, comme l'ascorbate de sodium, jouant le rôle de catalyseur. Cette réaction est irréversible, ce qui est un avantage pour le couplage à des composés biologiques. Cette technique de couplage nécessite cependant une modification chimique préalable de la biomolécule afin de lui incorporer la fonction azoture ou alcyne.

En radiochimie, la CuAAC est utilisée principalement pour le couplage entre un agent de ciblage et un GP radiomarqué au fluor-18. Elle est bien adaptée à la radiosynthèse puisqu'elle offre des rendements élevés pour un temps de réaction très court. Nous pouvons, par exemple, citer les travaux de Collet *et al.* sur l'utilisation d'un GP fluoré à base de sucre pour le radiomarquage du c(RDGfC) (Schéma 4).^[118]

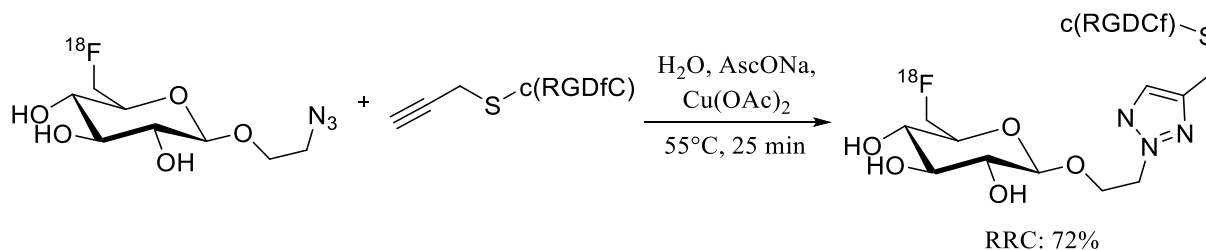


Schéma 4 : Exemple d'un radiotracer synthétisé à l'aide d'une réaction de CuAAC^[118]

La réaction de chimie click CuAAC pour le couplage entre un ACB et un agent de ciblage est moins employée, puisque la synthèse nécessite l'utilisation d'une quantité catalytique de cuivre. Les chélatants possédant la capacité de complexer le cuivre, cela implique une étape de purification supplémentaire du précurseur de marquage afin d'éliminer le cuivre complexé par précipitation à l'aide de sulfite de sodium^[119] ou par l'utilisation de résines de type Chelex100. Sans cela, le taux de conversion radiochimique (TCRC) sera négativement impacté par la présence de cuivre.

4.3.2. La SPAAC

La cycloaddition azoture-alcyne favorisée par déformation (SPAAC) est une technique dérivée de la CuAAC consistant à employer un cyclooctyne et un azoture afin de réaliser une réaction entre un alcyne « contraint » et un azoture. Elle suit donc un mécanisme de type cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen. Le cyclooctyne est un composé cyclique présentant le plus faible nombre de chaînons présentant une triple liaison alcyne. Ce composé présente donc une tension de cycle importante permettant la réalisation de cette réaction à température ambiante et sans catalyseur métallique comme le cuivre utilisé en CuAAC. De ce fait, la SPAAC peut être utilisée pour coupler des agents chélatants à des agents de ciblage sans risque de complexer du cuivre dans l'agent de ciblage. Les principaux cyclooctynes utilisés pour la bioconjugaison sont le DBCO (dibenzocyclooctyne) et le DIBO (dibenzocyclooctyne), le DIFO (cyclooctyne difluoré) et le BCN (*endo*-9-hydroxyméthylbicyclo[6.1.0]non-4-yne) (Figure 16).

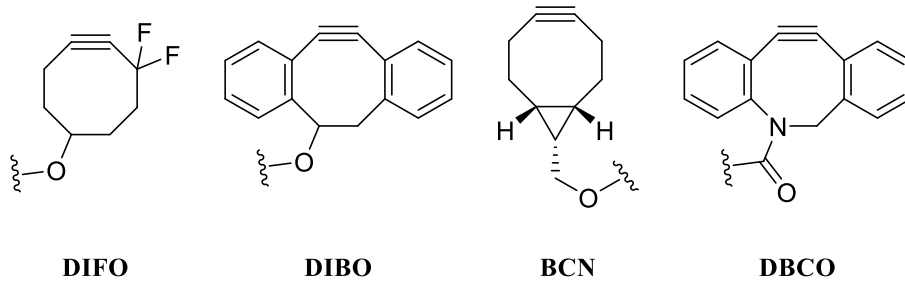


Figure 16 : Structures chimiques du DIFO, DIBO, BCN et DBCO

La SPAAC conduit à la formation de deux régioisomères. Elle est non-réversible ce qui conduit à la formation de conjugués stables *in vivo*. Elle conduit à des rendements bien plus élevés lorsqu'elle est réalisée dans un solvant organique comme le CH₃CN et non dans un solvant aqueux. La SPAAC est plus lente que la CuAAC et de nombreuses équipes ont donc travaillé sur l'augmentation de la vitesse de réaction. Nous pouvons par exemple citer l'ajout d'un groupement fluoré dans le DIFO ou de deux cycles aromatiques sur le cyclooctyne comme pour le DBCO ou le DIBO. Cependant, l'ajout de ces derniers augmente fortement l'hydrophobe du conjugué induisant des coefficients de partition élevés des radiopharmaceutiques résultants, et donc une biodistribution non optimale ainsi qu'une élimination hépatobiliaire plus lente qu'une élimination rénale.

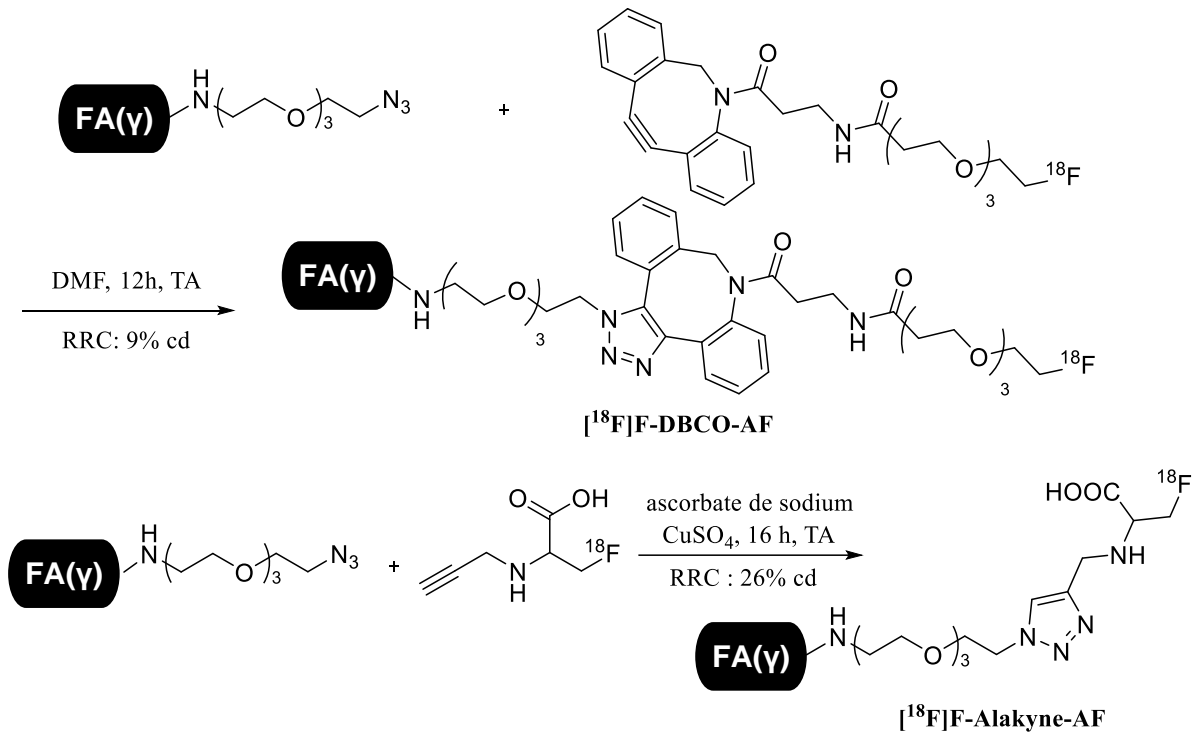


Schéma 5 : Radiomarquage par couplage d'un GP fluoré à l'AF par stratégie SPAAC comparé à la CuAAC^[120]

Kettenbach *et al.* ont développé deux radiotraceurs à base d'AF pour le diagnostic du cancer de l'ovaire, le [^{18}F]F-Alakyne-AF et le [^{18}F]F-DBCO-AF, (Schéma 5). Le premier présente un coefficient de partition plus faible que le second, conduisant à une meilleure biodistribution de celui-ci ($\log D_{7,4}$: $-1,18 \pm 0,03$ et $0,60 \pm 0,07$, respectivement).^[119] De même, [^{18}F]F-Alakyne-AF présente une élimination rénale tandis que [^{18}F]F-DBCO-AF présente une élimination hépatobiliaire, moins rapide et limitant la visualisation des lésions par imagerie TEP.

4.3.3. La IEDDA

La réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons (IEDDA) est une réaction irréversible entre un *trans*-cyclooctène (diénophile) et un dérivé de tétrazine (diène) conduisant à la formation d'une fonction pyridazine. Son inconvénient réside dans la sensibilité du *trans*-cyclooctène en solvants aqueux pouvant conduire à son isomérisation et donc à plusieurs produits. De plus, l'instabilité de certains dérivés de tétrazine peut rendre la réaction et la purification complexes.^[121]

Selveraj *et al.* utilise la IEDDA pour le radiomarquage du c(RGDyK) au fluor-18. Un excellent RRC de 90% non corrigé de la décroissance (ncd) est obtenu (Schéma 6). Des tests de biodistribution et d'imagerie TEP montrent une bonne fixation à la tumeur ainsi qu'aux reins et au foie.^[122]

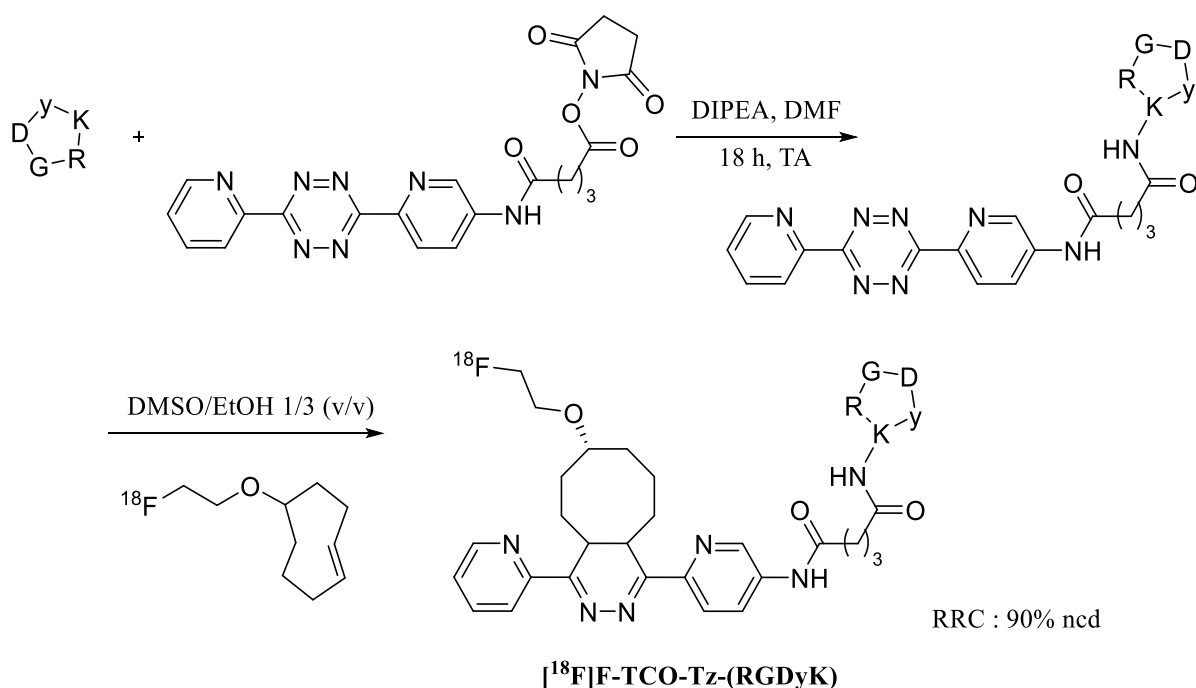


Schéma 6 : Synthèse du conjugué RGD-tétrazine et son radiomarquage au fluor-18 par chimie click IEDDA^[122]

Cette réaction étant la plus rapide des réactions de chimie click et étant très spécifique, elle peut être employée *in vivo*. C'est pourquoi nous retrouvons son utilisation dans la stratégie de pré-ciblage. Cette stratégie permet l'emploi simultanée de fluor-18 et d'anticorps dans le cas de l'imagerie immunoTEP.

4.3.4. La ligation de Staudinger « traceless »

La ligation de Staudinger est une réaction chimiosélective et bioorthogonale en milieu aqueux. Elle consiste en une réaction d'addition nucléophile entre un azoture et un composé dérivé de la triphénylphosphine portant un groupement ester, conduisant à l'obtention d'une liaison amide. Cependant, le groupement triphénylphosphine est présent entre les deux composés à coupler, ce qui peut fortement impacter les propriétés de biodistribution des biocomposés. Ainsi, ce type de click n'est pas communément employé pour la synthèse de précurseur de radiomarquage. Une version dite « traceless » de cette réaction a été décrite par Bertozzi afin de supprimer le groupement triphénylphosphine restant après une ligation de Staudinger.^[123] La ligation « traceless » de Staudinger a déjà été employée en radiosynthèse, notamment pour la radiofluoruration d'un dérivé de sucre (Schéma 7).^[124]

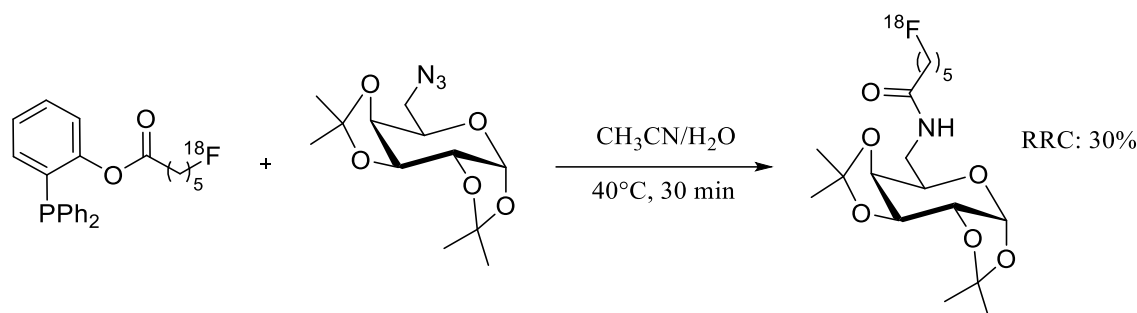


Schéma 7 : Radiomarquage au fluor-18 par ligation « traceless » de Staudinger^[124]

4.3.5. L'addition de thio-Michael

L'addition de thio-Michael est une réaction orthogonale consistant à faire réagir un nucléophile (ici un thiol) avec un dérivé α,β -insaturé électrophile comme des fonctions maléimide. Elle a l'avantage d'être rapide, totale, réalisée en conditions douces et peu coûteuse. Il a cependant été montré qu'en présence simultanée de groupes thiol et amine primaire, une compétition entre les additions de thio et d'aza-Michael peut se produire. Des additions chimiosélectives de thio-Michael ont été observées de pH 6,5 à 7,5. En dehors de cette plage, une perte de chimiosélectivité est observée en présence d'amines primaires entrant en compétition avec les thiols en raison de la nucléophilie croissante des amines.^[116,125]

La nature du groupement électroattracteur joue un rôle sur la vitesse de réaction. Ils sont classés selon l'ordre suivant : maléimide > fumarate > acrylate > acrylonitrile > méthacrylate. C'est pourquoi le maléimide est très utilisé pour l'addition de thio-Michael. L'utilisation de fonctions thiol en fait une réaction de choix pour le couplage à des agents de ciblage. En effet, la proportion de cystéine dans les protéines naturelles étant relativement faible, il y a peu de chance qu'il y en ait au niveau des motifs de reconnaissance des peptides. De plus, une cystéine est très facile à incorporer à l'extrémité *N*-terminale de peptides obtenu par synthèse peptidique sur support solide (SPPS), contrairement aux autres groupements nécessaires aux autres types de bioconjugaison. La stratégie de couplage thio-Michael peut être utilisée pour lier des ACB à des peptides comme c'est le cas pour la synthèse du [¹⁸F]AlF-NOTA-exendin-4 (Schéma 8).^[126,127] Du fait du caractère réversible de la réaction, quelques équipes de recherche ont démontré une instabilité du groupement thiopyridine-2,5-dione *in vivo* conduisant à une hydrolyse du produit d'addition.^[128]

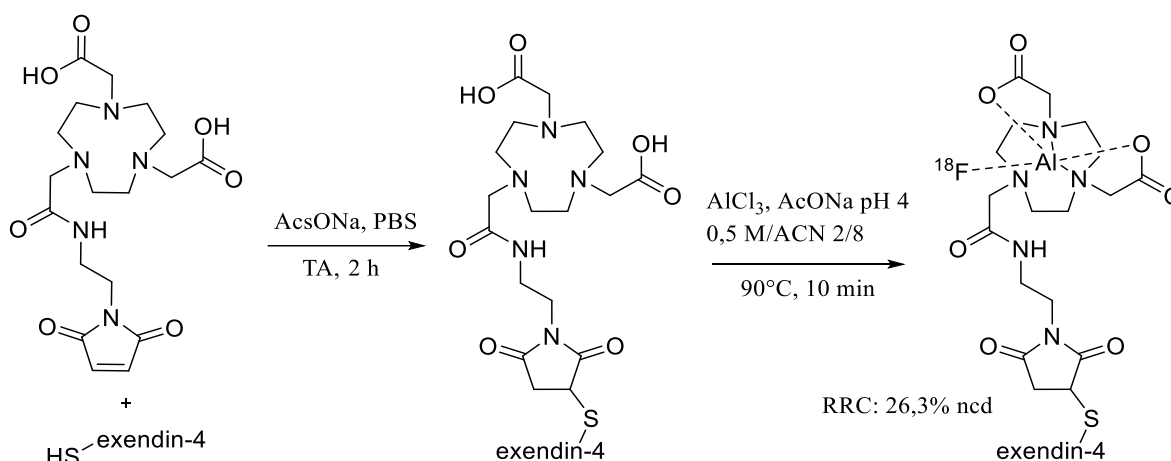


Schéma 8 : Radiomarquage de l'exendin-4 par couplage *via* une réaction thio-Michael (NaAsc : ascorbate de sodium, ncd : non corrigé de la décroissance)

4.4. Chimie des thiourées

Nous retrouvons l'utilisation d'isothiocyanate pour former un lien thiourée entre un ACB et un agent de ciblage, notamment à des anticorps. En effet, ceux-ci étant des protéines, ils possèdent de nombreux résidus lysines (Lys) possédant une fonction amine primaire qui peut être fonctionnalisée. Le chélatant le plus couplé à des anticorps est la DFO. Nous pouvons par exemple citer les travaux de Zeglis et Lewis sur le radiomarquage au zirconium-89 de l'anticorps J591, employé pour le diagnostic du cancer de la prostate, couplé à l'agent DFO à l'aide d'une fonction thiourée (Schéma 9).^[81]

D'autres agents chélatants peuvent également être utilisés mais de manière plus anecdotique comme le couple théranostic [^{111}In]In-/[^{90}Y]Y-Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin[®]) pour le diagnostic et le traitement des lymphomes non-Hodgkiniens, pour lesquels l'anticorps ibritumomab est couplé à un agent chélatant dérivé du DTPA par un lien thiourée.^[129] On peut également citer le premier radiopharmaceutique radiomarqué à l' Al^{18}F composé d'une cage NOTA reliée à l'hapten IMP449.^[87]

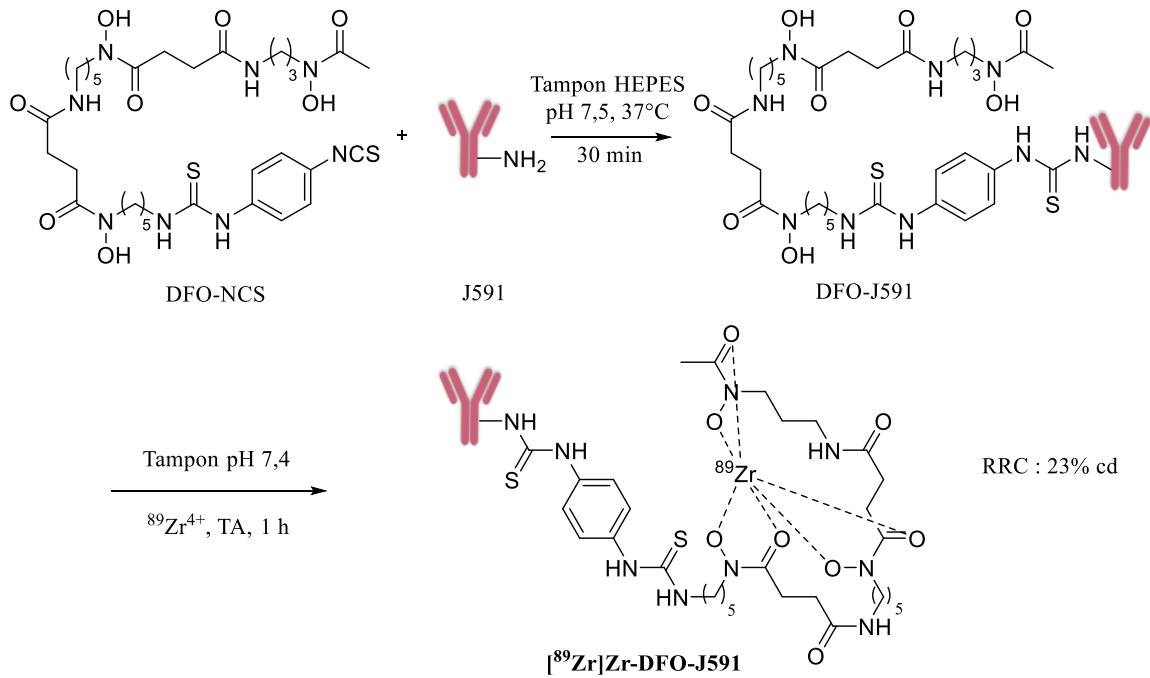


Schéma 9 : Formation d'un lien thiourée pour la synthèse d'un précurseur de radiomarquage au ^{89}Zr ^[81]

5. Les agents de ciblage utilisés en théranostic

L'agent de ciblage est essentiel puisqu'il confère des propriétés biologiques au radiopharmaceutique (biodistribution, absorption tumorale, dosimétrie, clairance...). De nombreux agents de ciblage spécifiques se fixent sélectivement sur des protéines surexprimées sur les cellules tumorales ou sur les néovaisseaux lors du ciblage actif indirect des tumeurs, et sont essentiellement des biomolécules comme des peptides ou des anticorps.

5.1. Ciblage du récepteur α à acide folique (RF α)

Pour le diagnostic du cancer de l'ovaire notamment, mais également de l'endomètre, colorectal et du poumon non à petites cellules, le ciblage du récepteur RF α offre des perspectives prometteuses. Il s'agit d'une glycoprotéine de 38 kDa ancrée au glycosylphosphatidylinositol présent dans la membrane cellulaire. Le RF α médie l'internalisation des folates par la voie de

l'endocytose.^[130] Il est absent de la majorité des tissus sains, hormis à la surface des cellules des tubules proximales des reins.^[131]

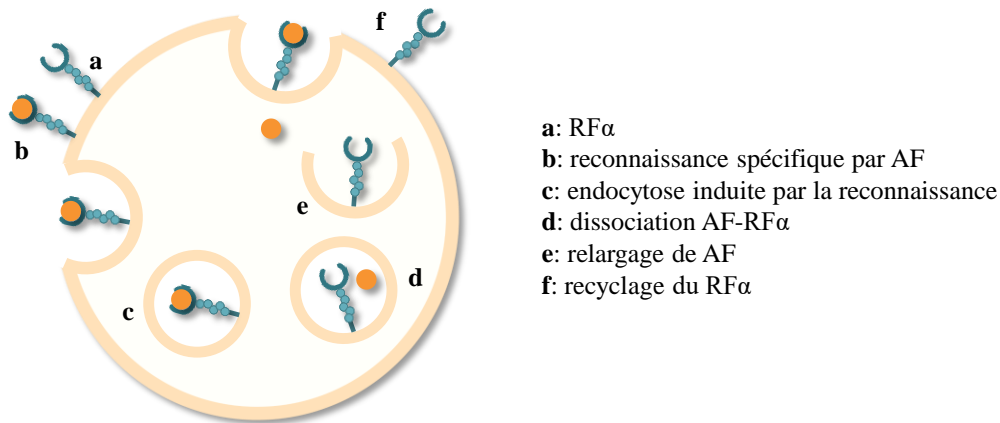


Figure 17 : Reconnaissance et internalisation de l'AF par RF α ^[132]

L'AF présente une forte affinité pour le RF α (1 nM). Il s'agit de la forme synthétique et oxydée du folate (vitamine B9). Sa structure est divisée en deux parties distinctes, les entités ptéroate et glutamate. En 2013, la structure cristalline de l'AF lié à RF α a été déterminée avec succès et a donné des informations tangibles sur la zone de reconnaissance de AF qui est la fraction ptéroate. L'AF est internalisé dans les cellules après reconnaissance spécifique avec le RF α par endocytose (Figure 17).^[132]

Deux radiofolates sont utilisés en routine clinique pour le diagnostic du cancer de l'ovaire par imagerie TEMP, le FolateScan[®] ($[^{111}\text{In}]\text{In-DTPA-AF}$)^[80] et le Etarfolatide[®] ($[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-EC20}$)^[133]. Un essai clinique a été conduit récemment pour évaluer le $[^{18}\text{F}]\text{-AzaFol}$ pour le diagnostic du cancer de l'ovaire par imagerie TEP (Figure 18).^[134]

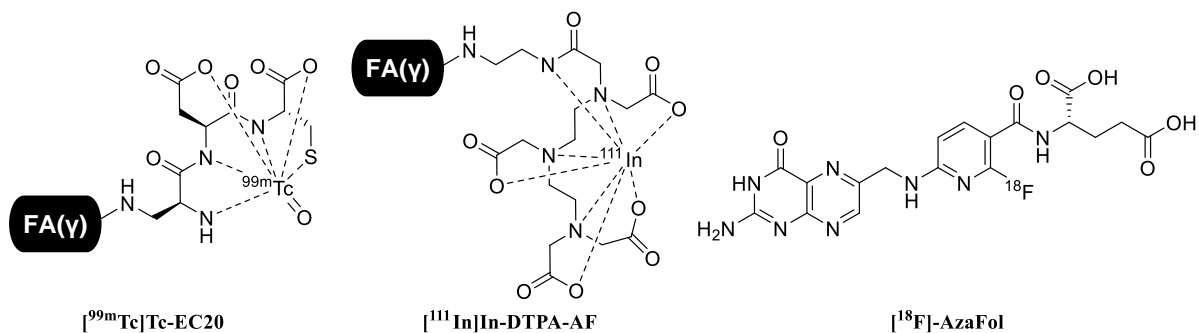


Figure 18 : Structures chimiques du FolateScan[®] ($[^{111}\text{In}]\text{In-DTPA-AF}$), de l'Etarfolatide[®] ($[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-EC20}$) et de $[^{18}\text{F}]\text{-AzaFol}$

En ce qui concerne le développement de radiofolates pour l'imagerie TEP, de nombreux ont été développés au fluor-18 principalement par stratégie de radiomarquage direct ou indirect *via*

l'utilisation de GP. De nombreux radiofolates ont également été développés pour être radiomarqués par des radiométaux pour une application en diagnostic ou en thérapie. L'AF peut être directement couplé à un ACB ou modifié par l'ajout d'un groupement polyéthylène glycol (PEG) afin de diminuer le caractère hydrophobe de l'AF. Dix radiopharmaceutiques décrits dans la littérature utilisent une modification de l'AF par du PEG permettant d'augmenter les propriétés de biodistribution et d'excrétion.^[106,135] D'autres radiofolates utilisent l'AF seul comme radiotraceur. En effet, il est indispensable que le radiotraceur soit suffisamment hydrophile pour posséder de bonnes propriétés de biodistribution. Un composé hydrophobe sera principalement excrété par la voie hépatobiliaire *via* les intestins et le colon qui est un moyen d'excrétion lent. De plus, les images obtenues avec des radiotraceurs hydrophobes montrent une forte présence d'activité au niveau des intestins, ce qui peut empêcher la bonne lecture des images et potentiellement masquer des métastases au niveau du péritoine. Un composé hydrophile sera excrété par la voie urinaire qui est plus rapide et qui permet de limiter la zone de forte activité sur les images diagnostics puisque la région de la vessie est plus petite, tout en diminuant le temps d'exposition du patient à la radioactivité. Malheureusement, l'ensemble des radiotraceurs développés pour l'imagerie nucléaire possèdent une très forte affinité pour les reins (surexprimant également les $RF\alpha$), ce qui pose un problème pour leurs transpositions en RTIV avec des radionucléides émetteurs α ou β^- puisqu'ils peuvent induire de la néphrotoxicité. Ainsi, pour diminuer l'internalisation des radiofolates au niveau des reins et l'augmenter au niveau de la tumeur, des radiofolates de seconde génération ont été développés en couplant une entité liant l'albumine afin d'augmenter le temps de distribution dans le sang.^[39,136]

5.2. Ciblage des récepteurs PSMA

Les cellules tumorales du cancer de la prostate ont la spécificité de surexprimer une glycoprotéine transmembranaire appelée PSMA. Il s'agit donc d'une cible de choix pour le diagnostic et la thérapie ciblée de ce cancer. Ce récepteur est très peu exprimé par les cellules prostatiques mais est surexprimé par les cellules cancéreuses du colon, du sein, du rein, de la thyroïde et gastrique permettant également de cibler ce récepteur pour soigner ces cancers.^[137] Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de type 2 possédant un site de reconnaissance extracellulaire. Le PSMA est une metalloenzyme à zinc (EC. 3.4.17.21) capable de catalyser l'hydrolyse du *N*-acetyl aspartylglutamate en *N*-acetylaspartate et en glutamate.^[66] Les inhibiteurs de PSMA sont capables de se fixer au niveau du site de catalyse de l'enzyme. Après reconnaissance du ligand par le PSMA, celui-ci est internalisé par endocytose. Trois classes

d'inhibiteurs du PSMA existent : les ligands contenant un motif phosphoramidate,^[138] thiol^[139] et urée^[140,141] (Figure 19).

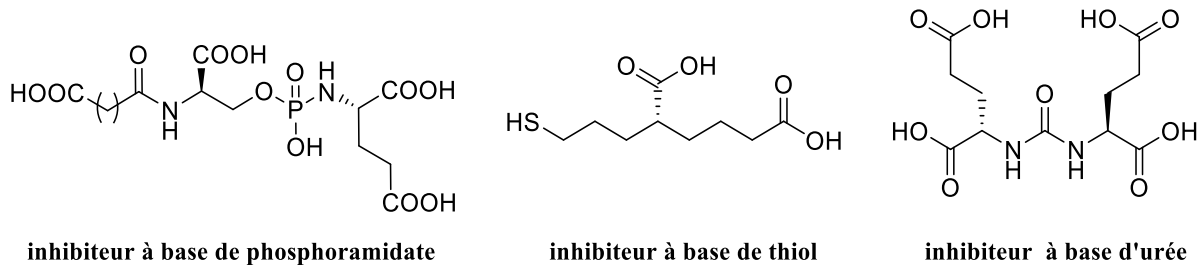
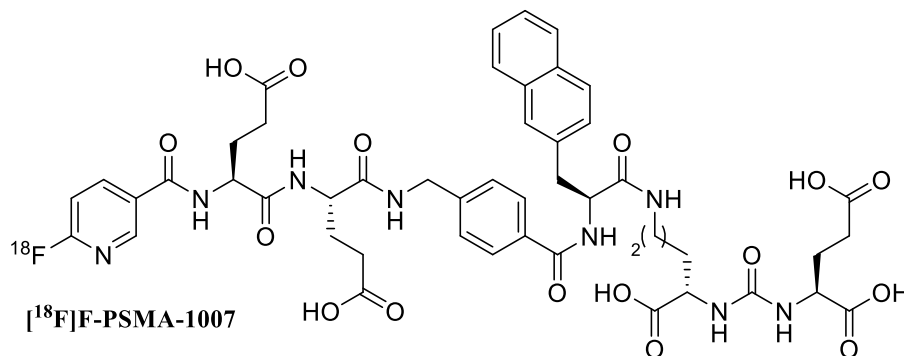


Figure 19 : Inhibiteurs du PSMA à base de phosphoramidate, de thiol et d'urée

[¹¹¹In]In-capromab pendetide (ProstaScint[®]) est un radiopharmaceutique employé en routine clinique pour l'imagerie TEMP pour le diagnostic du cancer de la prostate.^[142] Concernant l'imagerie TEP, un large panel de radiopharmaceutiques possédant un motif à base d'urée ont été développés. Nous retrouvons par exemple le [¹⁸F]F-PSMA-1007^[143] (Radelumin[®]), le [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-617,^[144] et le [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11^[34-36] actuellement sur le marché pour le diagnostic du cancer de la prostate par imagerie TEP (Figure 20). Dans le cas du CPMRC, son traitement par RTIV au [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 est employé.^[144] Actuellement, un essai clinique de phase III est en cours pour l'évaluation du [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA I&T pour le traitement par RTIV du CPMRC.^[145] Concernant l' α -RTIV, des traitements par RTIV du CPMRC par des radiopharmaceutiques comme [²²⁵Ac]Ac-PSMA-I&T ou à base d'anticorps comme le [²²⁵Ac]Ac-J591 sont actuellement en essais cliniques de phase II et I, respectivement, et donnent des résultats très prometteurs.^[146,147]



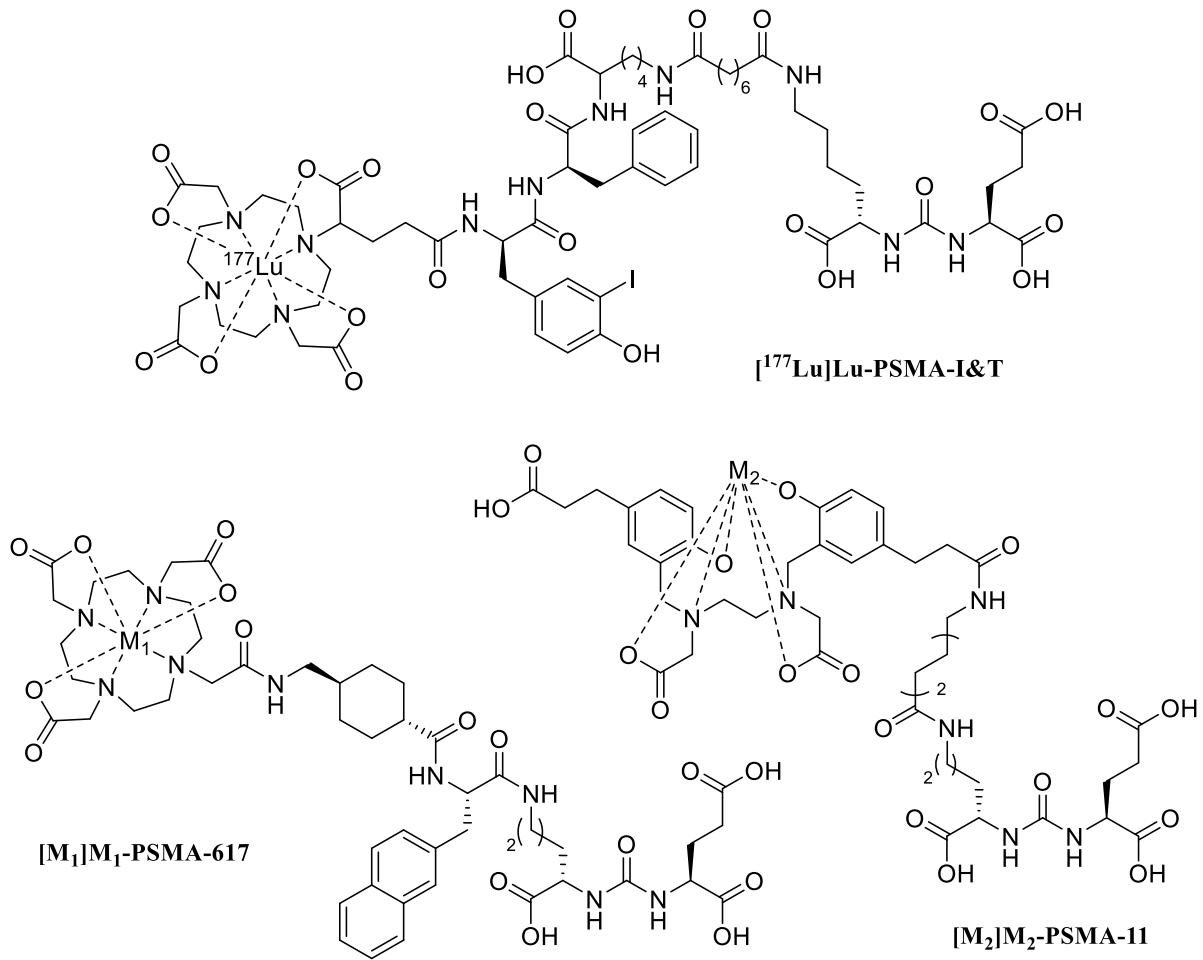


Figure 20 : Structures chimiques des radiopharmaceutiques ciblant le PSMA (M₁ : ⁶⁸Ga, ¹⁷⁷Lu ; M₂ : Al¹⁸F, ⁶⁸Ga)

5.3. Ciblage des intégrines $\alpha_v\beta_3$

Le glioblastome est une tumeur cérébrale induisant la surproduction d'intégrines dans les cellules endothéliales des néovaisseaux, et plus particulièrement l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Ce sont des récepteurs transmembranaires facilitant l'adhésion cellulaire. Elles activent également la transduction de signaux permettant la régulation du cycle cellulaire, l'organisation du cytosquelette et des récepteurs membranaires. Elles sont impliquées dans les voies de signalisation de l'angiogenèse qui est un processus fondamental dans le développement des tumeurs et des métastases. Elles sont hétérodimérisées et composées de deux sous-unités α et β (Figure 21).

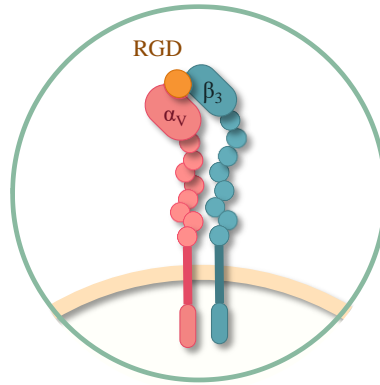


Figure 21 : motif RGD fixé sur l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ^[148]

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est un récepteur de choix pour le diagnostic et le traitement anti-angiogénique de cancers comme le glioblastome, le cancer de la prostate, du sein métastatique et du cancer tête et cou.^[149] Il existe de nombreux agents de ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ tels que les anticorps Bevacizumab (Avastin[®])^[150] et CNTO95 abciximab (Centocor[®]) et les antagonistes peptidiques comme le EMD 121974 (Cilengitide[®]),^[151] un peptide cyclique présentant le motif RGD ou le ATN-161 (Ac-PHSCN-NH₂).^[149]

Le ligand antagoniste tripeptidique RGD possède une forte affinité pour les intégrines $\alpha_v\beta_3$, faisant de lui un agent de ciblage de choix. Il est particulièrement étudié pour le diagnostic et le traitement du glioblastome par l'utilisation de sa forme cyclique plus stable que sa forme linéaire.^[75] Parmi les peptides à base de RGD, sont utilisés :

- le c(RGDyK) (cyclo L-arginine-glycine-L-acide aspartique-D-tyrosine-L-lysine),
- le c(RGDfK) (cyclo L-arginine-glycine-L-acide aspartique-D-phénylalanine-L-lysine)
- le c(RGDfC) (cyclo L-arginine-glycine-L-acide aspartique-D-phénylalanine-L-cystéine)

Bien que le peptide RDG possède un intérêt pour le ciblage des intégrines $\alpha_v\beta_3$, son couplage à un ACB diminue sa spécificité. Une augmentation du nombre de motifs RGD présents sur le radiopharmaceutique permet de palier cela. Ainsi, certains radiopharmaceutiques présentent deux à quatre motifs RGD et permettent une meilleure spécificité et l'obtention de meilleures images.^[152] Le [¹⁸F]-Alfatide II ([¹⁸F]AIF-NOTA-E[PEG₄-c(RGDfK)]₂) est le plus utilisé aujourd'hui en routine clinique pour le diagnostic du glioblastome.^[153,154] D'autres radiopharmaceutiques, présentant un agent de ciblage c(RGD) pour le diagnostic par imagerie TEP, sont actuellement en cours d'essais cliniques comme le [¹⁸F]FPPRGD2 ([¹⁸F]-PEG₃-E[c(RGDyK)]₂), le [¹⁸F]RGD-K5 pour le diagnostic du cancer du sein métastatique^[155] et le [⁶⁸Ga]Ga-Alfatide II pour le diagnostic du cancer du poumon métastatique.^[85,156] Les

radiopharmaceutiques $[^{90}\text{Y}]\text{Y-RGD}_4$, $[^{90}\text{Y}]\text{Y-P3-RGD}_2$ et $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-P3-RGD}_2$ ont, quant à eux, montré un intérêt en RTIV en ralentissant la croissance tumorale (Figure 22).^[157]

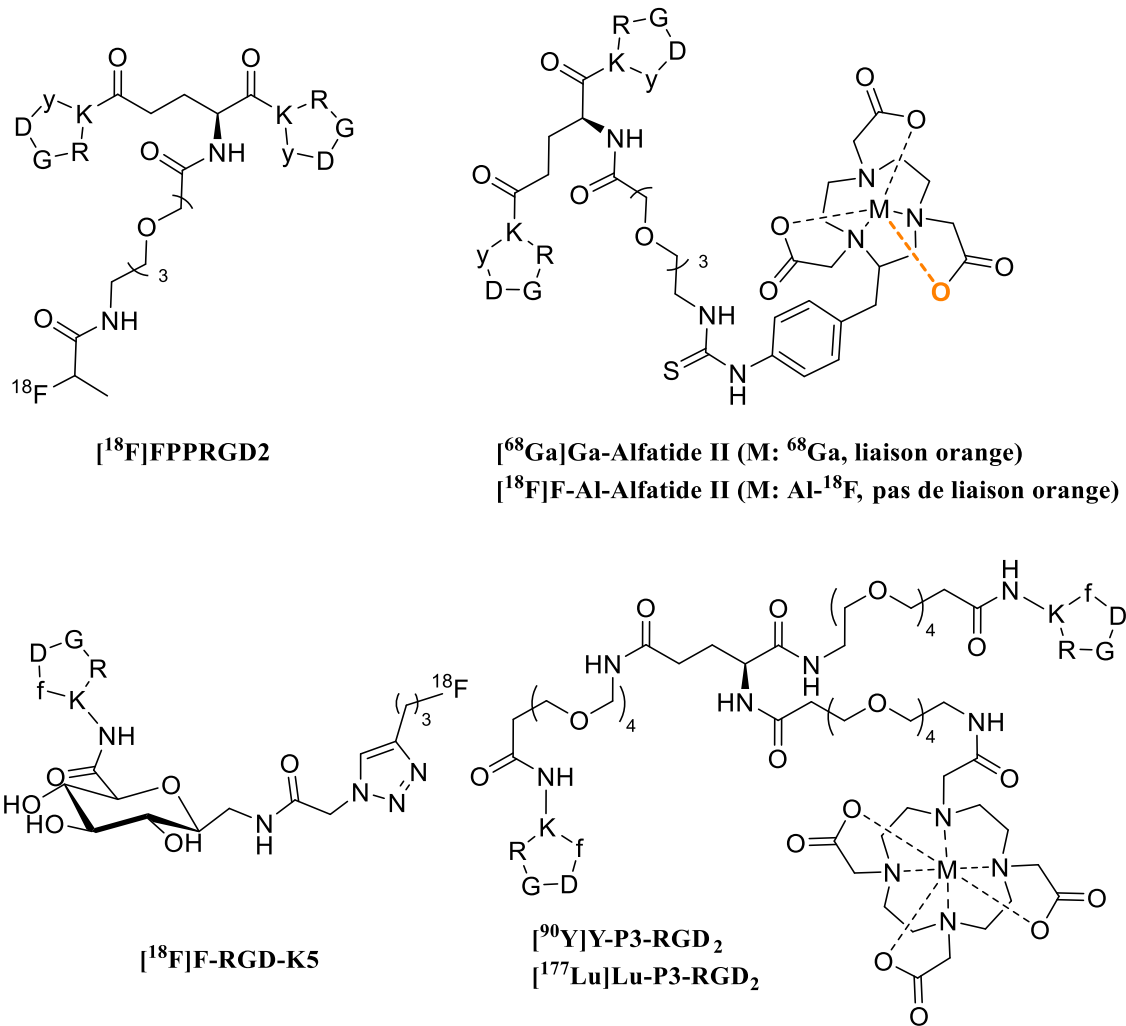


Figure 22 : Radiopharmaceutiques présentant le motif RGD en cours d'essais cliniques

6. L'approche théranostique

Cette dernière partie présente l'état de l'art de l'approche théranostique en médecine nucléaire. Ainsi, de nombreux radiopharmaceutiques présentés ici sont en phase de recherche et développement (R&D), et ne sont pas inclus dans des essais cliniques.

6.1. Principe de la théranostic

Le terme « théranostic » a été introduit pour la première fois en 2002 par Funkhouser et ses collaborateurs.^[158] Il consiste en la combinaison des modalités de diagnostic par imagerie (IRM, TEP, TEMP, de fluorescence) et de thérapie (chimiothérapie, immunothérapie, thérapie

photodynamique, RTIV) afin de proposer une innovation pour adapter le traitement aux caractéristiques de la pathologie pour un patient donné.^[159]

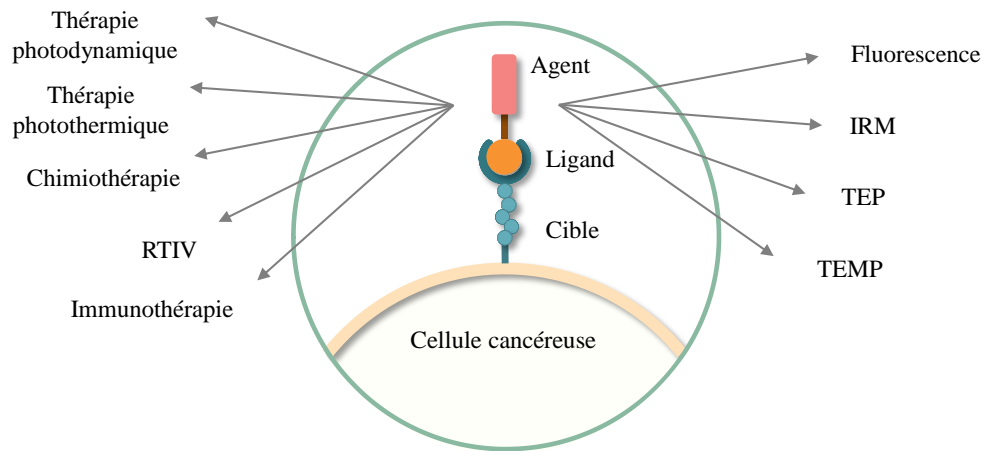


Figure 23 : Les différentes techniques d'imagerie et de traitement pouvant être combinées dans une approche théranostique

Le test compagnon met en évidence la présence d'un récepteur, surexprimé sur les cellules cancéreuses ou sur les néovaisseaux, qui peut être ciblé au cours du traitement. Ainsi, des composés identiques ou ayant des propriétés de spécificité et de biodistribution très similaires doivent être utilisés pour le test compagnon et le traitement. En imagerie, des mesures de dosimétrie (dose absorbée, énergie absorbée par unité de masse de tissus) permettent de fixer la dose et le nombre de doses nécessaires pour un traitement par RTIV avec un MRP émetteur α ou β . Il permet également d'évaluer les risques du traitement quant à une toxicité sur un organe sain qui recevrait une forte dose due à sa bonne affinité pour le radiopharmaceutique (Figure 23).

L'approche théranostique inclut également le *monitoring* du traitement par imagerie afin de surveiller la réponse thérapeutique (diminution de la taille des tumeurs ou de leurs nombres) et de moduler la prise de médicament en fonction des résultats (modification du nombre de doses prescrites, adaptation de la dose injectée) pour ajuster et affiner encore mieux le traitement. L'approche théranostique s'insère donc dans la notion de médecine personnalisée, qui est l'opposé de l'approche dite « de masse », avec laquelle des patients ayant un cancer évoluant différemment, sont soignés avec le même traitement et selon le même protocole. En conséquence, le patient y voit un double bénéfice, une thérapie ciblée plus efficace et des effets secondaires minimisés.^[160]

6.2. L'approche théranostique en médecine nucléaire

Dans le cas de la dualité imagerie nucléaire TEP/TEMP et RTIV, le principe consiste à utiliser des radiopharmaceutiques radiomarqués par des émetteurs β^+ pour l'imagerie TEP, γ pour l'imagerie TEMP et α ou β^- pour la RTIV ciblant le même récepteur (Figure 24).

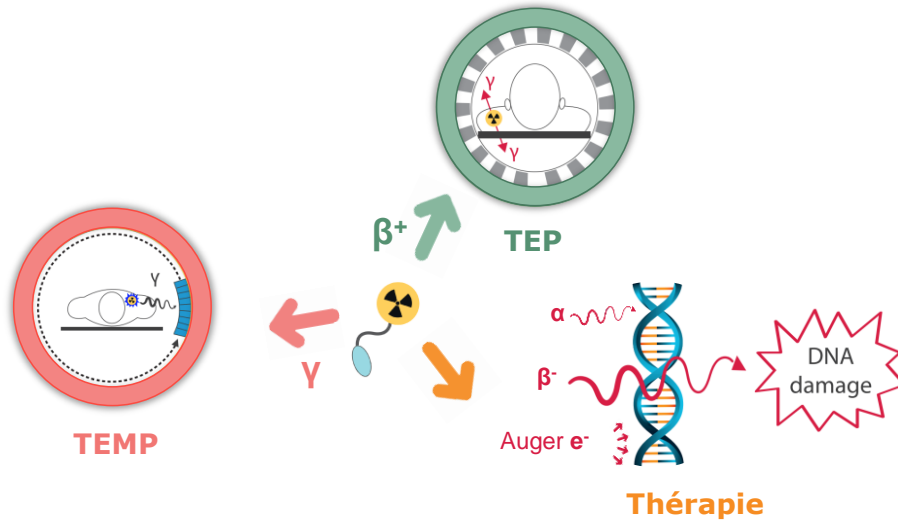


Figure 24 : L'approche théranostique en médecine nucléaire

Il existe trois stratégies employées en théranostic pour la médecine nucléaire (Figure 25) :

- des précurseurs de marquage différents radiomarqués avec une paire dépareillée (*mismatched pair*),
- des précurseurs de marquage identiques radiomarqués avec une paire dépareillée^[161],
- des précurseurs de marquage identiques radiomarqués avec une paire appariée (*matched pair*)^[62].

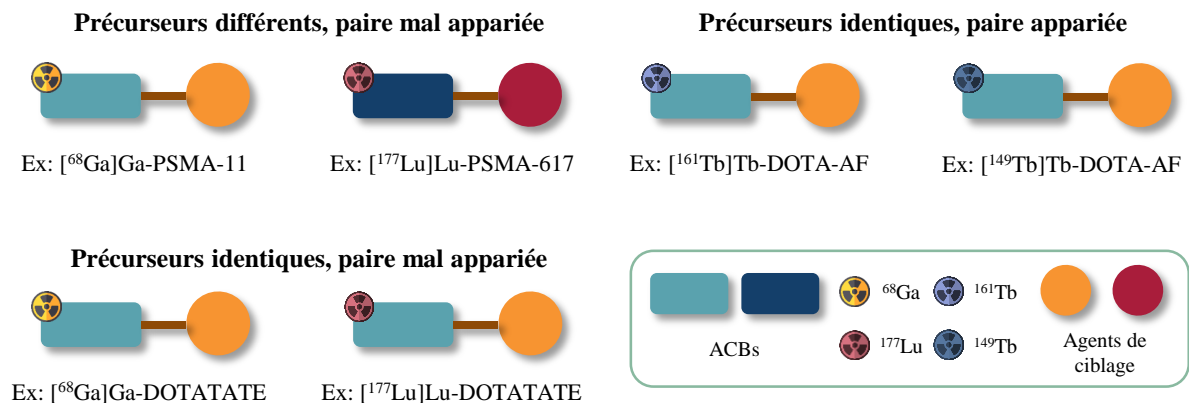


Figure 25 : Les différentes stratégies théranostiques employées en médecine nucléaire

Pour la première stratégie, les deux radiopharmaceutiques sont différents par la nature du chélatant ou de l'agent de ciblage utilisés et conduisent donc à des radiopharmaceutiques ayant

des propriétés de biodistribution différentes. Pour le moment, cette stratégie est la plus aboutie puisque plusieurs couples théranostics de ce type sont sur le marché et utilisés en routine clinique (Tableau 11). Ainsi, le couple [^{68}Ga]Ga-DOTATOC/[^{177}Lu]Lu-DOTATATE (même chélatant mais agents de ciblage différents) est utilisé pour le diagnostic et le traitement des TNE par ciblage des récepteurs de la somatostatine^[7,162] et le couple [^{68}Ga]Ga-PSMA-11/[^{177}Lu]Lu-PSMA-617 (même agent de ciblage mais chélateurs différent) est utilisé pour le diagnostic et le traitement du cancer de la prostate.^[34,163]

Tableau 11 : Exemples de MRP théranostics basés sur la première stratégie ^[158,164]

Indication clinique	Agent diagnostique	Agent thérapeutique
Métastases osseuses et cancer de la prostate	[$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-MDP	[^{223}Ra]RaCl
TNE	[^{68}Ga]Ga-DOTATOC	[^{177}Lu]Lu-DOTATATE
Cancer de la prostate	[^{68}Ga]Ga-PSMA-11	[^{177}Lu]Lu-PSMA-617

Concernant la deuxième stratégie, seule une différence de charge est à noter par l'utilisation de radioéléments différents. Ainsi, l'utilisation de paires dépareillées est viable pour une application théranostique, car les différences de propriétés de biodistribution sont négligeables. Cette stratégie facilite grandement le développement de nouveaux radiopharmaceutiques (Tableau 12). Par exemple, le couple [^{68}Ga]Ga-DOTATATE/[^{177}Lu]Lu-DOTATATE est utilisé pour le diagnostic et le traitement des TNE par ciblage des récepteurs de la somatostatine.^[7,162] Le [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 (PluvictoTM) est utilisé en routine clinique pour le traitement du CPMRC et son analogue au gallium-68, le [^{68}Ga]Ga-PSMA-617, est actuellement en cours d'étude clinique pour une utilisation en imagerie TEP.^[165,166]

La dernière stratégie consiste à radiomarquer par des paires appariées. Des ligands identiques, comme par exemple le couple [^{123}I]/[^{131}I]iobenguane, est la stratégie la plus dure à mettre en place. En effet la majorité des radioémetteurs utilisés dans les paires appariées ne sont pas encore utilisés en routine clinique, ce qui limite sérieusement cette approche (Tableau 12).

Les radionucléides utilisés dans la deuxième et troisième stratégie sont essentiellement des radiométaux complexés grâce à la chimie de coordination. Cela est dû au fait que les émetteurs β^- et α sont des métaux de transition ou des terres rares.

Tableau 12 : Exemples de radiopharmaceutiques identiques radiomarqués par des paires appariées ou dépareillées, utilisées dans l'approche théranostique

Paire	Traceur	Application	Référence
Paires appariées			
$^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$	MeCOSar-Tz	Carcinome colorectal	[167-169]
	Sar-PSMA	Cancer de la prostate	
	chCE7F(ab') ₂	Neuroblastome	
$^{44}\text{Sc}/^{47}\text{Sc}$	DOTA-AB-Folate	Cancer de l'ovaire	[170]
$^{86}\text{Y}/^{90}\text{Y}$	RGD-Glu-[DO3A]-6-Ahx-RM2	Cancer de la prostate	[171,172]
	DTPA-ALT836	Cancer du pancréas	
$^{123}\text{I}/^{131}\text{I}$	$^{123}\text{I}/^{131}\text{I}$	Cancer de la thyroïde	[173]
	Iobenguane	Tumeurs adrénégiques	
$^{149}\text{Tb}/^{152}\text{Tb}/^{155}\text{Tb}/^{161}\text{Tb}$	DOTA-AB-Folate	Cancer de l'ovaire	[43]
Paires dépareillées			
$^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$	DOTATATE	TNE	[7,162]
	DOTATOC		
$^{68}\text{Ga}/^{44}\text{Sc}/^{177}\text{Lu}$	PSMA-617	Cancer de la prostate	[165]
$^{64}\text{Cu}/^{90}\text{Y}$	NOTA-AB-RGD	Glioblastome	[174]
$^{18}\text{F}/^{131}\text{I}$	ICF15002	Mélanome pigmentaire	[175]
$^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$	Rituximab	Lymphome non Hodgkinien	[68,176]
$^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$	Ibritumomab	Lymphome non-Hodgkinien	[164]

AB : Entité liant l'albumine

6.3. Les radiopharmaceutiques théranostiques

Il existe peu de molécules pouvant être marquées par un radionucléide diagnostic et thérapeutique. Trois stratégies bien distinctes pour le développement de radiopharmaceutiques théranostiques existent :

- L'utilisation d'un précurseur de marquage identique composé d'une cage cyclique marquée avec différents radionucléides en fonction de son utilisation.
- L'utilisation d'un précurseur de marquage combinant deux sites de marquage ; un ACB pour le marquage de radiométaux et un site pour la fixation de GP pour le marquage au fluor-18.
- L'utilisation d'un précurseur de marquage identique composé d'une cage hybride cyclique/acyclique marquée avec différents radionucléides en fonction de son utilisation.

La première stratégie est la plus répandue car elle consiste à employer des cages communément utilisées et bien connues en médecine nucléaire et d'étudier leur capacité à complexer un large panel de radionucléides. La deuxième stratégie est très peu répandue puisque seuls deux articles traitant de ce sujet ont été recensés.^[177,178] Concernant la troisième stratégie, l'équipe de Cleeren a démontré en 2021 une potentielle utilisation d'une cage hybride cyclique/acyclique pour la complexation de radionucléides diagnostiques et thérapeutiques ayant des diamètres et des nombres de coordination nécessaires très différents.^[179]

6.3.1. Les chélateurs cycliques utilisés en théranostic

Certains agents chélatants présentés Partie 3.2.1. du Chapitre 1 peuvent être complexés par des radiométaux diagnostiques et thérapeutiques. C'est le cas principalement de la cage DOTA qui permet l'obtention de complexe au gallium-68, cuivre-64 ou scandium-44 pour l'imagerie TEP, à l'indium-111 pour l'imagerie TEMP, et au lutécium-177 ou actinium-225 pour la RTIV. Malheureusement, la cage DOTA ne permet pas la complexation à l' $Al^{18}F$, limitant ainsi le développement de radiopharmaceutiques avec le couple dépareillées $^{18}F/^{177}Lu$. Afin de pallier cela, l'apparition de composés hydrides a vu le jour.

6.3.2. Les agents multi-marquables

Les agents multi-marquables possèdent la capacité d'être marqués par deux radionucléides différents sur deux sites différents de la molécule. Ils comportent un agent chélatant pour la complexation de radiométaux diagnostics ou thérapeutiques ainsi qu'un site pour le radiomarquage au fluor-18 *via* l'emploi de GP ou échange isotopique.

Rosecker *et al.* sont les premiers à avoir développé un agent théranostique pour le radiomarquage au fluor-18, yttrium-90, lutécium-177 et holmium-166 nommé ACUPA pour le diagnostic et le traitement du cancer de la prostate.^[177] Le précurseur de marquage comprend une cage DOTA pour le marquage des radiométaux, et d'une fonction alcyne pour la fixation du GP [^{18}F]fluoroéthyle par chimie click CuAAC (Figure 26). Enfin, le composé possède également une fonction tétrazine permettant le couplage par chimie click de l'agent de ciblage PSMA-*trans*-cyclooctène. La preuve de concept du radiomarquage au fluor-18, yttrium-90, lutécium-177 et holmium-166 a été réalisée avec succès mais seul le composé [^{18}F]F-Y-ACUPA (de l'yttrium est complexé dans la cage DOTA avant radiofluoration) a été évalué *in vitro* donnant encore peu de conclusion sur son utilisation en théranostic.

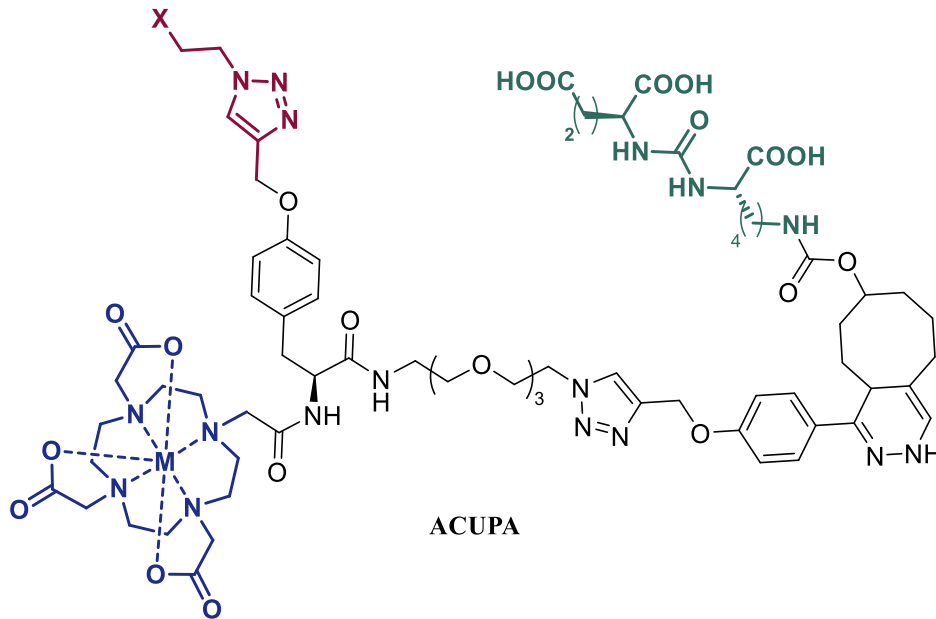


Figure 26 : Structure chimique de ACUPA (si $M = Y, Lu$ ou Ho , alors $X = {}^{18}F$, si $M = {}^{90}Y, {}^{177}Lu$ ou ${}^{166}Ho$, alors $X = F$). Bleu : cage DOTA pour la complexation des radiométaux, rouge : GP pour le radiomarquage au fluor-18, vert : agent de ciblage DUPA.

En parallèle, Lepage *et al.* ont été les premiers à développer un agent théranostique pour le radiomarquage au fluor-18, cuivre-64 et lutécium-177 nommé DOTA-AMBF₃-PSMA.^[178] Le précurseur de radiomarquage comprend un cycle DOTA pour radiomarquer le cuivre-64 et le lutécium-177 et un GP organotrifluoroborate pour le radiomarquage au fluor-18 (Figure 27A). Dans le cas du radiomarquage au fluor-18, la cage DOTA peut-être préalablement complexée au cuivre ou au lutécium pour que les radiopharmaceutiques aient une biodistribution la plus similaire possible. Des essais d'imagerie des trois radiopharmaceutiques TEP sur des souris porteuses d'une tumeur cancéreuse de la prostate ont montré une bonne fixation sur la tumeur. Des études de biodistribution des quatre radiopharmaceutiques montrent une bonne fixation sur la tumeur ainsi qu'une internalisation au niveau des reins (Figure 27B,C). Cependant, le design de ce radiopharmaceutique n'a pas été pensé pour changer d'agent de ciblage et ainsi diagnostiquer et traiter d'autres types de cancers.

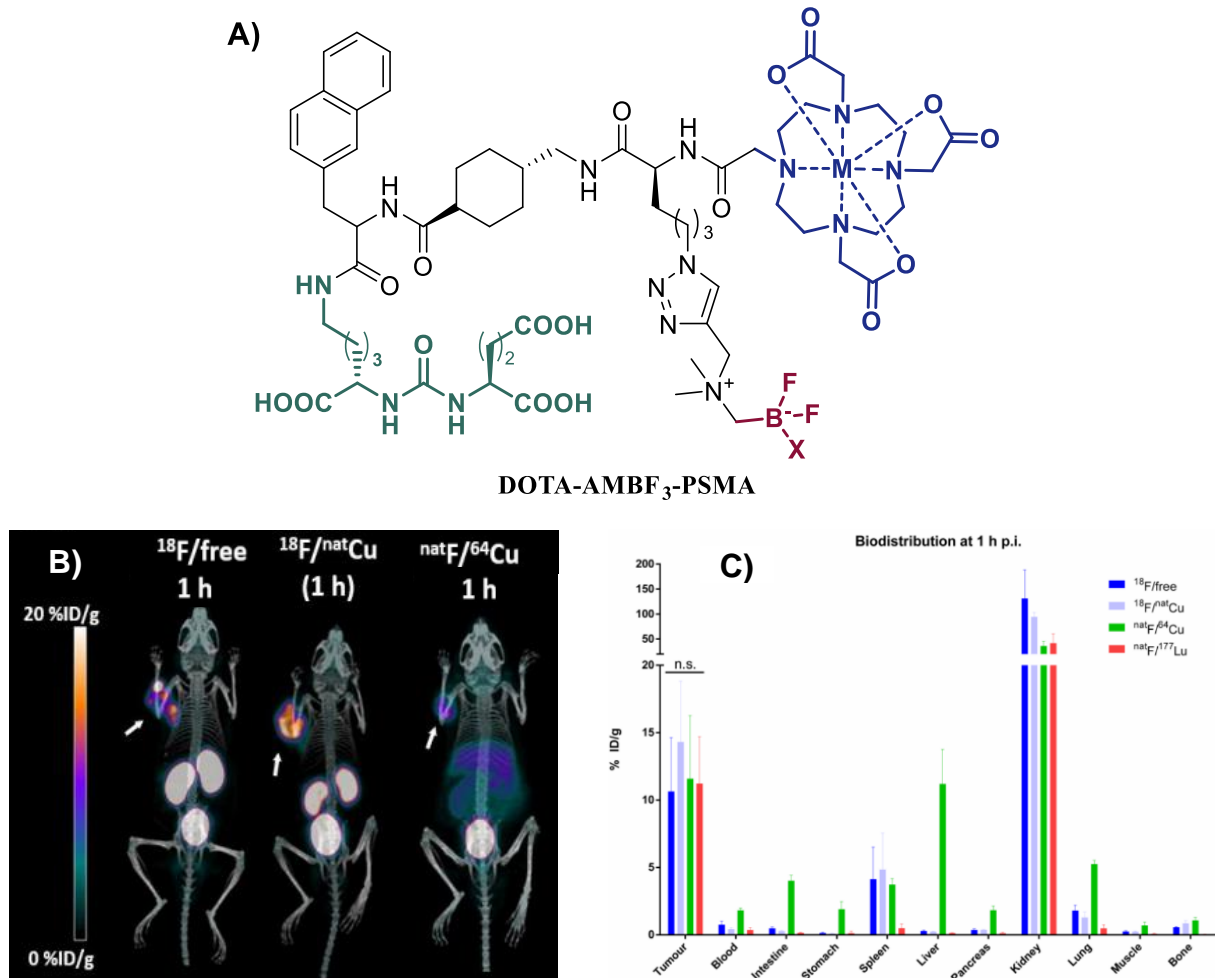


Figure 27 : **A)** Structure chimique du DOTA-AMBF₃-PSMA (si M = Cu ou Lu, alors X = ¹⁸F, si M = ⁶⁴Cu ou ¹⁷⁷Lu, alors X = F). Bleu : DOTA pour complexation des radiométaux, rouge : GP pour radiomarquage au fluor-18, vert : agent de ciblage DUPA. **B)** Images TEP/scanner acquises à 1 h post-injection avec des radiopharmaceutiques ayant les compositions isotopiques suivantes : (¹⁸F/libre), (¹⁸F/^{nat}Cu) et (^{nat}F/⁶⁴Cu). Les flèches blanches indiquent l'emplacement de la tumeur. **C)** Biodistribution *ex vivo* du ¹⁸F/libre (bleu foncé), ¹⁸F/^{nat}Cu (bleu clair), ^{nat}F/⁶⁴Cu (vert) et ^{nat}F/¹⁷⁷Lu (rouge). %ID/g = % Dose injectée par gramme de tissu (cd). Reproduit de [178] avec la permission de John Wiley and Sons, Copyright 2020

Les stratégies proposées par Lepage *et al.* et Rosecker *et al.* possèdent cependant l'inconvénient d'employer la chimie click CuAAC pour le couplage du GP. Cela implique donc un contact entre la molécule et du cuivre pouvant se complexer sur la cage DOTA. De plus, le motif de reconnaissance DUPA est fortement modifié (espaceur, cage DOTA et GP) pouvant impliquer une forte modification de son affinité pour les récepteurs PSMA.

6.3.3. Les chélatants théranostiques multi-isotopes

Dans le but de donner accès à des agents chélateurs radiomarqués avec un large panel de radiométaux ayant des propriétés physiques très variées, le développement d'agents chélateurs

hybrides cycliques/acycliques a émergé. En 2008, l'équipe de Chong a développé la cage NETA (acide {4-[2-(bis-carboxyméthylamino)-éthyl]7-carboxyméthyl-[1,4,7]triazonan-1-yl}acétique) pour le radiomarquage au lutécium-177 et au bismuth-212/213.^[180] Il s'agit d'une cage hybride cyclique/acyclique composée d'une cage NOTA et de deux bras chélatants. À la vue des résultats encourageants obtenus, l'équipe a poursuivi le développement des cages hybrides cycliques/acycliques en proposant une cage de deuxième génération en 2011, C-NET3A,^[181] et de troisième génération avec 3p-C-NETA^[182-184] et 5p-C-NETA en 2012.^[185] Ces cages ont été marquées avec des radionucléides pour l' α - et la β^- -thérapie comme l'yttrium-90, le lutécium-177, le bismuth-212/213 ou le plomb-212. En 2012, l'équipe a également développé la cage 3p-C-DEPA, correspondant à l'analogue « DOTA » de C-NETA pour le radiomarquage au bismuth-212 et bismuth-213 pour une application en α -radioimmunothérapie (Figure 28).^[182,186,187]

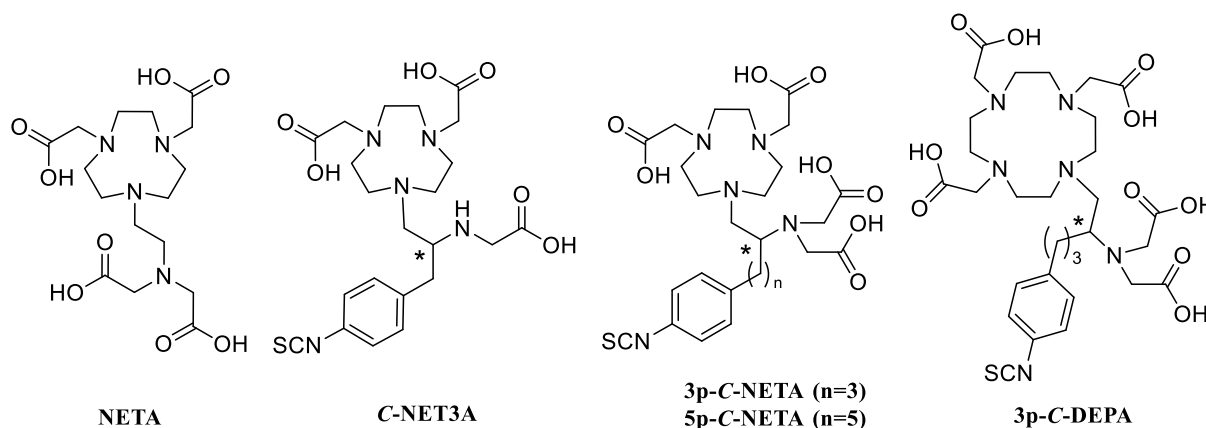


Figure 28 : Structures chimiques des cages NETA, C-NET3A, 3p-C-NETA, 5p-C-NETA et 3p-C-DEPA (* : carbone asymétrique)

Ce n'est qu'en 2022 que Ahenkorah *et al.* ont présenté des résultats très prometteurs quant à l'utilisation de 3p-C-NETA pour le radiomarquage à l' ^{18}F . L'équipe a également radiomarké la cage au gallium-68 mais les résultats, sont quant à eux, moins satisfaisants.^[179] L'engouement envers l'approche théranostique a probablement poussé l'équipe à étudier la capacité de radiomarquage de leurs cages hybrides par des radionucléides pour l'imagerie TEP. En effet, ce type de cage hybride s'insère parfaitement dans l'objectif de conserver les mêmes propriétés biologiques dans le diagnostic et dans la thérapie pour les inclure dans une approche théranostique. Ils peuvent complexer des radioéléments de petits diamètres et nécessitant un nombre de liaisons de coordination de 5 à 6 comme le gallium-68, le cuivre-67 et l'aluminium-fluor-18 par la cage NOTA et des radioéléments plus gros et nécessitant un nombre de liaisons de coordination plus important de 7 à 10 comme l'yttrium-90, le lutécium-177, le bismuth-

212/213 ou le plomb-212 par la cage NOTA et les bras chélatants. Le Tableau 13 ci-dessous (inspiré de la revue de Price et Orvig^[64]) décrit le nombre de liaisons de coordination pouvant être établies avec un agent chélatant et les radionucléides les plus adaptés pour chaque agent.

Tableau 13 : Propriétés de complexation de chélatants théranostiques pour certains radiométaux

ACB	Donneurs	Liaisons de coordination	Radiométal	Stabilité ^a	Conditions de radiomarquage
3p-C-DEPA	N ₅ O ₅	10	^{212/213} Bi		25°C, 5-10 min, pH 5,5
3p-C-NETA	N ₄ O ₄	8	Al ¹⁸ F		100°C, 10 min, pH 4,0, EtOH
5p-C-NETA			⁶⁷ Cu		95°C, 12 min, pH 5,2
			⁶⁸ Ga		95°C, 60 min, pH 5,8
			¹⁷⁷ Lu		25°C, 5 min, pH 4,5
			^{86/90} Y		25°C, 5 min, pH 4,0
			^{212/213} Bi		25°C, 5 min, pH 4,0
			²¹² Pb		25°C, 5 min, pH 4,0
			²²⁵ Ac		25°C, 1 h, pH 8,5

^a Complexation : vert : optimale, orange : non optimale, rouge : ne permettant pas l'obtention de complexes stables, ^b : log K_{ML}

7. Objectif de la thèse

L'objectif de cette thèse est de développer un nouvel ACB pouvant être marqué à l'aluminium-fluor-18, au gallium-68 et au lutécium-177 pour le développement de radiopharmaceutiques théranostiques pouvant être utilisés pour le diagnostic par imagerie TEP et pour le traitement par RTIV. Ce projet de thèse s'inscrit dans une volonté de Nancyclotep de développer l'approche théranostique et la médecine personnalisée pour le service de médecine nucléaire du CHRU de Nancy.

L'utilisation d'un même ACB pour la complexation de l'aluminium-fluor-18, du gallium-68 et du lutécium-177 n'ayant jamais été décrit au début de cette thèse, la première étape de cette thèse est donc de développer un nouvel ACB et de réaliser la preuve de concept que ce dernier peut complexer les trois éléments de manière stable. Pour atteindre cet objectif, nous avons choisi de combiner trois entités pour le développement de ce nouvel ACB (Figure 29) :

- Un agent chélatant hydride cyclique/acyclique nommé **NO2A-AHM** pour la complexation de l'aluminium-fluor-18, au gallium-68 et au lutécium-177,

- Un bras espaceur permettant d'insérer un espacement entre l'agent chélatant et l'agent de ciblage afin de limiter au possible la potentielle perte d'affinité des agents de ciblage après modification
- Une fonction maléimide afin de coupler divers agents de ciblage par réaction de chimie click thiol-maléimide (CCTM) à l'agent chélatant

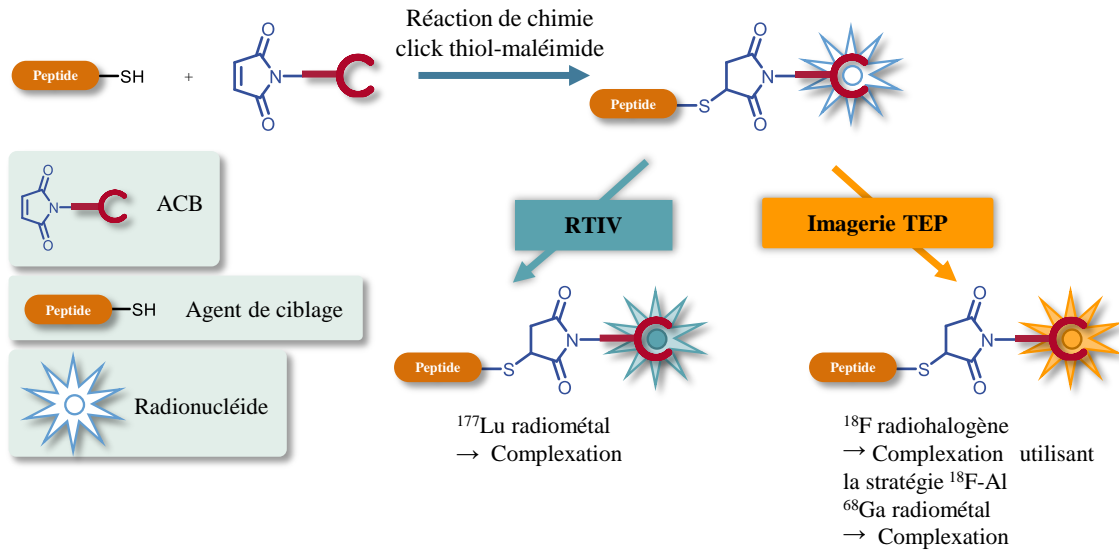


Figure 29 : Objectif de la thèse

La synthèse du nouvel ACB devra être réalisée afin de conduire des études de complexation de l'aluminium-fluor-18, au gallium-68 et au lutécium-177 pour savoir si le nombre de liaisons de coordination formées par le nouvel ACB peut être modulé en fonction de la nature du métal complexé (5, 6 et 7 liaisons de coordination pour l'aluminium-fluor-18, le gallium-68 et le lutécium-177, respectivement). Des études de complexation seront menées par RMN et modélisation moléculaire. Dans un second temps, ce nouvel ACB sera couplé à divers agents de ciblage afin de réaliser la preuve de concept que ce dernier peut être couplé à un large panel d'agent de ciblage, permettant ainsi d'utiliser l'ACB pour le diagnostic et le traitement de différents types de cancers. Enfin, des études de radiochimie seront menées afin de réaliser la preuve de concept que le nouvel ACB peut être radiomarqué à l'aluminium-fluor-18, au gallium-68 et au lutécium-177. Cependant une mise en œuvre de la radiochimie avec la stratégie Al¹⁸F devra être mis en œuvre car ce type de radiochimie n'est pas connu à Nancyclotep.

CHAPITRE 2 : CONCEPTION
ET SYNTHÈSE D'UN
NOUVEL AGENT
CHÉLATANT
BIFONCTIONNEL

1. Objectifs

L'objectif est de concevoir un nouvel ACB ayant la faculté d'être radiomarqué soit par du fluor-18, du gallium-68 et du lutécium-177 pour s'inscrire dans une démarche dite « théranostique ». Ce nouvel ACB doit également pouvoir se coupler à un large panel d'agents de ciblage (*i.e.*, adaptés au ciblage d'une pathologie donnée) pour lui conférer une sélectivité accrue au niveau du diagnostic et du traitement. Ce Chapitre 2 présente le choix du design du nouvel ACB ainsi que les différentes voies de synthèse testées permettant son obtention.

2. Intérêt des hydrazines comme plateformes polyfonctionnalisables

2.1. L'hydrazine, une plateforme polyfonctionnalisable

L'hydrazine de formule brute N_2H_4 (Figure 30) est composée de deux groupements amines primaires, reliés entre-eux par une liaison covalente, pouvant être chacun bifonctionnalisé. Ainsi, ce petit motif peut accueillir jusqu'à quatre groupements différents ayant des propriétés et rôles complémentaires.

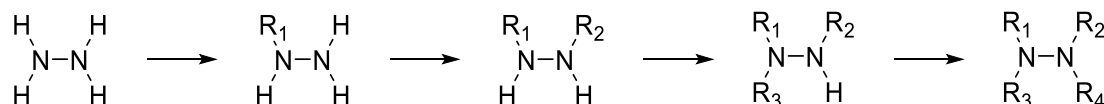


Figure 30 : L'hydrazine et sa polyfonctionnalisation

De nombreuses réactions employant une amine peuvent être utilisées pour fonctionnaliser une hydrazine, ce qui en fait un motif de choix pour le développement de plateformes polyfonctionnalisées telles que les ACB. Les composés comportant une fonction hydrazine ne présentent pas de carbone asymétrique, limitant ainsi le nombre de stéréoisomères (*i.e.*, énantiomères ou diastéréoisomères) pouvant être formés. La fonction hydrazide correspond à l'association d'un groupement amide et amine ce qui induit la possibilité de former des diastéréoisomères géométrique de configuration *Z* ou *E* en fonction de si les atomes d'oxygène et azote^β se retrouvent du même côté ou de part et d'autre de la liaison C(O)-N. Les hydrazides présentent une rotation ralentie de la liaison $N^{\alpha}-N^{\beta}$ limitant l'interconversion *Z/E* de la liaison C(O)-N (Figure 31). En effet, la position du groupement R₁ (plus encombrant que l'atome d'oxygène du groupement carbonyle) en vis-à-vis de l'atome d'azote N^{α} disubstitué provoque une gêne stérique plus importante chez l'isomère *E*. Ainsi, cette rotation ralentie de la liaison

hydrazide favorise la conformation Z.^[186] La présence d'un azote chiral peut être observée chez des composés comportant une fonction hydrazide.

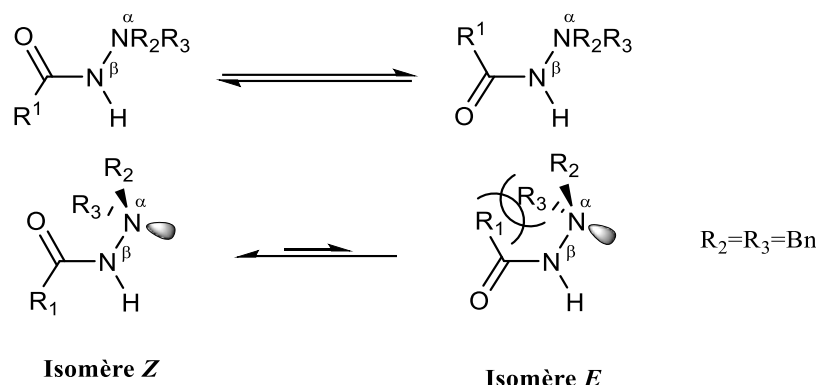


Figure 31 : Isomérisation Z/E des hydrazides^[188]

2.2. Les motifs hydrazine et hydrazide en chimie médicinale

Le motif hydrazine trouve un intérêt pharmacologique puisque plusieurs principes actifs comportant une fonction hydrazine sont commercialisés. A titre d'exemple, nous pouvons citer l'agent antiparkinsonien Carbidopa (Lodosyn[®]), l'Hydralazine (Apresoline[®]) utilisé comme vasodilatateur pour traiter l'hypertension artérielle, ou bien l'antidépresseur Isocarboxazid (Marplan[®]).^[189] Ce motif se retrouve également dans les aza-peptides ayant également des propriétés thérapeutiques tels que l'analogue des Smac protéines Aza-Ala-Pro, utilisé pour l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses du sein, ou bien le MW4, employé comme inhibiteur des protéases à cystéine pour lutter contre l'arthrite rhumatoïde (Figure 32).^[190,191]

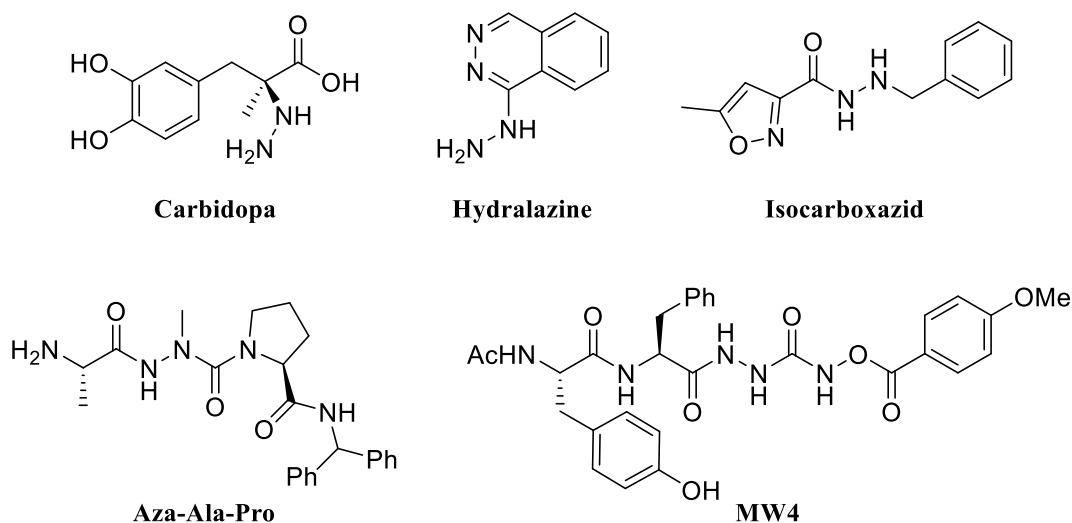


Figure 32 : Structures chimiques de principes actifs possédant un motif hydrazine^[189-191]

2.3. La synthèse d'hydrazines polyfonctionnalisées

Les hydrazines polyfonctionnalisées peuvent être synthétisées de plusieurs manières. En effet, le motif hydrazine peut être fonctionnalisé à l'aide de réaction d'alkylation, d'amidation par exemple, ou deux composés présentant des fonctions d'intérêts peuvent être couplé à l'aide d'une réaction formant un motif hydrazine. Voici les exemples les plus utilisés pour d'obtention d'hydrazines fonctionnalisées :

- À partir d'une amine primaire

Cette réaction utilise une amine primaire et fait appel à la formation d'un sel de diazonium intermédiaire, à l'aide de nitrite de sodium, suivi de sa réduction sous l'action du sulfite de sodium en milieu acide (Schéma 10).^[192]

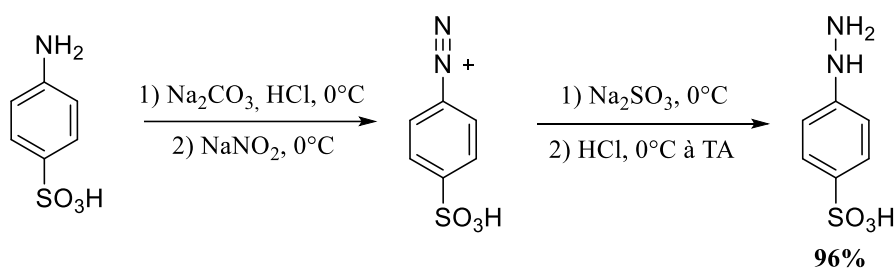


Schéma 10 : Formation d'une hydrazine à partir d'une amine primaire^[192]

- À partir d'une hydrazone

Cette réaction consiste en la réduction d'une hydrazone (*i.e.*, généralement synthétisée à partir d'une hydrazine et d'un aldéhyde) par un dérivé de bore (cyanoborohydrure de sodium^[193] ou complexe borane-tétrahydrofurane^[194]) ou par du palladium sur charbon (Pd/C)^[195] (Schéma 11).

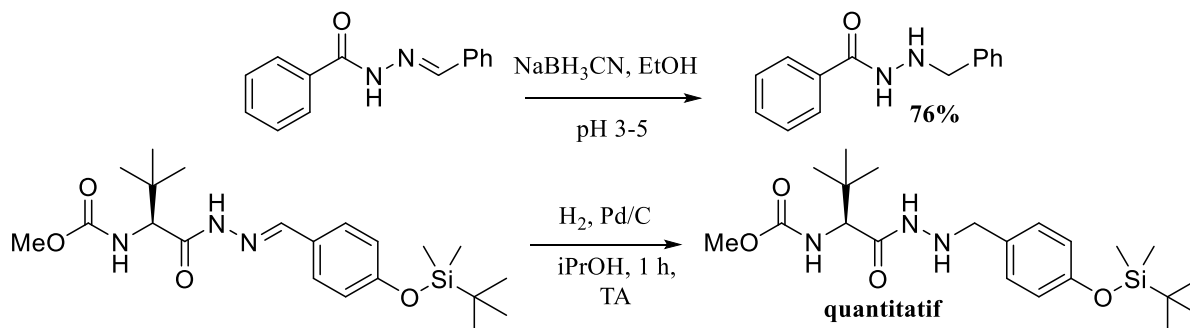


Schéma 11 : Formation d'hydrazines par réduction d'hydrazones^[193,195]

• Fonctionnalisation d'une hydrazine libre par S_N2 :

La S_N2 est l'une des stratégies les plus employées pour fonctionnaliser une hydrazine et s'effectue en milieu basique à partir d'un dérivé halogéné comme groupe partant (Schéma 12). Cette réaction permet la formation d'une liaison C-N en utilisant le caractère nucléophile des amines de l'hydrazine. En utilisant un équivalent (équiv.) de *n*-BuLi et 1 équiv. de R₃Br, l'équipe de Mæorg réalise une fonctionnalisation de l'amine la plus basique et nucléophile.^[196] Cela conduit à la formation d'une hydrazine trisubstituée sans formation d'une hydrazine tetrasubstituée par réaction de dialkylation.

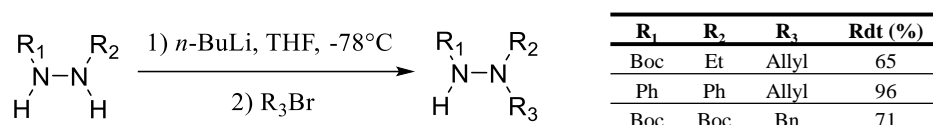


Schéma 12 : Fonctionnalisation d'une hydrazine par S_N2^[196]

À titre d'exemple, l'équipe de Le Grel a synthétisé des α -hydrazinoglycines N ^{β} -protégés à partir d' α -halogénoesters avec des rendements allant de 35% à 99% (Schéma 13).^[197,198]

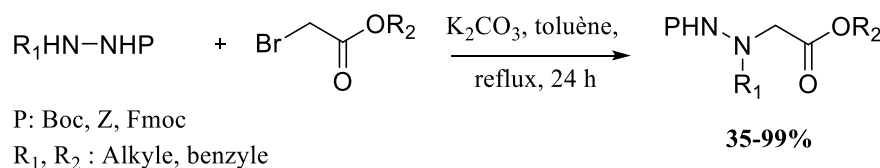


Schéma 13 : Réaction de S_N2 entre un α -bromoester et une hydrazine^[197,198]

D'autre exemple de la littérature montre que la réaction de S_N2 peut être réalisée sur des composés possédant un groupement triflate comme groupe partant. Hoffman *et al.* et Acherar *et al.* ont décrit la synthèse d' α -N ^{α} -R₁-hydrazinoesters à partir d' α -hydroxyesters activés par un triflate (Schéma 14).^[199-201] Par rapport à la méthode d'Hoffman, celle d'Acherar *et al.* permet d'économiser un équiv. d'hydrazine et de travailler à l'échelle du multi-gramme.

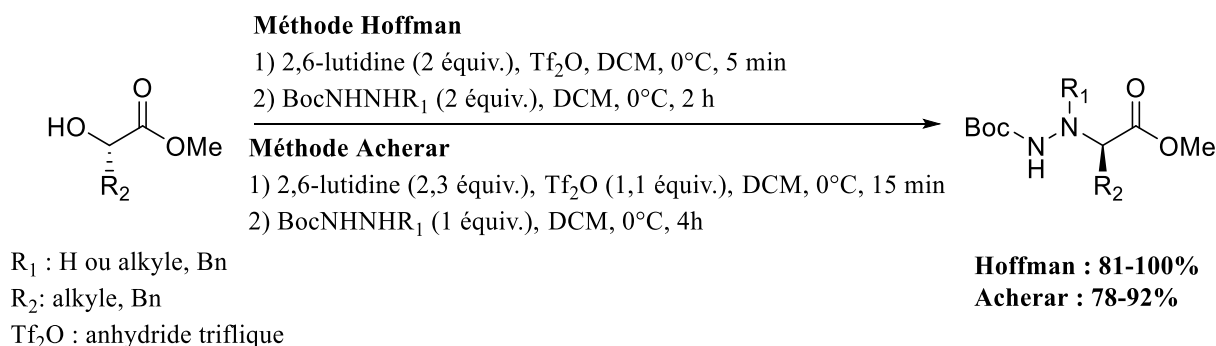


Schéma 14 : Réaction de S_N2 entre un α -hydroxyester et une hydrazine^[197-199]

- Fonctionnalisation d'une hydrazine libre par réaction de Mitsunobu :

L'équipe de Jamart-Grégoire a montré la possibilité de fonctionnaliser une hydrazine par des groupements alkyles, benzyles ou allyles par la réaction de Mitsunobu en passant par la formation d'un dérivé phthalimide (Schéma 15).^[202]

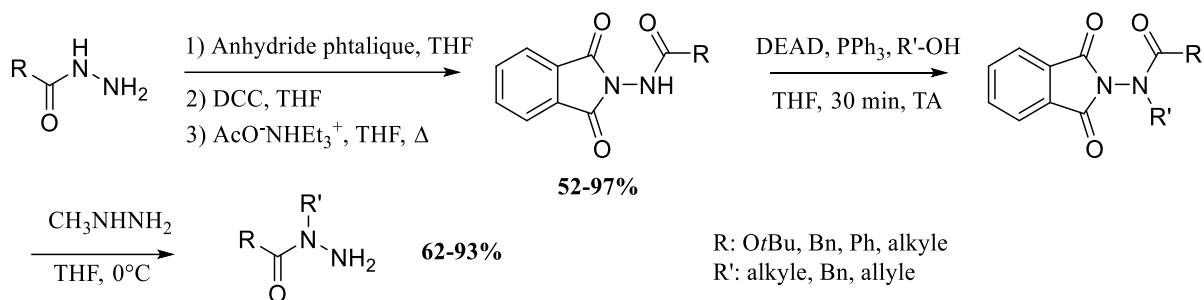


Schéma 15 : N-alkylation ou N-acylation de dérivés d'hydrazine par réaction de Mitsunobu^[202]

- Fonctionnalisation d'une hydrazine libre par création d'un lien hydrazide

Cette réaction consiste à créer un lien hydrazide entre une hydrazine et un acide carboxylique par couplage peptidique. Il existe de nombreuses stratégies permettant l'activation de l'acide carboxylique, comme la formation d'un intermédiaire succinimide ou chlorure d'acide. Il est également possible d'employer des conditions de couplage peptidique utilisées en SPPS (activateur tels que HBTU (2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate), HATU (1-[bis(diméthylamino)méthylène]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxidhexafluorophosphate), PyBOP (hexafluorophosphate de benzotriazole-1-yloxytrypyrrolidinophosphonium) ou DIC (*N,N'* diisopropylcarbodiimide) en présence d'une base) (Schéma 16).^[203]

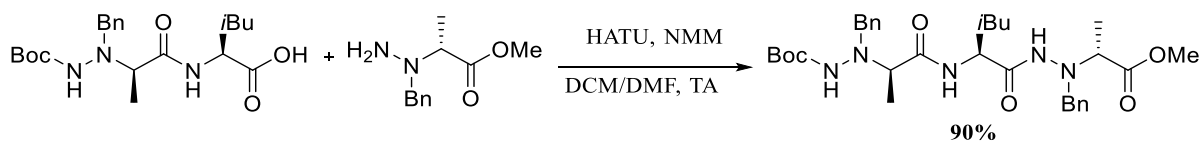


Schéma 16 : Formation d'un hydrazide à partir d'une hydrazine^[203]

- Fonctionnalisation d'une hydrazine libre par création d'un lien thiosemicarbazide

La réaction entre une hydrazine et une fonction thioisocyanate permet l'obtention d'une fonction thiosemicarbazide (Schéma 17).^[204]

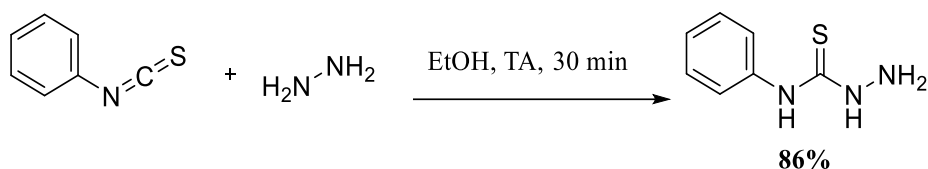


Schéma 17 : Synthèse d'un lien thiosemicarbazide à partir d'une hydrazine^[204]

3. Conception de l'agent chélatant bifonctionnel NO2A-AHM

La conception d'un nouvel ACB utilisable dans une approche dite « théranostique » pouvant complexer les radionucléides gallium-68 et fluor-18 pour l'imagerie TEP ainsi que le lutécium-177 pour la thérapie, nous a conduit à la construction d'un agent chélatant hybride cyclique/acyclique, nommé **NO2A-AHM**, décrit dans la Figure 33.

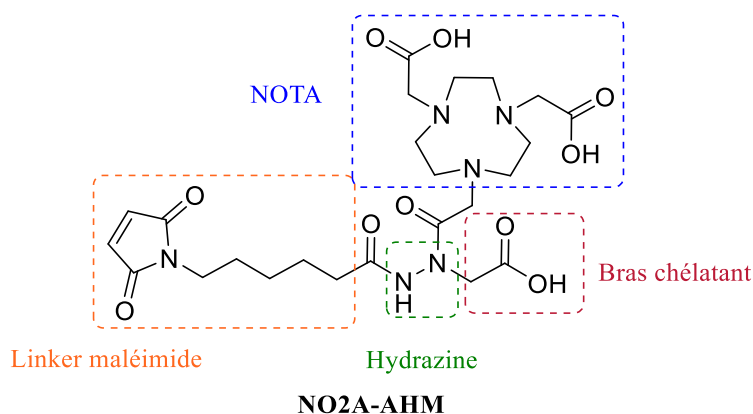


Figure 33 : Structure chimique du nouvel ACB (**NO2A-AHM**)

Cet agent chélateur hybride innovant **NO2A-AHM** comporte les éléments suivants :

- Un **cycle NOTA** (en bleu) capable d'accueillir des radionucléides de tailles différents allant des petits rayons ioniques comme l'aluminium jusqu'aux plus grands comme le lutécium. Ce cycle possède cinq groupes donneurs, de par la présence de 3 amines sur le cycle et de 2 acides carboxyliques, permettant la coordination avec le radiométal.
- Un **bras chélatant supplémentaire** (en rouge) portant 2 carbones et incluant une fonction acide carboxylique terminale pouvant également se coordonner au radiométal.
- Un **linker** (*i.e.*, bras maléimide) (en orange) comportant une fonction maléimide terminale afin de mettre en œuvre des réactions de CCTM avec un large panel d'agents de ciblage possédant une fonction cystéine. En effet, ces réactions ont l'avantage d'être

rapides et totales dans des conditions douces et d'être sélectives vis-à-vis de la fonction thiol du résidu cystéine. Cette sélectivité réactionnelle est un avantage en termes de synthèse puisqu'elle ne nécessite pas l'utilisation de groupements protecteurs.

- Un motif **hydrazine** (en vert) pour l'accrochage des différentes entités listées ci-dessus qui est également inerte vis-à-vis des peptidases et permettant une polyfonctionnalisation grâce à la présence de deux atomes d'azotes. Nous avons choisi d'introduire la cage chélatante et le bras supplémentaire sur le même azote de l'hydrazine pour garder une proximité spatiale de ces deux unités en vue de leur coopération lors de la coordination avec le radiométal.

4. Synthèse de NO2A-AHM

La stratégie de synthèse s'appuie sur une trifonctionnalisation de l'hydrazine. Compte tenu du coût d'achat du cycle NOTA, il a été décidé de le rajouter en dernier. Ainsi, pour l'addition des 2 autres motifs (bras chélatant supplémentaire et linker (bras maléimide)), les deux ordres d'ajout des entités sont envisagés : **(A)** bras chélatant, bras maléimide, NOTA et **(B)** bras maléimide, bras chélatant, NOTA (Figure 34).

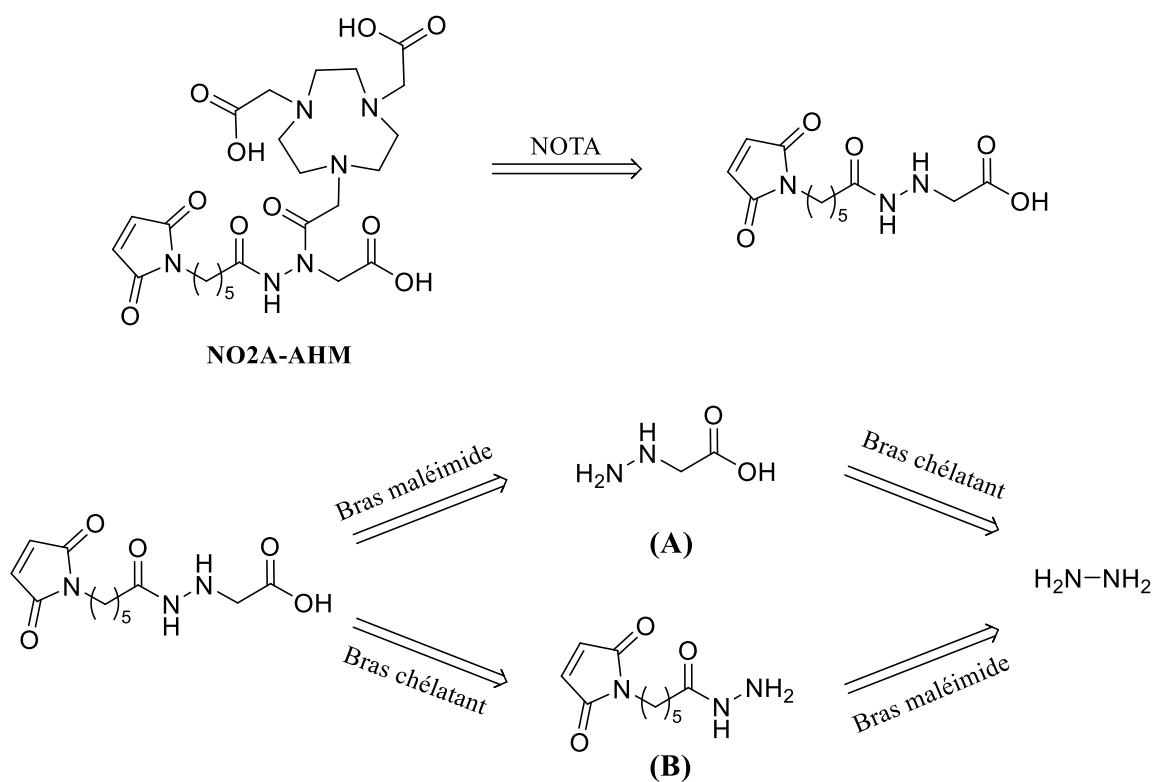


Figure 34 : Rétrosynthèse du composé **NO2A-AHM** selon les deux stratégies **(A)** et **(B)**

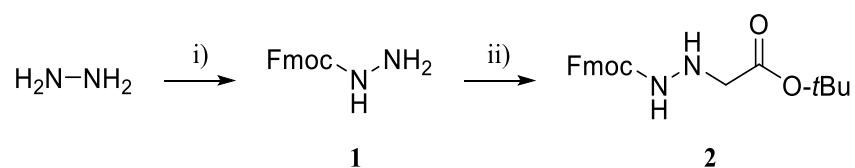
Le bras maléimide peut être facilement inséré sur l'hydrazine par couplage peptidique avec l'acide maléimidohexanoïque. L'addition du bras chélatant supplémentaire peut être effectuée par réaction S_N2 et le couplage avec la cage NOTA peut être réalisé en deux étapes, la première étant la fixation d'un espaceur par réaction d'acylation, la deuxième, le couplage à la cage NOTA par réaction S_N2.

Le choix des groupements protecteurs des fonctions réactives des différents éléments du composé dépend de l'ordre d'ajout des réactifs. Les fonctions acides carboxyliques du chélateur NOTA et du bras chélatant supplémentaire seront protégées par un groupement *t*Bu (*tert*-butyle) facilement labile en condition acide. Pour la stratégie (A), l'hydrazine doit être protégée par un groupement labile en conditions non acides afin qu'elle soit déprotégée après la fixation du bras chélatant protégé par un groupement *t*Bu. Dans le cas de la stratégie (B) le bras maléimide ne comportant pas de groupement protecteur, n'importe quel groupement peut être choisi pour protéger l'hydrazine lors de son couplage.

4.1. Synthèse de l'intermédiaire 5

4.1.1. 1^{ère} stratégie de synthèse de l'intermédiaire 5

La première stratégie de synthèse mise en œuvre consiste à suivre l'ordre d'ajout (A). Pour mimer la synthèse peptidique en stratégie Fmoc/*t*Bu (fluorénylméthoxycarbonyl/*tert*-butyle), le groupement protecteur Fmoc labile en milieu basique est sélectionné pour protéger l'hydrazine (Schéma 18).



Conditions et réactifs : (i) Fmoc-Cl, CH₃CN/H₂O (1/1, v/v), 0°, 0°C à TA, nuit, 91%, (ii) Br-CH₂-COO-*t*Bu, K₂CO₃, DMF, 0°C, 0°C to TA, nuit, 33%.

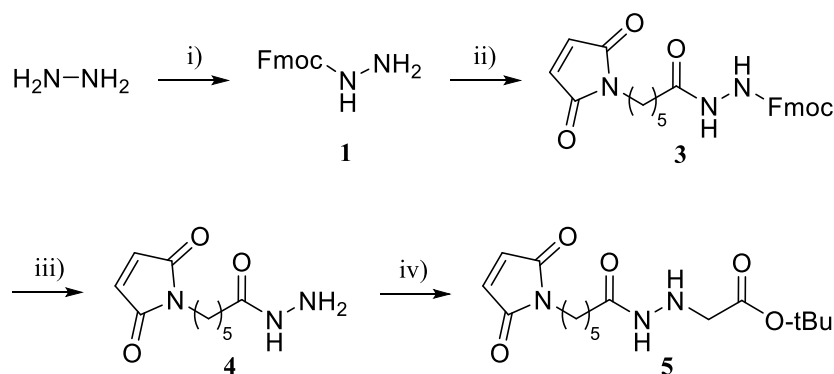
Schéma 18 : Première stratégie de synthèse du composé 2

La première étape, consiste à synthétiser le composé Fmoc-hydrazine **1** en utilisant une réaction d'acylation entre de l'hydrazine et du Fmoc-Cl avec un rendement de 91% suivant le protocole de Boeglin *et al.*^[205] Pour le choix de la méthode de couplage du bras chélatant, nous avons décidé de nous tourner vers l'utilisation d'une réaction de type S_N2. Le protocole de Cheguillaume *et al.* est suivi pour la réaction de S_N2.^[197] Après 15 heures de réaction, les composés de départ sont consommés et le brut de réaction comprend de nombreux sous-

produits non identifiés. Après une première purification sur gel de silice (éther de pétrole/EtOAc, 70/30, v/v), le produit **2** est isolé avec une pureté de 61%. Après réalisation d'une seconde purification (éther de pétrole/EtOAc, 90/10, v/v), la pureté du composé n'est pas améliorée (56%). La quantité de produit obtenue après ces deux purifications successives correspond à un rendement de 33% pour une pureté faible de 56%. Dans l'éventualité de l'obtention du composé pur **2** et de la déprotection du groupement Fmoc, l'étape suivante serait le couplage du bras maléimide. À ce moment-là, nous nous sommes rendu compte que la présence d'une amine secondaire sur le composé **2** déprotégé (sans protection Fmoc) pourrait conduire à la formation de sous-produit indésirable où le bras maléimide pourrait être couplé une fois sur l'amine secondaire et une à deux fois sur l'amine primaire. Vu la difficulté de purification du brut réactionnel et ce précédent constat, nous avons décidé d'abandonner cette stratégie de synthèse et de tester l'ordre d'ajout (**B**).

4.1.2. 2^{ème} stratégie de synthèse de l'intermédiaire **5**

La deuxième stratégie de synthèse consiste à suivre l'ordre d'ajout (**B**). Elle consiste à coupler le bras maléimide sur une hydrazine monoprotégée par un groupement Fmoc, suivie de la déprotection de ce groupement afin de coupler le bras chélateur supplémentaire *via* une réaction de type S_N2 (Schéma 19).

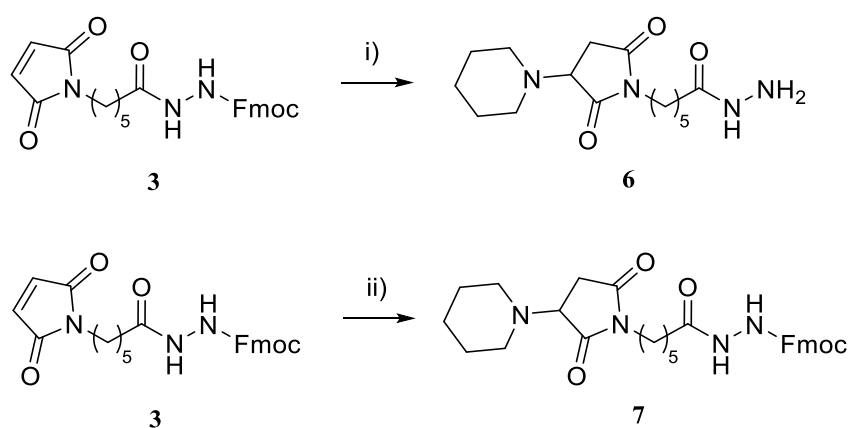


Réactifs et conditions : (i) Fmoc-Cl, CH₃CN/H₂O (1/1, v/v), 0°, 0°C à TA, nuit, 91%, (ii) acide maléimidohexanoïque, HATU, NMM, DCM/DMF (1/1, v/v), TA, 7 heures, 68%, (iii) DBU, DCM, 30 min, TA, produit non-isolé, (iv) DIPEA, Br-CH₂-COO-*t*Bu, DCM, 5 heures, produit non isolé.

Schéma 19 : Deuxième stratégie de synthèse du composé **5**

La première étape de cette deuxième stratégie de synthèse est identique à celle de la première stratégie. Une méthode de couplage peptidique employant un activateur utilisé en SPPS est choisie pour le couplage du bras maléimide sur l'hydrazine-Fmoc. La méthode HATU/*N*-méthylmorpholine (NMM) a été choisie par rapport aux méthodes utilisant l'EDC (1-éthyl-3-

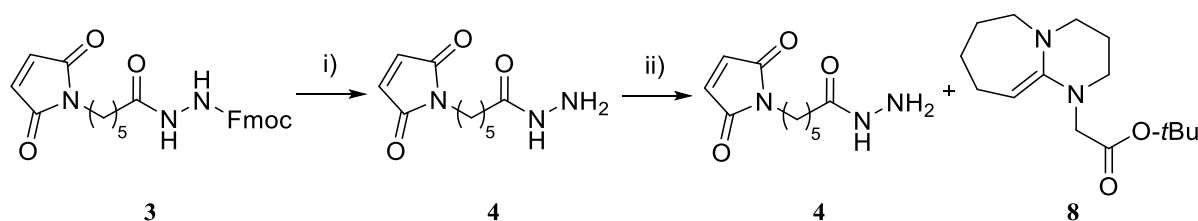
(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide)/hydrate d'hydroxybenzotriazole (HOBt) et HBTU/*N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) puisque ces trois conditions ont été comparées dans les travaux de thèse de Ralph-Olivier Moussodia et le couple HATU/NMM lui a permis d'obtenir le meilleur rendement de couplage.^[206] En effet, l'HATU accélère les réactions de couplage des acides α -aminés, probablement par catalyse basique intramolécule. Ainsi, le composé **3** a été synthétisé avec un rendement de 68% en suivant le protocole décrit par Moussodia *et al.*^[201,203] Le premier test de déprotection du groupement Fmoc par 3,8 équiv. de pipéridine (condition de déprotection classique en SPPS) a engendré l'obtention du composé déprotégé mais couplé à une molécule de pipéridine (**6**) ($[M+H]^+$, $m/z_{\text{théorique}}$: 311,20, $m/z_{\text{observé}}$: 311,15). De plus, le sous-produit dibenzofulvène-pipéridine (DBF-pip) est également observé par HPLC couplée à un détecteur de masse (HPLC-MS) (t_R : 17,15 min) et identifier par RMN ^1H confirmant la déprotection du groupement Fmoc. En effet, la pipéridine étant une base nucléophile, celle-ci a réagi avec la fonction maléimide par réaction de Michael. Avec un équiv. de pipéridine, l'adduit **7**, correspondant à l'addition de Michael de la pipéridine sur la fonction maléimide sans déprotection du groupement Fmoc, a été obtenu (**7** : $[M+H]^+$, $m/z_{\text{théorique}}$: 533,27, $m/z_{\text{observé}}$: 533,25 et confirmation par ^1H RMN, pas de pic caractéristique de la liaison C=C vers 6,66 ppm et apparition de 3 massifs correspondant aux 10 protons de la pipéridine à 1,26, 1,63 et 1,90 ppm) (Schéma 20). De plus, le sous-produit DBF-pip n'est pas observé par HPLC-MS confirmant que le groupement Fmoc n'a pas été déprotégé. Cela montre que l'emploi de cette base n'est pas viable pour la déprotection, puisque la réaction de Michael est favorisée par rapport à la réaction de déprotection en condition équimolaire (Schéma 20).



Conditions de réaction : i) 3,8 équiv. de pipéridine, DCM, 15 min, TA, produit non-isolé, ii) 1 équiv. de pipéridine, DCM, 2 h, TA, produit non-isolé

Schéma 20 : Sous-produits obtenus lors de la déprotection du groupement Fmoc du composé **3**

Pour contourner ce problème, la DIPEA et la NMM, deux bases non-nucléophiles, ont été testées pour la déprotection du groupement Fmoc. Après 5 jours de réaction en présence de 20 équiv. de DIPEA, la déprotection n'est pas totale. La déprotection par la NMM est totale après 4 jours de réaction avec 14 équiv. Ce temps de déprotection étant relativement long, une autre base non nucléophile est testée, la DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène). La déprotection du groupement Fmoc est totale en utilisant 1 équiv. de DBU en 15 min. Ceci s'explique par le pKa plus élevé de cette base (pKa =12) par rapport à celui de la DIPEA et de la NMM (pKa de 11,4 et 7,38, respectivement). Néanmoins, l'extraction liquide-liquide n'a pas permis de séparer le composé déprotégé désiré **4** et le DBU. Le composé **4** étant très polaire, une purification sur colonne de silice n'a pas permis de récolter le produit souhaité. Ainsi, une tentative de fixation du bras chélatant par réaction de S_N2 sur le composé **4** juste après déprotection du groupement Fmoc a été réalisée (réaction one-pot). Malheureusement, le DBU a réagi avec le bromoacétate de *tert*-butyle conduisant à l'adduit **8** ([M+H]⁺, m/z_{observé} : 267) (Schéma 21).



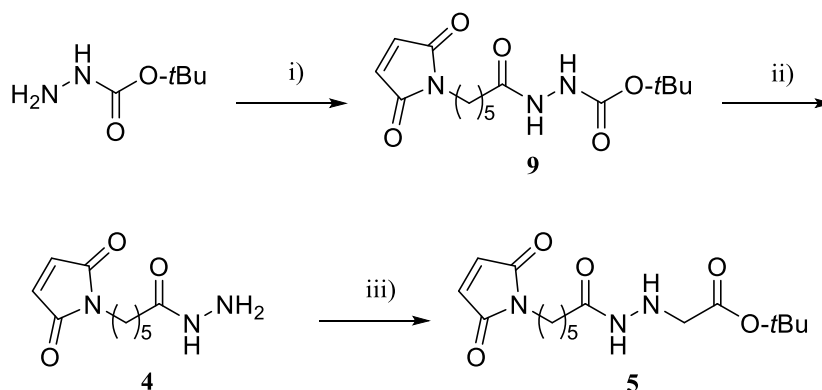
Conditions et réactifs : (i) 1 équiv. DBU, DCM, 15 min, TA, produit non isolé, (ii) DIPEA, Br-CH₂-COO*t*Bu, DCM, 5 h, produit non-isolé.

Schéma 21 : Tentative de synthèse du composé **4** par déprotection du groupement Fmoc par la DBU.

L'étape de déprotection du Fmoc n'a pas été fructueuse car aucune condition testée n'a permis d'isoler le composé **4**. Au vu des nombreuses difficultés rencontrées lors de la synthèse, une troisième approche a été envisagée.

4.1.3. 3^{ème} stratégie de synthèse de l'intermédiaire **5**

La troisième stratégie de synthèse de l'intermédiaire **5** est identique à l'ordre d'ajout (**B**) mais en utilisant cette fois-ci le groupement protecteur *tert*-butoxycarbone (Boc) en lieu et place du Fmoc (Schéma 22).



Conditions et réactifs : (i) acide maléimido-hexanoïque, HATU, NMM, DCM/DMF (1/1, v/v), TA, 7 h, 91% ; (ii) TFA, TA, 5 h, quantitatif ; (iii) Br-CH₂-COO*t*Bu, K₂CO₃, DMF, TA, nuit, 53%.

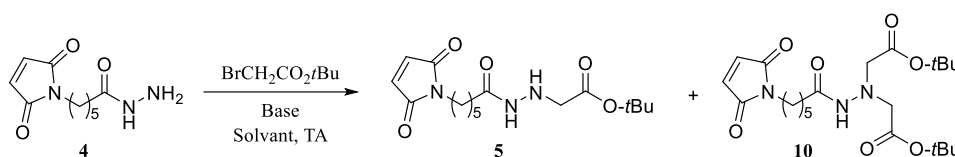
Schéma 22 : Troisième stratégie de synthèse du composé 5

Tout d'abord, le couplage du bras maléimide sur l'amine primaire du carbazate de *tert*-butyle (*i.e.*, hydrazine protégée par un groupement protecteur Boc) est réalisé grâce aux conditions classiques de couplage peptidique (*i.e.*, HATU/NMM, DCM, 5 heures, température ambiante (TA)).^[201,203] Après purification par chromatographie sur gel de silice (DCM/éthanol (EtOH), 98/2, v/v), le composé **9** a été obtenu avec un rendement élevé de 91%, et une pureté de 95% déterminée par HPLC à 214 nm (Étape i, Schéma 22). Ensuite, le groupement protecteur Boc a été retiré avec un excès d'acide trifluoroacétique (TFA) dans du dichlorométhane (DCM) à TA pendant 5 heures. Après précipitation dans de l'éther diéthylique à -20°C et centrifugation 10 min à 5000 rpm, le composé **4** a été obtenu sous forme d'un solide blanc avec une pureté de 95% à 214 nm et un rendement quantitatif (Étape ii, Schéma 22).

Les différentes tentatives pour synthétiser le composé **5** en insérant le bras chélateur supplémentaire sur l'hydrazide **4** (Étape iii, Schéma 22) sont listées dans le Tableau 14. Tous les rapports des composés mono- et bi-alkylés (noté rapport **5/10**) et tous les pourcentages du produit de départ **4** restant indiqués dans le Tableau 14 ont été déterminés par HPLC à 214 nm. Cette étape a d'abord été réalisée avec 1 équiv. de DIPEA et du bromoacétate de *tert*-butyle dans du DCM pendant une nuit à TA en suivant le protocole de Thomson *et al.*^[207] (Entrée 1, Tableau 14). Cette première tentative a permis l'obtention d'un rapport **5/10** de 66/34 ainsi que de 61,6 ± 7,7% de l'hydrazide **4** restant avec un faible rendement isolé du composé **5** de 8%. L'augmentation du nombre d'équiv. de DIPEA à 4 (Entrée 2, Tableau 14) a fourni un rapport **5/10** similaire (64/36) tout en améliorant à la fois la consommation du composé **4** (34,8 ± 17,0% restant) et le rendement isolé de l'intermédiaire **5** (12%). Inversement, une diminution du nombre d'équiv. de DIPEA à 0,5 (Entrée 3, Tableau 14) a permis d'augmenter significativement

la fraction du composé **5** dans le rapport **5/10** (81/19) mais cela s'est accompagné d'une faible consommation de l'hydrazide **4** (85,7% restant) et d'un faible rendement isolé du composé **5** (4%). En réduisant seulement le nombre d'équiv. de bromoacétate de *tert*-butyle à 0,2 (Entrée 4, Tableau 14), des résultats similaires à ceux de l'Entrée 3 ont été obtenus (c'est-à-dire un rapport **5/10** de 76/24, et 88,7% de **4** restant), conduisant à un rendement en **5** isolé de 7%. Vu que dans le DCM, une quantité élevée de DIPEA permet une consommation plus importante de l'hydrazide **4** et qu'une faible quantité de bromoacétate de *tert*-butyle améliore le rapport **5/10** en faveur du composé **5**, une dernière tentative a été réalisée où 3 équiv. de DIPEA et 1 équiv. de bromoacétate de *tert*-butyle ont été ajoutés par portions (*i.e.*, 1 équiv. de DIPEA toutes les 4 heures et 0,2 équiv. de bromoacétate de *tert*-butyle toutes les 2 heures) dans le DCM à TA (Entrée 5, Tableau 14). Cette stratégie a permis d'obtenir un rapport **5/10** de 77/23, tandis que la quantité de l'hydrazide **4** restante s'élève à $26,8 \pm 15,4\%$. Un rendement isolé de 20% a été obtenu pour l'intermédiaire **5**, ce qui en fait le meilleur résultat obtenu en utilisant la DIPEA comme base et le DCM comme solvant. Néanmoins, le rendement est encore trop faible pour être satisfaisant. Ainsi, une autre base (*i.e.*, K_2CO_3) a été testée pour essayer d'améliorer la consommation du composé **4** et pour évaluer son impact sur la formation des produits **5** et **10**. Les mêmes équiv. de K_2CO_3 et de bromoacétate de *tert*-butyle (0,85) ont été utilisés à TA dans du DCM ou du toluène (Entrées 6 et 7, Tableau 14). Des résultats similaires ont été obtenus montrant la formation exclusive du sous-produit **10** avec un taux de conversion (TC) très faible (environ 94-95% de l'hydrazide **4** restant). Enfin, une dernière tentative a été effectuée en utilisant le *N,N*-diméthylformamide (DMF) comme solvant, 1,1 équiv. de K_2CO_3 et 1 équiv. de bromoacétate de *tert*-butyle (Entrée 8, Tableau 14) selon le protocole de Lubell *et al.*^[208,209] Ces conditions ont permis d'obtenir un rapport **5/10** de 81/19 avec seulement $4,4 \pm 3,5\%$ de l'hydrazide **4** restant, fournissant ainsi un rendement isolé de l'intermédiaire **5** de 53%.

Tableau 14 : Optimisation de la synthèse de l'intermédiaire 5



Entrée	Base (Équiv.) ^a	BrCH ₂ CO ₂ tBu (Équiv.) ^a	Solvant	4 restant (%) ^b	Rapport 5/10 ^b	5 (%) ^c
1	DIPEA (1)	1	DCM	61,6 ± 7,7 (n = 4)	66/34	8
2	DIPEA (4)	0,9	DCM	34,8 ± 17,0 (n = 2)	64/36	12
3	DIPEA (0,5)	0,9	DCM	85,7	81/19	4
4	DIPEA (1)	0,2	DCM	88,7	76/24	7
5	DIPEA (3 x 1)	5 x 0,2	DCM	26,8 ± 15,4 (n = 4)	77/23	20
6	K ₂ CO ₃ (0,85)	0,85	DCM	95,2	0/100	-
7	K ₂ CO ₃ (0,85)	0,85	Toluene	94,1	0/100	-
8	K ₂ CO ₃ (1,1)	1	DMF	4,4 ± 3,5 (n = 10)	81/19	53

^a : Nombre d'équiv. par rapport au réactif de départ **4** ; ^b : Déterminé par HPLC à 214 nm ; ^c : Rendement isolé après purification par chromatographie flash sur gel de silice.

Afin d'améliorer le rendement, il a été nécessaire de modifier les conditions d'extraction de la manière suivante : a) passage de 3 à 6 extractions avec 30 mL d'EtOAc, b) augmentation du volume d'eau utilisé pour diluer le DMF avant extraction de 20 à 100 mL. Grâce à ces modifications, le rendement a été amélioré jusqu'à 53%. De même, la purification du composé **5** a été menée avec plusieurs conditions d'éluion (DCM/EtOH, 98/2, v/v), éther de pétrole/EtOAc (70/30 et 90/90, v/v) et n-hexane/EtOAc (80/20, v/v) mais seules les dernières conditions se sont révélées optimales pour une purification rapide et satisfaisante (pureté > 95%).

4.1.4. 4^{ème} stratégie de synthèse de l'intermédiaire 5

Comme décrit dans la Partie 2.3. du Chapitre 2, d'autres méthodes de synthèse des hydrazines fonctionnalisées sont décrites dans la littérature telle que la réduction des hydrazones. Pour tenter d'améliorer le rendement de synthèse de l'intermédiaire **5**, cette stratégie alternative a été tentée. Elle vise à éviter la formation du produit bialkylaté **10** qui fait chuter le rendement de la réaction S_N2.

Cette stratégie (Figure 35) nécessite l'utilisation d'un aldéhyde **11** non disponible dans le commerce, à synthétiser au préalable, avant de réaliser une réaction d'amidation réductrice.

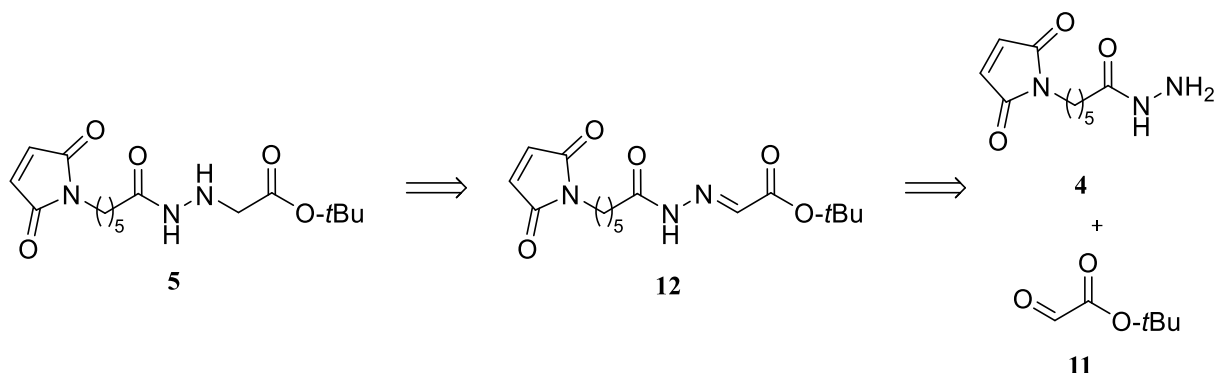
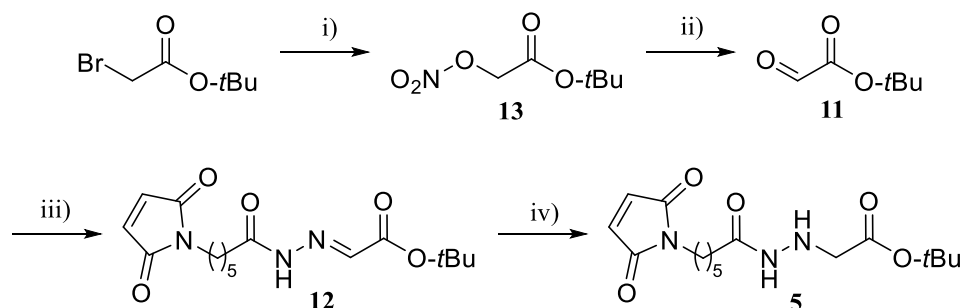


Figure 35 : Rétrosynthèse du composé **5**

La première étape a consisté en la formation du nitrate de *tert*-butoxycarbonylméthyle **13** suivant le protocole de Yamamoto *et al.*^[210,211] L'atome de brome du bromoacétate de *tert*-butyle a été substitué par une fonction nitrate en utilisant AgNO_3 dans du CH_3CN anhydre sous atmosphère inerte et à l'obscurité pour éviter l'oxydation de AgNO_3 (Schéma 23, étape i). Lors de la formation du composé **13**, un précipité vert de bromure d'argent s'est formé et a été éliminé par filtration sur filtre de cellulose. Le composé **13** a été obtenu avec un rendement de 65% et une pureté >95% déterminée par RMN ^1H .



Conditions et réactifs : (i) AgNO_3 , CH_3CN , 3 jours, TA, obscurité, 65%, (ii) NaOAc , DMSO , 20 min, TA, composé non-isolé, (iii), composé **4**, DMSO , nuit, TA, 56%, (iv) NaBH_3CN , EtOH , HCl 1 M, 8 h, TA, 36%.

Schéma 23 : Quatrième stratégie de synthèse du composé **5**.

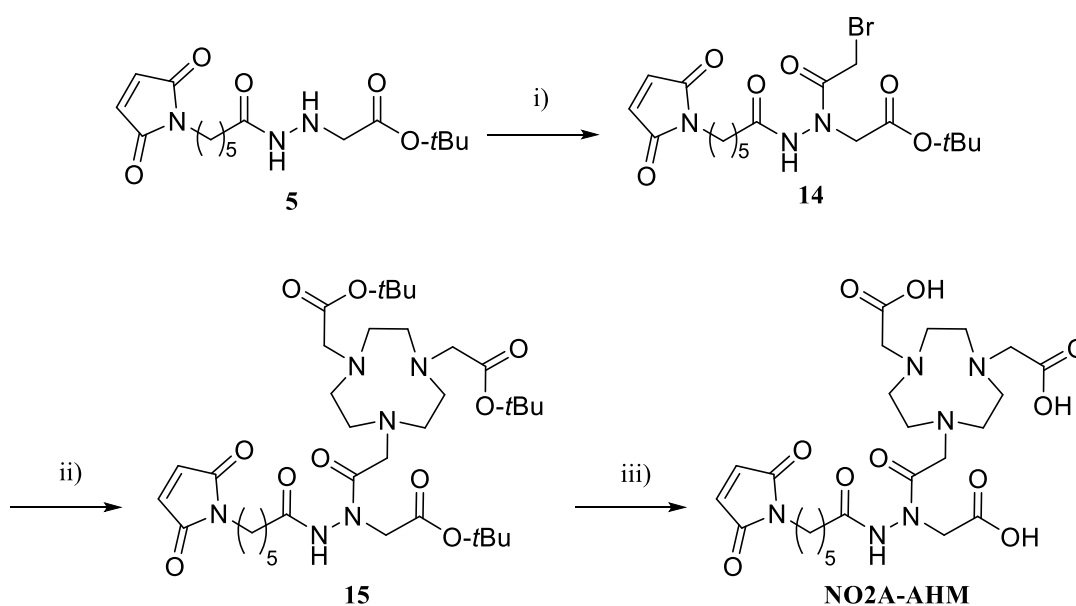
Ensuite, l'aldéhyde désiré **11** a été obtenu par réaction entre la fonction nitrate du composé **13** et de l'acétate de sodium (NaOAc).^[210,211] Étant donné la haute sensibilité de l'aldéhyde **11** et la difficulté de l'isoler, l'hydrazone **12** a été synthétisée en rajoutant directement l'hydrazide **4** au brut réactionnel contenant l'aldéhyde **11** dans un processus *one-pot* avec un rendement de 56% (Étapes ii et iii, Schéma 23). La synthèse de l'hydrazone **12** a été réalisée par une réaction entre

la fonction aldéhyde du composé **11** et le groupe NH₂ libre de l'hydrazine **4** en se basant sur le protocole de Li *et al.*^[212] Finalement, la réduction de l'hydrazone **12** avec NaBH₃CN à pH 4-5 et l'acidification avec HCl 1 M ont permis la formation du composé souhaité **5** avec un rendement de 36% (Étape iv, Schéma 23). Des conditions acides sont nécessaires pour la réduction de l'hydrazone **12** mais le pH ne doit pas être trop bas pour éviter la déprotection du groupe protecteur *t*Bu.^[213]

Malheureusement, cette méthode nous a conduit à une réduction non totale de l'hydrazone par rapport à l'utilisation de NaBH₃CN.^[214] En conclusion, cette quatrième stratégie nous a permis d'obtenir le composé **5** en six étapes avec un rendement global de 11% mais ce rendement est bien moins intéressant que notre 3^{ème} stratégie où l'intermédiaire **5** a été obtenu en trois étapes avec un rendement global de 47%.

4.2. Synthèse de NO2A-AHM

Après l'optimisation de la stratégie de synthèse de l'intermédiaire **5**, l'insertion du chélateur NOTA peut être entreprise en deux étapes suivies d'une étape de déprotection des groupements protecteurs, selon la synthèse décrite dans le Schéma 24.



Conditions et réactifs : (i) BrCO-CH₂Br, pyridine, DCM, TA, 20 min., 89%, (ii) NO2A*t*Bu, DIPEA, CH₃CN, nuit, TA, 30%, (iii) TFA, TA, 5 h, quantitatif.

Schéma 24 : Synthèse de NO2A-AHM

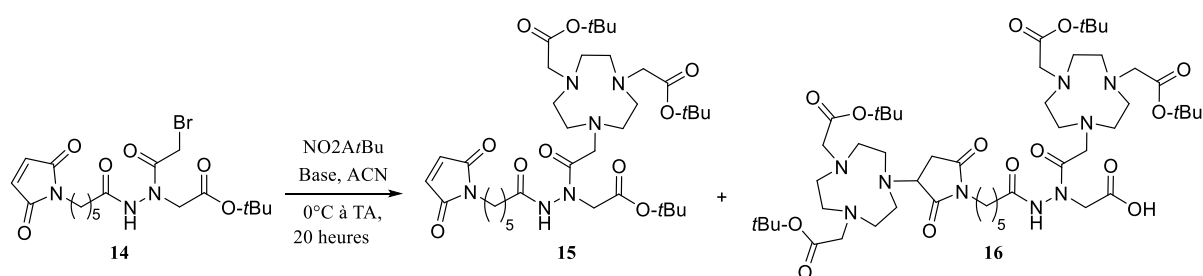
Tout d'abord, une fonction bromoacétyle est insérée sur le composé **5** pour obtenir le composé **14** grâce à une réaction d'acylation utilisant le bromure de bromoacétyle^[197] (Étape i, Schéma

24). Cette réaction génère du HBr *in situ*, ce qui a pour conséquence de diminuer le pH du mélange réactionnel. Une base doit donc être introduite dans le mélange réactionnel pour maintenir un pH neutre pendant la réaction et ainsi éviter la déprotection du groupement *t*Bu. L'utilisation de K₂CO₃ (2 équiv.) ne permet pas d'augmenter le pH au-delà de 2, induisant une déprotection partielle du groupement *t*Bu observable 10 min après l'addition du bromure de bromoacétyle. Nous avons noté que l'ajout d'une base organique comme la pyridine (1,5 équiv.) est efficace pour stabiliser le pH à une valeur de 7 et permet ainsi d'éviter la déprotection du *t*Bu. Une cyclisation intramoléculaire conduisant à la formation d'une oxadiazinone et une substitution du brome par la pyridine sont deux réactions secondaires rapportées dans la littérature par Rahim *et al.*^[215] avec l'utilisation de la pyridine comme base. Dans nos conditions, ces réactions secondaires n'ont pas été observées et le composé **14** est obtenu en 15 minutes avec un excellent rendement de 89% avec une pureté de 96% déterminée par HPLC à 214 nm. Le chélateur NOTA a ensuite été couplé à **14** pour fournir le composé **15** via une réaction S_N2 entre l'atome de brome porté par **14** et l'amine secondaire du chélateur commercial NO₂AtBu dans des conditions basiques afin d'augmenter les caractères nucléophiles de cette amine secondaire^[216,217] (Étape ii, Schéma 24). En raison de la capacité de cette amine secondaire à réagir également avec le groupe maléimide du composé **14**, les conditions de réaction doivent être optimisées pour minimiser la formation du sous-produit **16** (Tableau 15). Ce sous-produit **16** résulte du double couplage de NO₂AtBu sur le composé **14** via une réaction S_N2 sur l'atome de brome et une réaction d'addition aza-Michael sur la fonction maléimide.

Les additions d'Aza-Michael d'un large panel d'amines (par exemple, primaires, secondaires, acycliques et cycliques)^[125] ou de maléimides sont connues dans la littérature. Entre autres, il a été montré qu'en présence simultanée de groupes thiol et amine primaire, une compétition entre les additions thio- et aza-Michael se produisait dans un tampon aqueux.^[116] Des additions chimiosélectives thio-Michael ont été observées de pH 6,5 à 7,5, mais au-delà de cette gamme de pH, les amines primaires entraient directement en compétition avec les groupes thiol dans les additions de Michael (*i.e.*, perte de chimiosélectivité vis-à-vis du groupe thiol) en raison de la nucléophilie croissante des amines. Ces résultats tendent à suggérer que le pH pendant la réaction doit être inférieur à 7,5 pour défavoriser la formation du sous-produit **16**, mais en même temps, il doit être suffisamment élevé pour permettre la réaction S_N2. Il semblerait donc qu'un pH neutre de 7,0 représente la condition optimale pour minimiser la formation du produit **16**. La synthèse du composé **15** a été réalisée en ajoutant une solution de NO₂AtBu (0,9 équiv.) et de diverses bases (*i.e.*, DIPEA, pyridine, K₂CO₃, Et₃N et NMM de 1 à 3 équiv.) dans du CH₃CN

anhydre à une solution du composé **14** (1 équiv.) dans du CH₃CN anhydre à 0°C et ensuite agitée à TA pendant 20 heures. Diverses tentatives utilisant la pyridine, K₂CO₃, Et₃N et NMM ont permis d'atteindre un rendement isolé maximum de 17% pour le composé **15** (données non présentées) et les meilleurs résultats ont été obtenus avec la DIPEA (Tableau 15). L'absence de base (Entrée 1, Tableau 15) n'a pas permis de minimiser la formation du sous-produit **16**. En effet, seul un rapport **15/16** de 60/40, et 52,8% de **14** restant, ont été obtenus, ce qui a donné un rendement en **15** isolé de seulement 8%. L'addition d'une quantité de DIPEA (*i.e.*, 1, 2 ou 3 équiv.) a permis d'améliorer le rapport **15/16**, la consommation du composé de départ **14** et le rendement en le composé **15** isolé (Entrées 2-4, Tableau 15). Le meilleur résultat a été obtenu avec 2 équiv. de DIPEA, permettant d'obtenir un rapport **15/16** de 81/19 avec 5,0% du composé **14** restant et un rendement en produit **15** isolé de 24% (Entrée 3, Tableau 15). La dernière tentative a consisté à reproduire ce meilleur protocole (*i.e.*, Entrée 3, Tableau 15), mais cette fois-ci en utilisant une addition goutte à goutte de la solution NO₂A/*t*Bu/DIPEA pendant 2 heures à 0°C (Entrée 5, Tableau 15). Cette addition lente a permis d'améliorer considérablement le rapport **15/16** jusqu'à 98/2 avec une très forte consommation du composé **14** (*i.e.*, 2,4% restant), permettant l'obtention d'un rendement pour le composé **16** isolé de 37%. Malgré ces conditions optimisées, le composé **16** est isolé avec seulement 37% de rendement ; ceci est dû aux difficultés rencontrées au cours de la purification pour séparer les composés **15** et **16**.

Tableau 15 : Optimisation de la synthèse du composé **15**



Entrée	Base (Équiv.) ^a	14 restant (%) ^b	Rapport 15/16 ^b	15 (%) ^c
1	-	52,8	60/40	8
2	DIPEA (1)	6,1	77/33	20
3	DIPEA (2)	5,0	81/19	24
4	DIPEA (3)	3,8	75/25	19
5 ^d	DIPEA (2)	2,1 ± 1,9 (n = 5)	98/2	37

Réaction réalisée avec 0,9 équiv. de NO₂A-AHM par rapport au réactif **14**, ^a: Nombre d'équiv. par rapport au réactif **14** ; ^b: Déterminé par HPLC à 214 nm ; ^c: Rendement isolé après purification par RP-HPLC préparative ; ^d: addition goutte-à-goutte d'une solution de NO₂A/*t*Bu/DIPEA dans du CH₃CN pendant 2 heures à 0°C.

NO2A-AHM est obtenu après déprotection des groupements *t*Bu du composé **15** avec un excès de TFA dans du DCM (Étape iii, Schéma 24). Après précipitation dans de l'éther diéthylique refroidi à -20°C, centrifugation et purification par RP-HPLC, **NO2A-AHM** est isolé sous la forme d'un solide blanc avec une pureté de >98% à 214 nm et un rendement quantitatif (Étape iii, Schéma 24). En résumé, notre nouvel ACB, **NO2A-AHM**, a été obtenu en six étapes à partir du carbazate de *tert*-butyle commercial avec un rendement global de 16%. Les deux réactions S_N2 sont les deux étapes limitantes de notre synthèse (Étape iii, Schéma 22 et étape ii, Schéma 24) avec des rendements de 53% et 37%, respectivement, après optimisation des conditions de réaction.

5. Conclusion du chapitre

Plusieurs stratégies de synthèse ont été envisagées et testées pour élaborer notre nouvel ACB, **NO2A-AHM**. En effet deux ordres d'ajouts (**A**) et (**B**) ont été testés pour la synthèse de l'intermédiaire **5** et 3 stratégies de synthèse de **5** via l'ordre d'ajout (**B**) ont été également testés. Il en ressort que l'ordre d'ajout (**B**) est une meilleure stratégie par rapport aux nombres de sous-produits indésirables qui peuvent potentiellement se former. Concernant la voie (**B**), une protection de l'hydrazine à l'aide d'un groupement *t*Bu permet de faciliter l'étape de déprotection par rapport à l'utilisation du groupement protecteur Fmoc. Concernant la fixation du bras chélatant supplémentaire, une réaction de S_N2 permet d'obtenir cet intermédiaire avec un meilleur rendement et nombre d'étapes (37% en 3 étapes) par rapport à une stratégie d'amination réductrice (11% en 6 étapes). Une fois la synthèse de l'intermédiaire **5** optimisée, la fixation de la cage NOTA en 2 étapes suivie d'une déprotection en milieu acide des groupements protecteurs *t*Bu ont pu être réalisées. L'insertion du chélateur commercial **NO2A*t*Bu** par réaction S_N2 a dû être optimisée afin de limiter son addition sur la fonction maléimide. En effet, nous n'avions pas anticipé une potentielle réactivité entre la fonction amine secondaire de **NO2A*t*Bu** et la fonction maléimide. Toutes ces différentes optimisations nous ont permis d'obtenir le nouvel ACB hybride **NO2A-AHM** en 6 étapes avec un rendement global de 16%.

CHAPITRE 3 : ÉTUDE DE COMPLEXATION ET MODÉLISATION MOLÉCULAIRE

1. Introduction

1.1. La chimie de complexation

La chimie de complexation ou de coordination correspond à la chimie des complexes composés de l'association entre un centre métallique chargé (M^{n+}) et un ligand (L). Les liaisons mis en jeu dans ce type de complexe avec un métal sont des liaisons de coordination. Pour rappel, une liaison de coordination correspond à une liaison entre un atome accepteur et un atome donneur, pour laquelle le donneur fournit les deux électrons nécessaires à la formation de la liaison. Une liaison covalente de coordination est une interaction forte ayant une force de l'ordre de 50 kcal/mol. Elle est plus faible qu'une liaison covalente (force de liaison supérieure à 100 kcal/mol) mais bien plus forte que les liaisons non-covalentes de types Van der Waals, liaisons hydrogène et interactions salines (forces inférieures à 30 kcal/mol). Lorsqu'un atome métallique (accepteur) forme des liaisons covalentes de coordination avec des atomes donneurs non métalliques, le composé résultant est nommé complexe de coordination et les donneurs sont appelés ligands. La plupart des complexes sont formés avec des métaux de transition mais les lanthanides et actinides sont également capables de former des complexes. Les ligands sont des atomes, ions ou molécules portant des groupes fonctionnels pouvant se lier à un ou plusieurs atomes. Ils sont caractérisés par le nombre de doublets non liants pouvant être mis en jeu. Ils peuvent ainsi être mono- ou multidentate. Ainsi, un complexe de coordination peut être constitué de plusieurs ligands monodentate, un seul ligand multidentate ou plusieurs ligands multidentate complexant un atome métallique. En fonction du nombre de liaisons de coordination pouvant être formées, la géométrie du complexe sera différente : 2 (linéaire), 3 (trigonale plan ou pyramidale), 4 (tétraédrique ou plan carré), 5 (bipyramidale à base triangulaire ou pyramidale à base carrée), 6 (octaédrique), 7 (bipyramidale pentagonale, octaédrique coiffée ou prismatique trigonale coiffée), 8 (dodécaèdre, prismatique trigonale bicoiffée ou antiprismatique à base carrée). Dans de très nombreux cas, la géométrie des complexes s'écarte des géométries théoriques par des angles et longueurs de liaisons s'écartant des valeurs idéales. Cela peut s'expliquer par l'effet de distorsion Jahn-Teller. Cette distorsion correspond au fait que la géométrie distordue, notamment par élongation ou raccourcissement des liaisons M-L, permet d'obtenir un état d'énergie de la structure plus faible que si la géométrie correspondait à la structure théorique.

Afin de déterminer si un complexe est stable ou pas, différentes constantes peuvent être déterminées comme la constante de formation β_n (E9) ou la constante de dissociation K_D (E10).

Plus la constante de formation β_n est élevée et plus le complexe formé est stable. De même, plus la constante de dissociation K_D est faible et plus le complexe sera stable.

$$\beta_n = \frac{[ML_n]}{[M][L]^n} \quad (E9)$$

$$K_D = \frac{[M][L]^n}{[ML_n]} = \frac{1}{\beta_n} \quad (E10)$$

Avec $[M]$: concentration en métal M, $[L_n]$: concentration en ligand numéro n, $[ML_n]$: concentration en complexe M-L_n

Des courbes de distribution peuvent également être tracées en fonction du pH afin de connaître l'espèce majoritaire en solution à un pH donné. Les constantes de dissociation d'un complexe M-L peuvent être calculées expérimentalement à l'aide de plusieurs techniques :

- La méthode de titration potentiométrique qui consiste à doser le complexe en solution en faisant varier le pH. Cette méthode a l'inconvénient d'être difficile à mettre en place sur des ligands cycliques car le complexe est très lent à atteindre l'état d'équilibre rendant cette méthode très longue (plusieurs mois).^[218]
- Des mesures de titrations spectrophotométriques.^[219,220] Cependant, elles sont réservées aux complexes possédant une bande d'absorption dans le visible, comme le cuivre Cu²⁺, qui n'est pas masquée par les bandes d'absorption du ligand visible en ultraviolet (UV).
- La titration par spectroscopie RMN^[218,219] qui consiste à analyser par RMN des solutions de ligands complexés à différents pH croissants. La constante de dissociation est calculée par le ratio entre l'aire d'un pic de l'espèce non complexé par rapport à l'espèce complexé. Les pics choisis doivent correspondre tous deux à un proton proche du site de coordination pour lequel son déplacement chimique est modifié lors de la complexation. Les deux pics doivent être bien résolus sur l'ensemble des analyses RMN réalisées puisque l'on calcule la constante par intégration de l'aire de ces deux pics. Cette méthode n'est pas utilisable si aucun proton du groupement chélatant ne forme de pic résolu pour l'ensemble des analyses, pour la structure complexée et non complexée car l'intégration de l'aire sera faussée.

La stabilité d'un complexe est régie par plusieurs facteurs :

- **L'énergie de stabilisation du champ cristallin** est reliée à la théorie du champ cristallin. Cette théorie démontre que les 5 orbitales d d'un métal de transition sont dégénérées car elles possèdent la même énergie. Lorsqu'un champ sphérique interagit

électrostatiquement avec les électrons d, alors l'énergie des orbitales d augmente et conduit à la formation d'un champ octaédrique si l'on concentre les charges à équidistance du métal sur les axes x, y et z. Les 5 orbitales sont classées en 2 groupes t_{2g} (d_{xy} , d_{xz} et d_{yz}) et e_g (d_{z^2} , $d_{x^2-y^2}$) et l'énergie du champ de ligand correspond à la différence d'énergie entre les deux groupes d'orbitales et est notée $10 Dq$ (Δ_O dans le cas d'un champ octaédrique). Plus cette énergie est faible et plus les orbitales sont stabilisés et donc plus le complexe formé est stable (Figure 36). Ainsi, la valeur de Δ_O dépend de la nature du métal et de son nombre d'oxydation et donc de la charge du métal, de la nature du ligand, de la symétrie de l'environnement, de l'état de spin et de l'effet Jahn-Teller. Un complexe sera ainsi moins stable si la charge est élevée, si les métaux font partis de la deuxième et troisième série de transition et si les ligands sont à champ fort. En effet, les ligands sont classés dans une série spectroscopique et les ligands à champ faible induisent des valeurs de Δ_O faibles ($CO > CN^- > NH_3 > SCN^- > H_2O > OH^- > F^- > Cl^- > Br^- > I^-$).

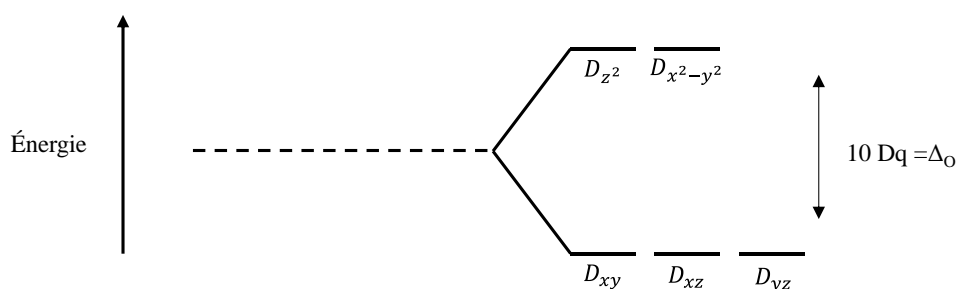


Figure 36 : Configuration électronique d'une structure octaédrique

- **La théorie HSAB** (*Hard and Soft Acids and Bases*) dit qu'un acide dur réagit préférentiellement avec une base dure et qu'un acide mou réagit préférentiellement avec une base molle (acide et base de Lewis). Ainsi, un complexe formé entre un ligand mou et un métal dur ou inversement sera peu stable (Tableau 16).

Tableau 16 : Acides dures et acides mous

Durs	Intermédiaires	Mous
Métaux (acides, atomes accepteurs)		
Al^{3+} , In^{2+} , Mg^{2+} , Sc^{3+} , Fe^{3+} , Co^{3+} , Mn^{2+} , Ga^{3+} , Zr^{4+}	Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+}	Cu^+ , Ag^+ , Au^+ , Pd^{2+} , Cd^{2+} , Pt^{2+} , Hg^{2+}
Ligands (bases, atomes donneurs)		
F^- , OH^- , O_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , H_2O , NH_3 , R_2CO	Cl^- , Br^- , N_3^- , NCS^- , NO_2^- , RNH_2	I^- , R^- , CN^- , I^- , SCN^- , CO

- **L'effet chélate** correspond au fait que les ligands multidentate offrent des complexes plus stables que des systèmes similaires composés de plusieurs ligands monodentate (Figure 37). La taille des chaîons liant deux atomes donneurs induit un effet sur la stabilité du complexe. Les cycles à 5 membres (donc des chaîons de trois liaisons covalentes, soit deux ligands espacés par deux atomes de carbone) étant plus stables que les cycles à 4, 6, 7 et 8 membres, les ligands formant des cycles à 5 membres avec un métal seront plus stables que ceux formant des cycles à 4, 6, 7 ou 8 membres. De plus, plus il y a de cycles formés entre le ligand et le métal, et plus le complexe est stable. C'est ainsi le cas avec l'EDTA qui forme 5 cycles à 5 membres avec des cations. Dans un cycle à 5 membres, les angles N-C-N auront une valeur proche de $109,5^\circ$ correspondant à la géométrie tétraédrique d'un carbone sp^3 tandis que les angles d'un cycle à 4 membres seront de 90° . Concernant les cycles à 6 membres, ils seront stables s'ils présentent un effet de résonance.

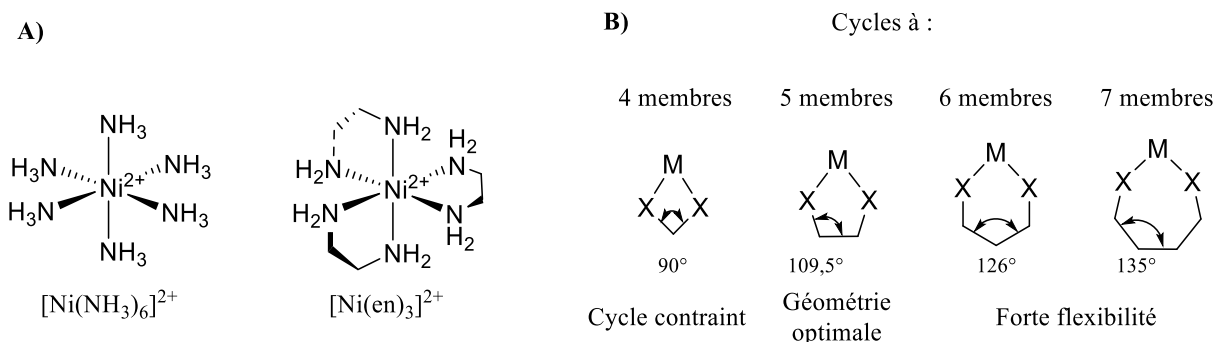


Figure 37 : **A)** Ni^{2+} chélaté par 6 ligands monodentate ou par 3 ligands bidentate. **B)** Structure des cycles formés avec un métal pour des ligands possédant des chaîons de 2, 3, 4 et 5 liaisons covalentes

- **L'effet macrocyclique**, quant à lui, correspond au fait que les complexes sont plus stables lorsque la structure tridimensionnelle du chélatant subit peu de modifications lors de la complexation. Ainsi, un ligand cyclique ou bicyclique aura tendance à former un complexe plus stable qu'un ligand acyclique comportant le même nombre de donneur. Celui-ci permet une stabilité maximale lorsque la cavité d'un ligand possède la même dimension que le diamètre atomique de l'ion à complexer (Figure 38).

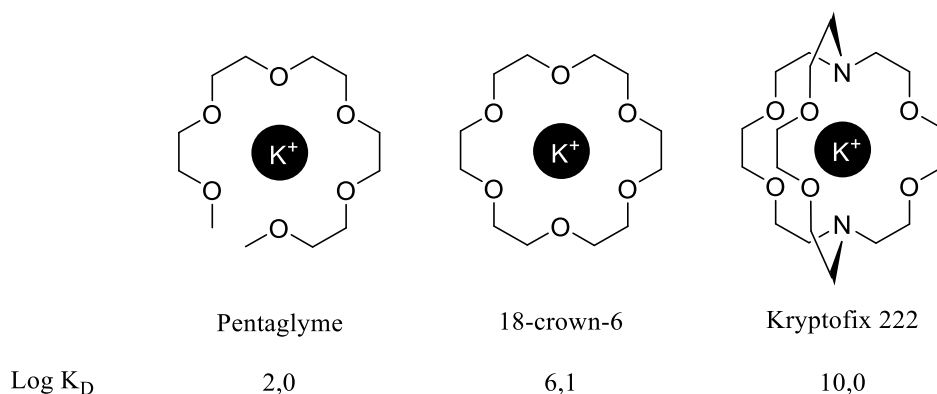


Figure 38 : Illustration de l'effet macrocyclique par un ion K^+ complexé par un ligand hexadentate acyclique, cyclique et bicyclique.

1.2. La complexation de l'aluminium-fluor, gallium et lutécium par les agents chélatants

Dans l'optique de développer des radiotraceurs capables d'être radiomarqués à l'aluminium-fluor-18, au gallium-68 et au lutécium-177, il est nécessaire de synthétiser les complexes **AlF/Ga/Lu-NO₂A-AHM** afin de réaliser une preuve de concept que ce nouvel ACB peut être employé pour une utilisation en médecine nucléaire. Afin de complexer le chélatant préalablement synthétisés **NO₂A-AHM** à l'aluminium-fluor, au gallium et au lutécium, des protocoles de marquage des éléments non-radioactifs issus de la littérature ont été étudiés et comparés. Le Tableau 17 présente les conditions de préparation des complexes avec les 3 radionucléides d'intérêt avec les chélatants HBED-CC, NODAGA et DOTA.

Pour le gallium (Entrées 1-5, Tableau 17), différentes formules chimiques sont utilisées telles que le gallium apparié avec l'ion chlorure ou le ligand nitrate. Il est à noter de grandes différences de conditions réactionnelles en fonction des protocoles telles que la nature du tampon ainsi que le nombre d'équiv. de gallium par rapport à l'agent chélatant (1 – 41 équiv.). Également, un protocole utilise un mélange de tampon et de diméthylsulfoxyde (DMSO) (Entrée 4, Tableau 17). La majorité des réactions durent 30 min et le pH de la solution est ajusté à 4,5. Concernant la température de marquage, celle-ci dépend fortement de la nature du chélatant utilisé. Des complexations à température plus faible pour les cages cycliques (TA-40°C) (Entrées 1-2, Tableau 17) que pour les cages acycliques (90-95°C) (Entrées 3-5, Tableau 17) sont observées. Nous notons ainsi une différence notable avec la radiochimie, puisqu'une cage DOTA est radiomarquée au gallium-68 à 95°C pendant 10 min et le chélatant HBED-CC est radiomarqué à 50°C pendant 10 min.

Tableau 17 : Protocoles de complexation de différents agents chélatants au gallium, aluminium-fluor et lutécium

Entrée	Nature du métal	Agent chélatant	Milieu réactionnel	Équiv. Métal	pH	Temps de marquage (min)	T (°C)	Rdt isolé (%)	Réf.
Gallium									
1	Ga(NO ₃) ₃	HBED-CC	HEPES 2,1 M/HCl 1 M (5/1, v/v)	10	NC	2	95	NC	[37]
2	Ga(NO ₃) ₃	HBED-CC	NH ₄ ONa 0,2 M	1,6	NC	30	90	NC	[221]
3	Ga(NO ₃) ₃	NODAGA	NH ₄ ONa	41	4,5	30	37	82	[222,223]
4	GaCl ₃	DOTA	DMSO/H ₂ O/NaOAc 1 M (25,5/74/0,5 v/v/v)	1,1	4,5	nuit	TA	NC	[224]
5	Ga(NO ₃) ₃	DOTA	H ₂ O	1	4	30	40	NC	[225]
Aluminium-Fluor									
6	AlF ₃	NODA	NaOAc 10 mM/ EtOH (2/1, v/v)	3	4,5-5	15	reflux	29,6-43,9	[217]
7	AlF ₃	NODA	NaOAc 2 mM /EtOH (2/1, v/v)	1,4	4,5-5	15	reflux	49,6	[89]
8	AlCl ₃ + NaF	NOTA	NaOAc 0,5 M	1 + NC	4	15	reflux	58,4	[87]
9	AlCl ₃ + NaF	HBED-CC	NaOAc 0,05 M	1,2 + 1,9	5	30	30	NC	[105]
10	AlCl ₃ + KF	NOTA	NaOAc 0,2 M/CH ₃ CN (1/1, v/v)	0,8 + 2,6	4	15	100	NC	[226]
Lutécium									
11	Lu(NO ₃) ₃	DOTA	H ₂ O	2,5	NC	30	95	NC	[223]
12	LuCl ₃	DOTA	DMSO/H ₂ O/ NaOAc 1 M (25/74/1, v/v/v)	1,1	5	120	90	NC	[222]

Concernant la complexation à l'aluminium-fluor (Entrées 6-10, Tableau 17), les conditions opératoires décrivent l'utilisation directe de AlF₃ ou alors la mise en contact préalable d'AlCl₃ avec du NaF ou KF. Les protocoles proposent des conditions réactionnelles similaires comme une température de marquage à 95°C pour les cages NOTA, un temps de marquage compris entre 15-30 min, un milieu réactionnel de type tampon à un pH compris entre 4,5 et 5 et un nombre d'équiv. de {AlF}²⁺ compris entre 1 et 3. Contrairement à la complexation avec le gallium, la complexation avec {AlF}²⁺ nécessite l'utilisation d'un co-solvant (EtOH ou CH₃CN). Les auteurs décrivent le rôle important du co-solvant sans en expliquer la justification scientifique.

Concernant la complexation au lutécium, peu de protocoles ont été décrits dans la littérature. Seuls des exemples avec des cages DOTA sont décrits. Des gammes d'équiv., de temps et de pH similaires à celles observées pour le marquage du DOTA au gallium sont observées. Seule

la température est différente (90-100°C pour le lutécium contre TA – 40°C pour le gallium) (Entrées 11-12, Tableau 17).

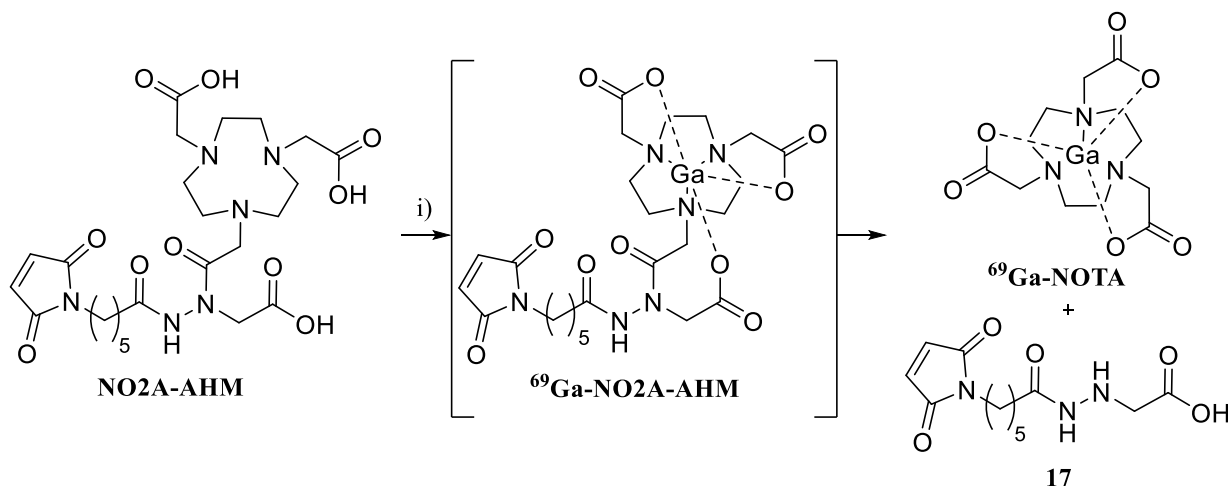
2. Étude de complexation de NO2A-AHM

Pour confirmer la capacité de NO2A-AHM, à complexer les 2 métaux (gallium et lutécium) ou l'adduit $\{AlF\}^{2+}$, nous avons étudié la capacité de notre nouvel ACB à complexer le gallium (^{nat}Ga), l'aluminium-fluor ($Al^{nat}F$), et le lutécium (^{nat}Lu) (*i.e.*, références non radioactives).

2.1. Étude de complexation du ^{nat}Ga par NO2A-AHM

2.1.1. Mise en place de la complexation

Concernant la complexation de NO2A-AHM au gallium, une adaptation des conditions décrites dans la littérature (Entrées 3 et 5, Tableau 17) a été mise en place, à savoir une température de marquage de 40°C, un temps de marquage de 30 min, un tampon NaOAc à pH 4,5 et 1,5 équiv. de $Ga(NO_3)_3$ (Entrée 1, Tableau 18). Cette première condition testée n'a pas été concluante puisque le complexe attendu $^{nat}Ga-NO2A-AHM$ de $[M+H]^+$ $m/z_{théorique} = 635,09$ n'a pas pu être identifié par HPLC-MS avec le massif isotopique caractéristique de la présence d'un atome de gallium, malgré une consommation totale du produit de départ. L'analyse totale par HPLC-MS ($[M+H]^+$, $m/z_{observée} : 284,05$) et par RMN 1H a permis de caractériser le sous-produit de réaction **17**. Il s'agit d'un produit de clivage de la liaison entre l'hydrazine et le chélatant NOTA (Schéma 25). Un produit de $m/z : 392,05$ est observé à $t_R = 2,5$ min et pourrait correspondre au composé $^{nat}Ga-NOTA$ ($[M+Na]^+$, $m/z_{théorique} : 392,03$).



Conditions de réactions : i) 1,5 équiv. de $GaCl_3$, tampon NaOAc 0,1 M pH 4,5

Schéma 25 : Marquage de NO2A-AHM au gallium

Une optimisation des conditions de complexation au gallium a été entreprise afin de produire le complexe désiré avec modification de différents paramètres comme la température (TA, 40°C, 90°C), le nombre d'équiv. en Ga(NO₃)₃ (0,15 – 2), la molarité du tampon (0,1 et 0,7 M) ou le taux d'EtOH (0 – 50%) (Tableau 18).

Tableau 18 : Conditions de marquage de **NO2A-AHM** au gallium

Entrée	Équiv. Ga(NO ₃) ₃	Solvant	Temps de marquage (min)	T (°C)	Ratio NO2A-AHM/ ^{nat} Ga-NO2A-AHM/17 (HPLC 214 nm)
1	2	NaOAc 0,1 M pH 4,5	30	40	0/0/100
2	2	NaOAc 0,1 M pH 4,5/EtOH (1/1, v/v)	30	90	13/0/87
3	0,5	NaOAc 0,1 M pH 4,5/EtOH (1/1, v/v)	30	40	68/0/32
4	1	NaOAc 0,1 M pH 4,5	30	40	0/0/100
5	0,5	NaOAc 0,1 M pH 4,5	30	40	0/0/100
6	0,15	NaOAc 0,1 M pH 4,5	30	40	61/12/27
7	1	NaOAc 0,7 M pH 4,5	30	40	0/0/100
8	0,5	NaOAc 0,1 M pH 3,5	30	40	71/0/29
9	0,5	NaOAc 0,1 M pH 5,5	30	40	64/0/46
10	1	NaOAc 0,1 M pH 4,5	5 s 30	TA TA	0/40/60 0/0/100
11	1	HCl 0,1M/NaOAc 1,5 M/ H ₂ O/acide ascorbique 0,08 M (85/8/2/5, v/v/v/v)	30	TA	0/66/33
12	1	HCl 0,1M/NaOAc 1,5 M/ H ₂ O/acide ascorbique 0,08 M (85/8/2/5, v/v/v/v)	5	40	0/0/100

Toutes les conditions testées (Entrées 1-12, Tableau 18) conduisent à la consommation de **NO2A-AHM** et à l'apparition du composé **17**. Dans le cas de l'utilisation de 0,15 eq de Ga(NO₃)₃ (Entrée 6, Tableau 18), un mélange des trois espèces **NO2A-AHM** (61%), ^{nat}Ga-**NO2A-AHM** (12%) et du composé **17** (27%) est observé par HPLC-MS. Cependant, après réinjection en HPLC-MS du milieu réactionnel une heure après la réaction de complexation, un mélange de **NO2A-AHM** et du composé **17** est observé sans la présence du complexe ⁶⁹Ga-**NO2A-AHM**, montrant l'instabilité du complexe.

Pour tenter d'augmenter le ratio ^{nat}Ga-**NO2A-AHM** par rapport à **17**, d'autres paramètres sont modifiés (pH 3,5 – 5,5). Malheureusement, cela ne permet d'obtenir le complexe souhaité (Entrées 8-10, Tableau 18). Une plus faible consommation de **NO2A-AHM** après 30 min de réaction de complexation est observée en comparaison à la réaction menée à pH 4,5. Pour les conditions de l'Entrée 10, à t = 5 s, la présence du composé ^{nat}Ga-**NO2A-AHM** (40%) est observée, alors que celui-ci est absent après 30 min de marquage à TA. D'autres conditions de

marquage inspirées de la radiochimie au gallium-68 pour la production du [^{68}Ga]Ga-**NODAGA-K(Cy5)DKPPR** publié par Moussaron *et al.* ont été testés en présence de l'antioxydant ascorbate mais n'ont pas non plus été concluante (Entrées 11-12, Tableau 18).^[223] Pour les conditions de l'Entrée 11, la formation de $^{\text{nat}}\text{Ga-NO}_2\text{A-AHM}$ (66%) est observée après 30 min à TA. Cependant, après analyse HPLC-MS deux heures après marquage, le composé $^{\text{nat}}\text{Ga-NO}_2\text{A-AHM}$ n'est cependant plus présent dans le mélange et seul le composé **17** était visible. Pour les trois conditions permettant d'observer la formation de $^{\text{nat}}\text{Ga-NO}_2\text{A-AHM}$ (Entrées 6, 10 et 11, Tableau 18), celui-ci n'est pas stable dans le temps. Cela nous laisserait penser que le complexe $^{\text{nat}}\text{Ga-NO}_2\text{A-AHM}$ instable pourrait se transformer en composé **17** plus stable.

2.1.2. Cinétique de formation de $^{\text{nat}}\text{Ga-NO}_2\text{A-AHM}$ et du composé **17**

Lors de la phase d'optimisation de la réaction, nous avons observé que le composé $^{\text{nat}}\text{Ga-NO}_2\text{A-AHM}$ pouvait se former dans certaines conditions, notamment quand le temps de réaction et la température de marquage étaient élevés. Pour tenter de comprendre la formation du composé **17**, une cinétique à 0°C est réalisée par HPLC-MS sur une période de 3 heures (Figure 39). À $t = 5$ s, soit immédiatement après la mise en contact du gallium, la quasi-totalité du composé de départ est consommé et nous avons réussi à observer la présence du complexe $^{\text{nat}}\text{Ga-NO}_2\text{A-AHM}$ à hauteur de 60%. L'espèce **17** est également présente à $t = 5$ s à hauteur de 30%. Au cours du temps, la disparition progressive du complexe $^{\text{nat}}\text{Ga-NO}_2\text{A-AHM}$ et l'apparition du composé **17** sont observées. Au bout de 3 heures de mise en contact, l'intégralité du $^{\text{nat}}\text{Ga-NO}_2\text{A-AHM}$ présent a été consommé.

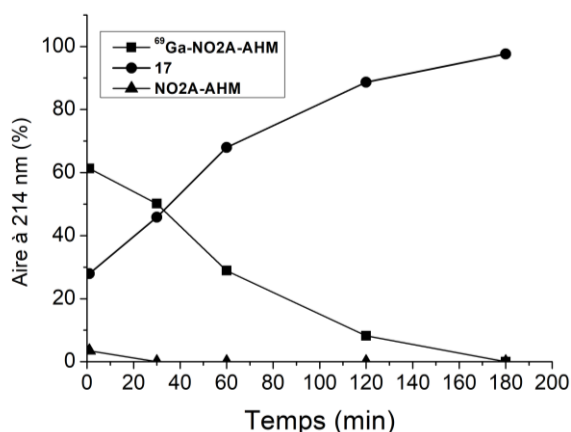


Figure 39 : Cinétique de formation de $^{\text{nat}}\text{Ga-NO}_2\text{A-AHM}$ et du composé **17** déterminée par HPLC (214 nm)

Ce test nous laisserait penser que la complexation du gallium s'opère instantanément, prouvant ainsi que l'ACB développé a une très forte affinité pour le gallium et que cette complexation induit ensuite son clivage.

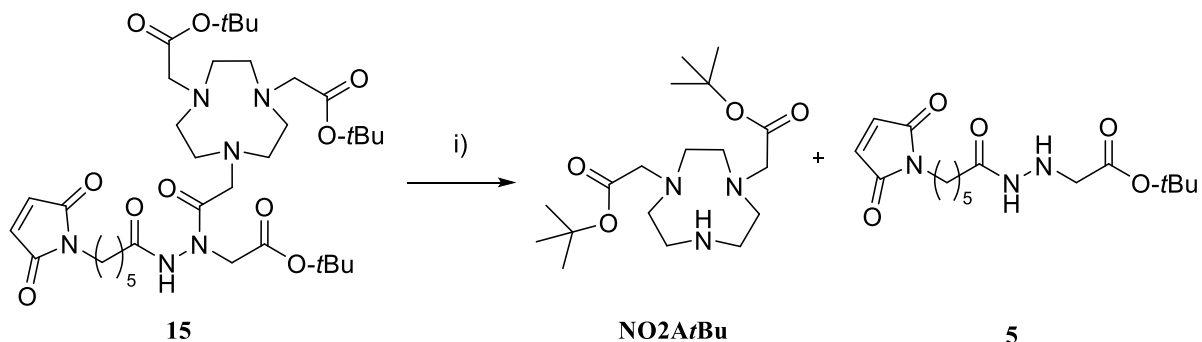
2.1.3. Influence des contre-ions du gallium sur la coupure

Pour tenter de déterminer si le gallium est bien impliqué dans la coupure du composé, une autre forme de gallium, du GaCl₃, est mise en contact avec **NO2A-AHM** dans un milieu NaOAc pH 4,5 0,1 M à 40°C pendant 30 min, mais de même, ce dernier provoque la coupure de la molécule.

2.1.4. Évaluation chimique de la coupure

Afin de s'assurer que les conditions réactionnelles ne provoquaient pas la coupure du composé, des tests sans présence de gallium (GaCl₃ ou Ga(NO₃)₃) sont réalisés en faisant varier la température (40 et 90°C), le pH (3,5, 4,5 et 5,5) et le taux d'EtOH (0 et 50%) mais aucune dégradation du composé initiale n'a été observée pour toutes ces conditions testées. Cela laisse donc penser que le gallium est le responsable de la coupure de la molécule.

Afin de confirmer que la complexation du gallium induit l'hydrolyse de la molécule, des tests de marquage du composé protégé par des *t*Bu (composé **15**) sont mis en œuvre (Schéma 26). En effet, en protégeant les acides carboxyliques par des groupement *t*Bu, seul l'ensemble donneurs N₃ de la cage est disponible pour la complexation, limitant ainsi la complexation du gallium et la stabilité du complexe formé. Après un marquage pendant 30 min à 40°C, aucune réaction n'est observée et le produit **NO2A-AHM** reste intact. En chauffant 30 min à 90°C, la formation partielle du composé **5** (29%) issue de la complexation du gallium suivie de la coupure de **15** est observée. La coupure pourrait s'expliquer par la complexation du gallium uniquement par les trois azotes du cycle NOTA.



Conditions et réactifs : conditions de réactions : 1,5 équiv. GaCl₃, tampon NaOAc 0,1 M pH 4,5, 40/90°C

Schéma 26 : Impact du gallium sur le composé **15**

Afin de comprendre l'influence du cycle chélatant NOTA sur le clivage de la liaison amide portée par l'hydrazine, deux analogues de **NO2A-AHM** ont été développés (Figure 40).

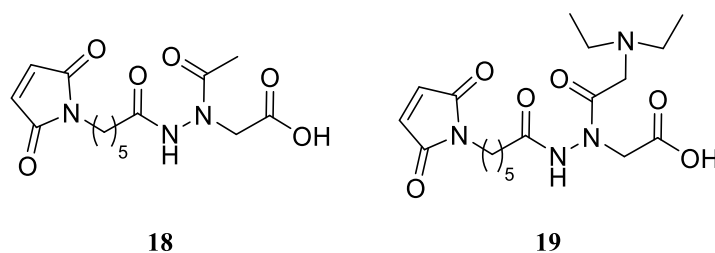
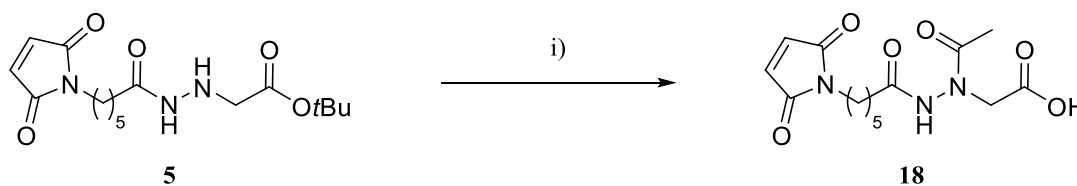


Figure 40 : Structures chimiques des analogues **18** et **19**

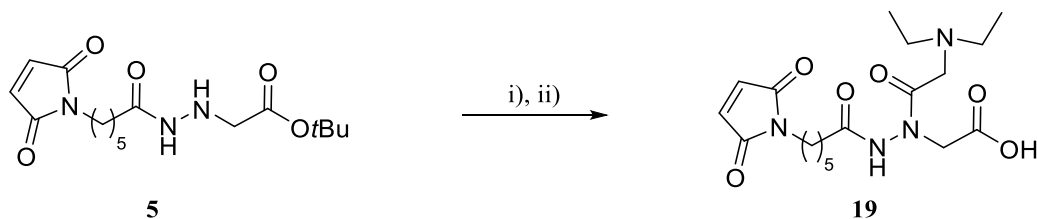
Le premier, **18**, possède un motif hydrazine couplée au bras chélatant et bras maléimide ainsi qu'au groupement C(O)-CH₃ mimant l'espaceur entre l'hydrazine et la cage NOTA. Il ne comporte donc pas de cage NOTA. Il a été synthétisé selon le schéma 27 en 1 étape par la réaction entre le composé **5** et du chlorure d'acétyle. L'HCl produit lors de la réaction d'acylation entre le chlorure d'acide et l'atome d'azote β de l'intermédiaire **5** déprotège l'acide carboxylique du bras chélatant. Après purification par RP-HPLC, le composé **18** est obtenu avec un rendement de 53% et une pureté >98% à 214 nm.



Conditions et réactifs : i) Cl(O)CH₃, DCM, 35 min, TA, 53%.

Schéma 27 : Synthèse du composé **18**

Le composé **19**, correspond au composé **NO2A-AHM** pour lequel le cycle NOTA est substitué par de la diéthylamine. Il a été synthétisé selon le Schéma 28. La stratégie de synthèse du composé **19** consiste à fixer le bras espaceur ainsi que la diéthylamine par S_N2 en « one pot » sur le composé **5**. Ainsi, la réaction est réalisée en mettant en contact l'intermédiaire **5** avec du bromure de bromoacétyle et de la diéthylamine remplaçant la pyridine utilisée pour la synthèse du composé **14**. Puis, la déprotection des *t*Bu par du TFA permet l'obtention du composé **19** en deux étapes avec un rendement global de 64% et une pureté > 98% à 214 nm.



Conditions et réactifs : i) Cl(O)CH_3 , diéthylamine, DCM, TA, 15 min, ii) TFA, DCM, 5 heures, TA, 64%.

Schéma 28 : Synthèse du composé 19

Ces deux analogues conservent la fonction amide se faisant couper par le gallium. Pour la structure du composé 19, le cycle NOTA substitué par de la diéthylamine permet de supprimer la cage chélatante afin de retirer la capacité de la molécule à complexer le gallium mais conserve l'amine tertiaire présent sur le composé pour voir s'il aurait un impact ou non sur la sélectivité de la coupure.

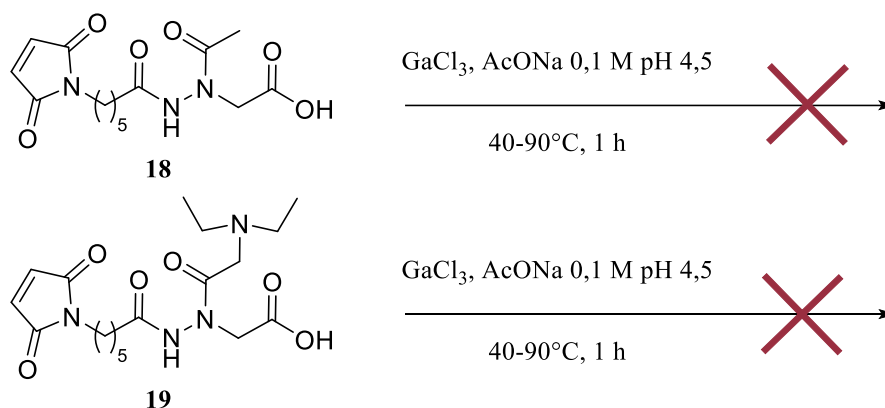


Schéma 29 : Mise en contact des composés 18 et 19 avec du GaCl_3 .

Lors de la mise en contact des analogues avec du gallium dans des conditions de complexation classique (1,5 équiv. de GaCl_3 , tampon NaOAc 0,1 M pH 4,5, température : 40 – 90°C), aucune production du composé 17 n'est observé (Schéma 29). Cela prouve que la complexation du gallium par la cage NOTA est indispensable au clivage du complexe et que les analogues synthétisés ne possèdent pas la capacité de complexer le gallium.

2.1.5. Proposition de mécanisme de la coupure

Pour essayer de proposer un mécanisme réactionnel, nous avons tourné notre étude bibliographique vers les enzymes et plus particulièrement sur les métalloprotéases. En effet, plusieurs métalloenzymes complexant un atome de zinc sont capables d'hydrolyser des peptides ou protéines après reconnaissance d'un motif spécifique. Par exemple, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (EC 3.4.15.1.) hydrolyse l'angiotensine I en angiotensine II après

reconnaissance du motif Phe-His-Leu et coupe l'angiotensine I entre le résidu phénylalanine et histidine.^[225] L'atome de zinc est coordonné dans le site actif de l'enzyme par trois histidines (métalloprotéases matricielles (MMP)) ou deux histidines et un acide glutamique (Glu) (enzyme de conversion de l'angiotensine) en fonction des métalloprotéases (Figure 41).

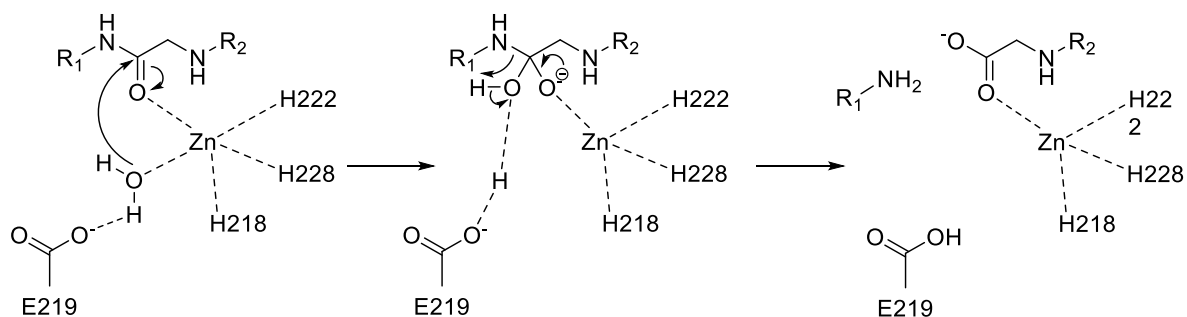


Figure 41 : Mécanisme d'hydrolyse par une métalloprotéase.^[226]

Le mécanisme de protéolyse implique une molécule d'eau interagissant avec un résidu acide glutamique du site actif par une liaison hydrogène. Cela permet alors l'activation de la molécule d'eau. La protéine insérée dans le site actif de l'enzyme va interagir avec l'atome de zinc en formant une liaison de coordination avec l'oxygène de la fonction amide à hydrolyser. Un complexe est ainsi formé entre l'enzyme, le zinc et la protéine. Le zinc attire alors vers lui les électrons de l'oxygène et du carbone à sa base créant ainsi une déficience en électron au pied du carbonyle du lien amide induisant un carbone électropositif. Le pied du carbonyle est alors attaqué par une molécule d'eau conduisant à la formation d'un diol géminale induisant la rupture du lien amide et l'hydrolyse de la protéine.^[228,229] Il est donc supposé qu'un mécanisme similaire s'opère sur notre composé. D'autant plus que lorsque le gallium est hexacoordonné par le cycle NOTA et le carbonyle, l'acide carboxylique du bras chélatant est disponible et pourrait très bien former une liaison hydrogène avec une molécule d'eau du milieu rendant ainsi la réaction très rapide. Ainsi, une proposition de mécanisme est présentée Figure 42.

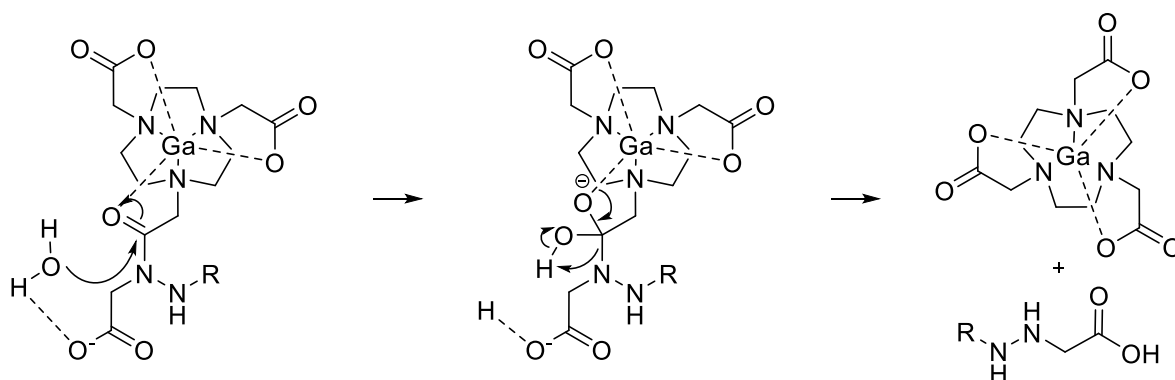
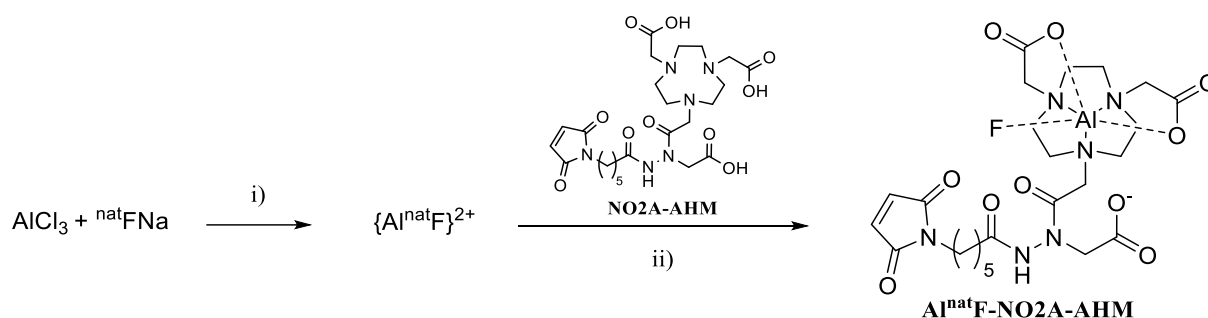


Figure 42 : Mécanisme supposé de la coupure de **NO2A-AHM** par le gallium

2.2. Étude de complexation de l' $\text{Al}^{\text{nat}}\text{F}$ par NO2A-AHM

La formation du complexe $\text{Al}^{\text{nat}}\text{F-NO2A-AHM}$ est réalisée par réaction entre le complexe $\{\text{AlF}\}^{2+}$ et notre ACB (Schéma 30). La première étape consiste à créer *in situ* le complexe $\{\text{AlF}\}^{2+}$ en utilisant 4,5 équiv. de NaF et 1,5 équiv. d' AlCl_3 dans du tampon NaOAc 0,1 M pH 4,5 pendant 5 min à TA. L'ion Al^{3+} étant un acide dur et l'anion F^- étant une base dure, la liaison entre les deux se forme préférentiellement et très rapidement (580-670 kJ/mol).^[89]



Conditions et réactifs : i) EtOH/tampon NaOAc 0,1 M pH 4,5 (1/1, v/v), AlCl_3 (1,5 équiv.), NaF (4,5 équiv.), 20 min, TA, ii) NO2A-AHM (1 équiv), NaOAc 0,1 M pH 4,5, 70°C, 30 min, 75%.

Schéma 30 : Synthèse de $\text{Al}^{\text{nat}}\text{F-NO2A-AHM}$

La seconde étape consiste à complexer le NO2A-AHM (1 équiv.) dissout dans du tampon NaOAc pH 4,5 0,1 M avec $\{\text{AlF}\}^{2+}$ pendant 30 min. La présence du complexe $\text{Al}^{\text{nat}}\text{F-NO2A-AHM}$ a été confirmée par HPLC-MS ($[\text{M}+\text{H}]^+$, $m/z_{\text{calculé}}$: 613,21, $m/z_{\text{observé}}$: 613,15). Le choix du tampon, du pH, du taux d'EtOH, du temps et de la température de marquage ont été fait grâce à l'étude bibliographique (Tableau 17). L'optimisation du TC de $\{\text{AlF}\}^{2+}$ dans notre ACB, déterminé par HPLC, a été réalisée en étudiant différents facteurs :

- L'impact de la **température de marquage** sur le TC (Figure 43). Selon la nature du chélateur, la température optimale de marquage n'est pas la même. Une plage de température allant de 40° à 90°C a été étudiée. Cette étude nous a permis de voir qu'il est nécessaire d'avoir une température minimale de 70°C pour atteindre un TC >99%.

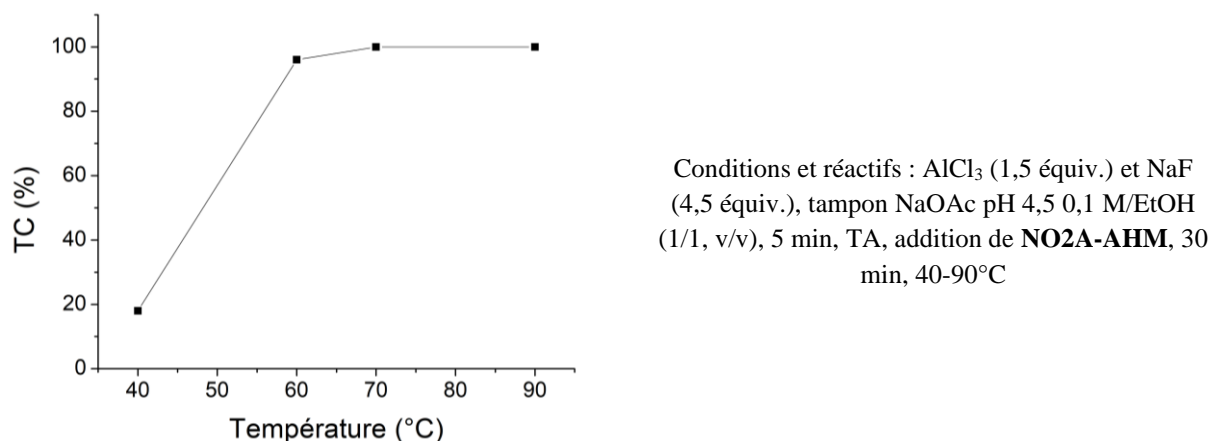


Figure 43 : Influence de la température sur le TC de NO₂A-AHM en Al^{nat}F-NO₂A-AHM

- L'impact du **taux d'EtOH** sur le TC a été étudié sur une gamme de 0% à 50% (v/v) (Figure 44). En effet, certaines études sur les radiotraceurs Al¹⁸F ont démontré l'importance de l'utilisation d'un co-solvant tel que l'EtOH^[89,230,231] pour obtenir un rendement élevé de marquage. Ces résultats montrent l'intérêt de l'ajout d'EtOH puisqu'à 0% (*i.e.*, NaOAc pH 4,5 0,1 M), le TC est de 60%, alors que lorsque le taux d'EtOH est de 50% (*i.e.*, NaOAc pH 4,5 0,1 M/EtOH, 1/1, v/v), le TC est supérieur à 99%. Des conclusions similaires sur l'impact de l'EtOH ont été faites par Kang *et al.* pour le radiomarquage du chélateur NODA en utilisant la stratégie aluminium-fluor.^[230]

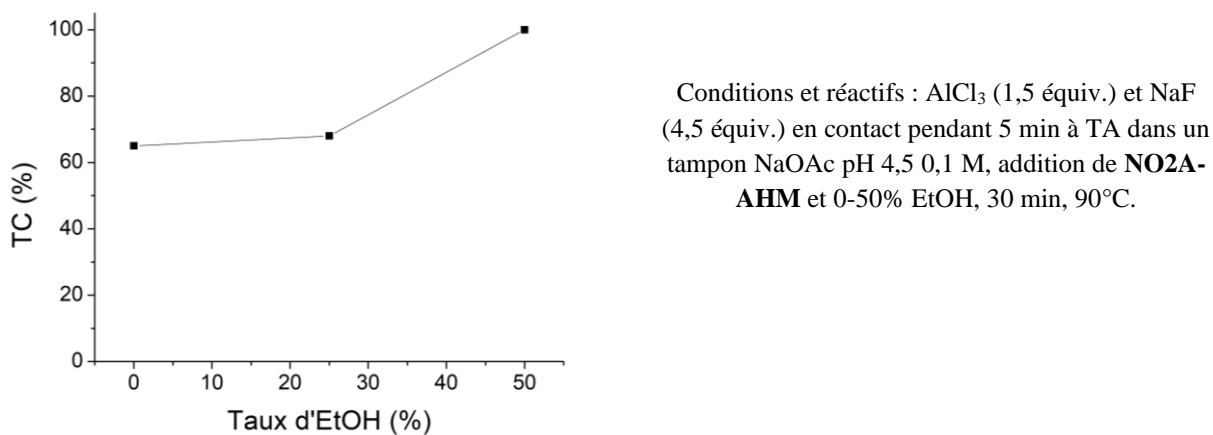
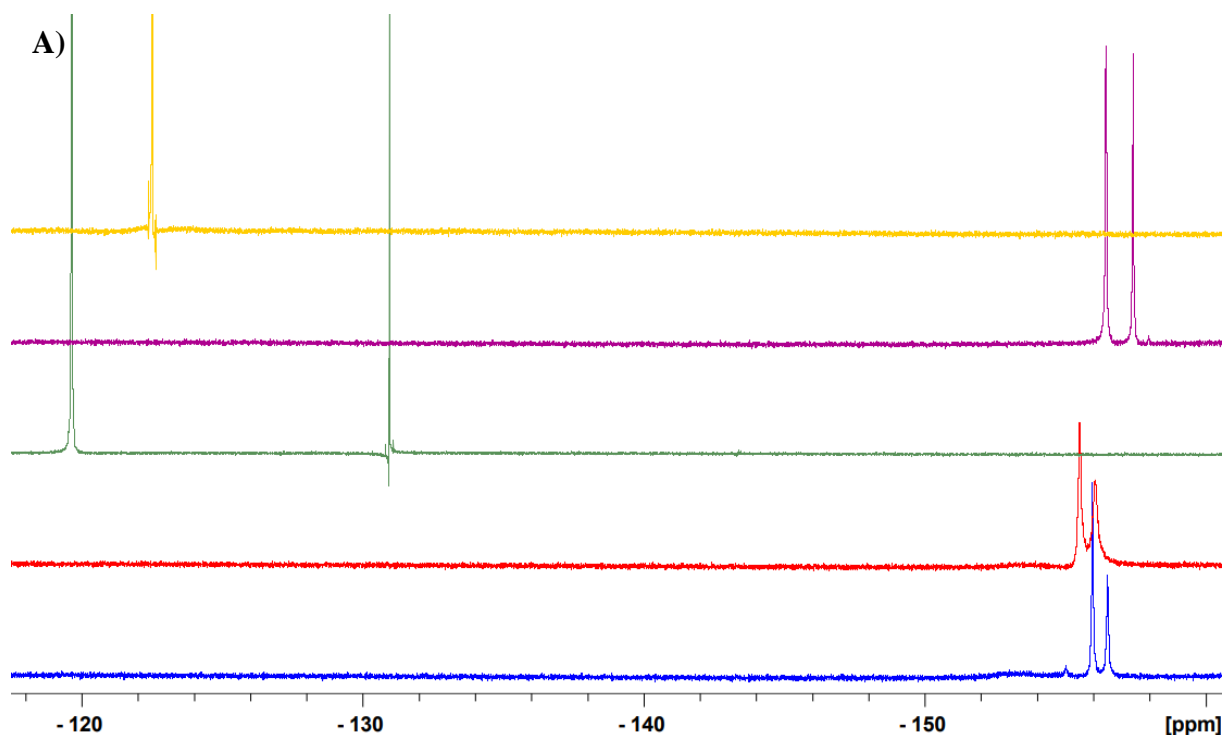


Figure 44 : Influence de l'EtOH (en % du volume total) sur le TC.

Les meilleures conditions trouvées sont un tampon NaOAc 0,1 M pH 4,5, 50% d'EtOH, 70°C pendant 30 min avec un TC de 99% déterminé par HPLC-MS. Le complexe Al^{nat}F-NO₂A-AHM a été directement purifié par HPLC en phase inverse (RP-HPLC) pour éliminer le sel du tampon et l'excès de NaF et AlCl₃. Aucune décomplexation n'a été observée après purification. Un excellent rendement de 75% a été obtenu avec une bonne pureté >95%.

Une étude concernant la formation du complexe $\{AlF\}^{2+}$ a également été menée par des mesures de RMN ^{19}F et ^{27}Al . Pour cela, différentes solutions de $AlCl_3$, NaF et $AlCl_3 + NaF$ (1 et 3 équiv. de NaF par rapport à $AlCl_3$) ont été préparées dans du D_2O ou dans un tampon $NaOAc$ 0,1 M à pH 4,5. En ce qui concerne les échantillons de NaF , différents spectres RMN ^{19}F ont été observés selon qu'il était solubilisé dans du D_2O ou dans le tampon (Figure 45A, spectres jaune et vert). En présence de D_2O , un singulet à -122,5 ppm a été détecté alors que le spectre RMN ^{19}F dans le tampon présentait deux singulet à -121,5 et -131,0 ppm, ce qui pourrait être expliqué par certaines interactions entre l'ion fluorure et le $NaOAc$. Concernant le spectre RMN ^{27}Al d' $AlCl_3$ dans du D_2O ou dans le tampon (Figure 45B, spectres jaune et vert), selon les données de la littérature,^[232,233] deux singlets à $\delta \sim 0,6$ ppm (net) et à $\delta \sim 5$ ppm (large) ont été observés dans les deux solvants correspondant à des ions $Al(III)$ hexacoordonnés sous forme de complexe $[Al(D_2O)_6]^{3+}$ et d'oligomères, respectivement. Le spectre dans du D_2O a également présenté un singulet à δ 63,8 ppm qui est attribuable à un ion $Al(III)$ tétracoordonné. Dans le mélange d' $AlCl_3$ avec 1 ou 3 équiv. de NaF dans du D_2O ou dans un tampon (Figure 45A,B, spectres violet et rouge), des changements significatifs ont été observés sur les spectres RMN ^{19}F et ^{27}Al par rapport à ceux d' $AlCl_3$ et NaF seuls, avec deux pics autour de δ -156 et 157 ppm sur les spectres RMN ^{19}F et un large singulet à $\delta \sim 1,5$ ppm sur les spectres RMN ^{27}Al . Ces modifications suggèrent une interaction et la formation de liaisons entre les ions $Al(III)$ et F^- .



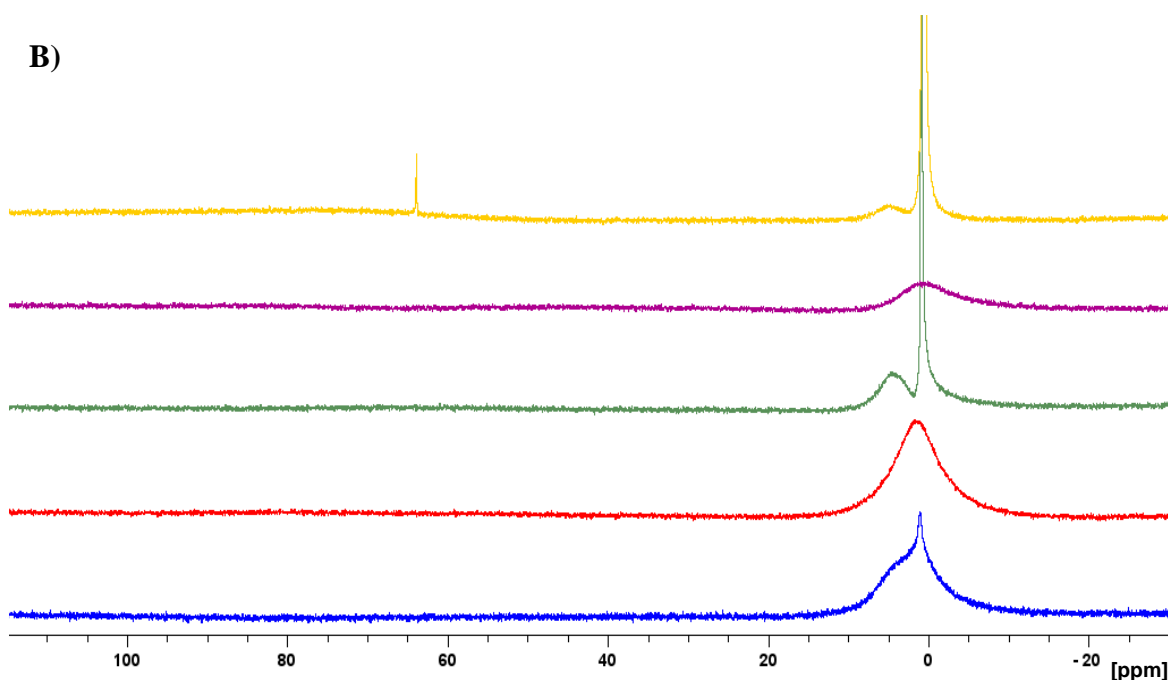


Figure 45 : (A) Spectres RMN ^{19}F (376 MHz, 300 K) de NaF dans D_2O (jaune), AlCl_3 + 3 équiv. NaF dans D_2O (violet), NaF dans tampon (vert), AlCl_3 + 3 équiv. NaF dans tampon (rouge), AlCl_3 + 1 équiv. NaF dans tampon (bleu). (B) Spectres RMN ^{27}Al (104 MHz, 300 K) de AlCl_3 dans D_2O (jaune), AlCl_3 + 3 équiv. NaF dans D_2O (violet), AlCl_3 dans tampon (vert), AlCl_3 + 3 équiv. NaF dans tampon (rouge), AlCl_3 + 1 équiv. NaF dans tampon (bleu).

La comparaison des spectres RMN ^1H des composés **NO2A-AHM** et **Al^{nat}F-NO2A-AHM** montre une modification des massifs correspondant aux protons du cycle (Figure 46) et permet de prouver la complexation de $\{\text{AlF}\}^{2+}$ par **NO2A-AHM**. La région de δ 3,21 - 3,46 ppm avec un singulet et deux triplets correspond aux 12 protons du cycle NOTA (*i.e.*, les six groupes méthylènes du squelette du cycle NOTA) et le singulet à δ 3.93 ppm intégrant pour six protons correspond aux protons des trois chaînes latérales alkyles (les deux du cycle NOTA et le bras chélatant ($\text{N-CH}_2\text{-COO}^-$)). Après complexation avec $\{\text{AlF}\}^{2+}$, le spectre RMN ^1H a montré un massif intégrant pour vingt-deux protons dans la région de δ 2,76 - 3,86 ppm contenant des multiplets se chevauchant dus au dédoublement des douze protons du cycle NOTA (cycle $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$) et des trois chaînes latérales alkyles (3 $\text{N-CH}_2\text{-COO}^-$) du cycle NOTA et du bras chélatant. Ces multiplets peuvent être expliqués par les interconversions de conformation du cycle et par les protons des chaînes latérales alkyles qui ne sont plus équivalents lors de la coordination.^[89,234] Des spectres RMN ^{27}Al et ^{19}F de **Al^{nat}F-NO2A-AHM** ont été réalisés à 283 K dans le D_2O . Le spectre RMN ^{19}F a montré l'incorporation du fluor par un signal à -176,3 ppm. Le spectre RMN du ^{27}Al a confirmé l'incorporation d'aluminium par un signal à 40,5 ppm (Annexe 1A,B).

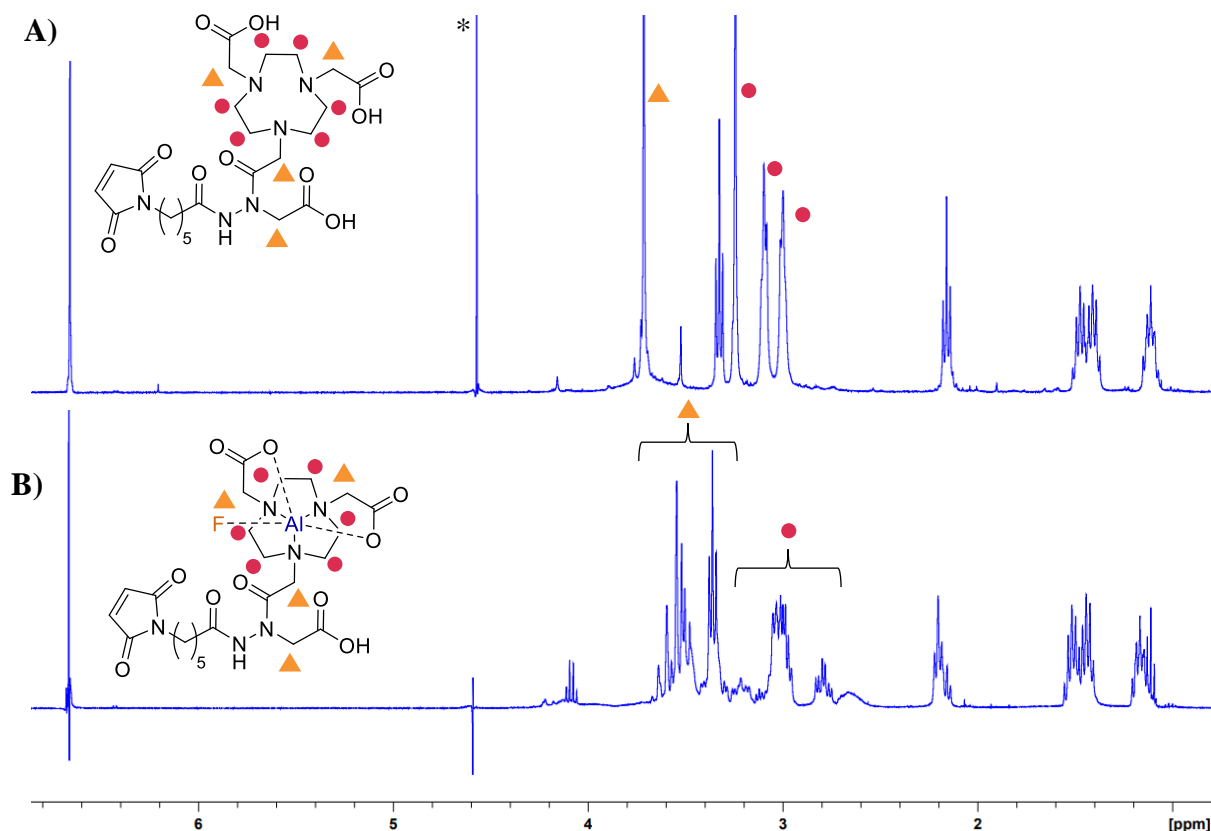


Figure 46 : (a) spectre RMN ^1H de **NO2A-AHM** et de (b) **Al^{nat}F-NO2A-AHM** dans le D_2O à 330 K (400 MHz) (* : le pic à 4,75 ppm correspond à H_2O)

La stabilité du complexe **Al^{nat}F-NO2A-AHM** a été étudiée dans du PBS (Phosphate-buffered saline) 0,1 M pH 7,4, de l'eau et du tampon NaOAc pH 4,5 0,1 M par analyse HPLC. Aucune défluoration et démétallation de $\{\text{AlF}\}^{2+}$ n'ont été observées après 6 heures (Figure 47).

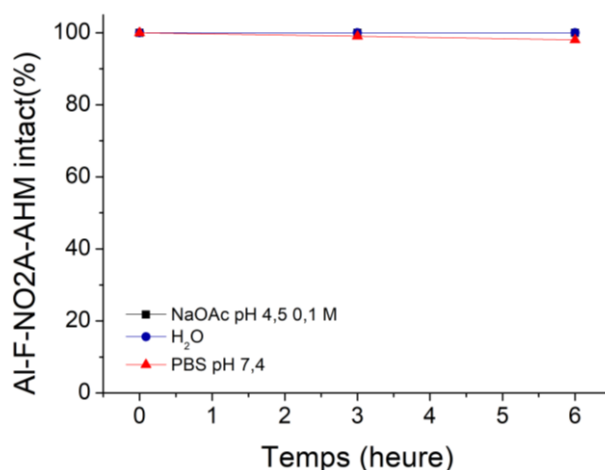


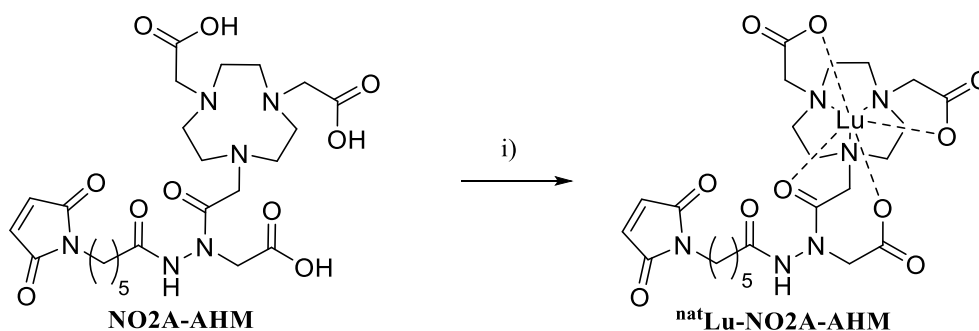
Figure 47 : Stabilité au cours du temps de **Al^{nat}F-NO2A-AHM** dans du PBS 0,1 M pH 7,4, de l'eau et du tampon NaOAc pH 4,5 0,1 M mesuré par HPLC à 214 nm

Lors de la synthèse du complexe **Al^{nat}F-NO2A-AHM** (échelle : 10 mg) pour la caractérisation RMN et les essais de formation de cristaux pour l'obtention de données structurales des

complexes, une légère proportion du produit **17** a été observée par HPLC-MS (ratio d'aire des pics à 214 nm **NO2A-AHM**/**Al^{nat}F-NO2A-AHM**/**17** : 92/3/5). Lors des essais d'optimisation des conditions de marquage à l'aluminium-fluor, les quantités du composé **17** formées étaient trop faibles pour être détectées par HPLC-MS. Cependant, après purification de **Al^{nat}F-NO2A-AHM**, le complexe est stable en solution et aucune formation du composé **17** n'est observé.

2.3. Étude de complexation de ^{nat}Lu par NO2A-AHM

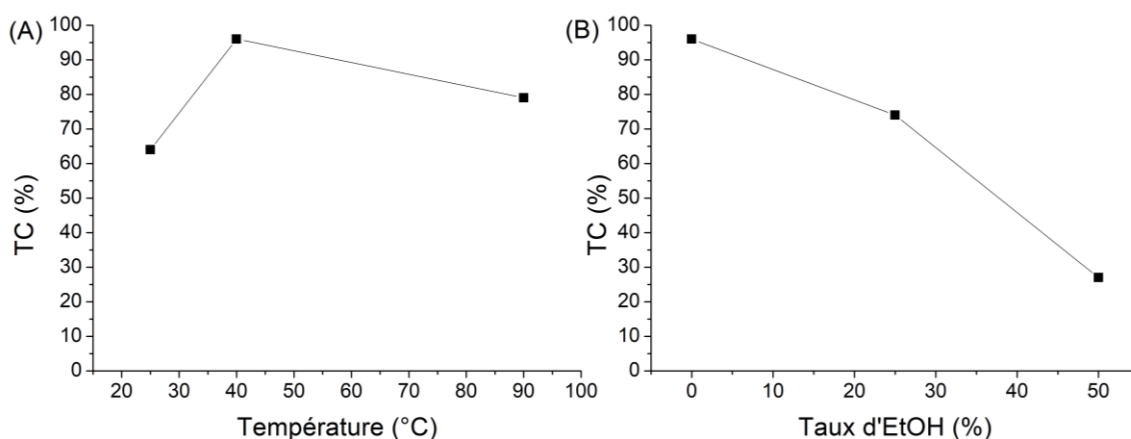
Pour complexer le lutécium, 1,5 équiv. de Lu(NO₃)₃ ont été mis en contact dans un tampon NaOAc 0,1 M pH 4,5 avec **NO2A-AHM** (Schéma 31). La formation du complexe ^{nat}Lu-**NO2A-AHM** a été confirmée par HPLC-MS ([M+H]⁺ m/z_{théorique} : 741,17, m/z_{observé} : 741,15).



Conditions et réactifs : i) Tampon NaOAc 0,1 M pH 4,5, Lu(NO₃)₃ (1,5 équiv.), 40°C, 30 min, 71%.

Schéma 31 : Synthèse de ^{nat}Lu-NO2A-AHM

L'impact de la température de marquage et taux d'EtOH sur le TC a été étudié (Figure 48).



Conditions et réactifs : (A) Lu(NO₃)₃ (1,5 équiv.) et **NO2A-AHM** (1 équiv.) dans tampon NaOAc pH 4,5 0,1 M, 30 min, 25-90°C. (B) 1,5 équiv. Lu(NO₃)₃ (1,5 équiv.) et **NO2A-AHM** (1 équiv.) dans tampon NaOAc pH 4,5 0,1 M/EtOH en différents ratios (v/v), 30 min, 90°C.

Figure 48 : Influence (A) de la température de marquage et (B) du taux d'EtOH (en % du volume total), sur le TC de ^{nat}Lu-NO2A-AHM

Pour la température, 94% de TC a été obtenu à TA après 3,5 heures de marquage alors qu'un TC de 98% est obtenu au bout de 30 min à 40°C. Cette observation montre que la cinétique de complexation augmente lorsque la température augmente. Des essais ont également été réalisés à haute température (90°C) mais le TC est plus faible (79%) qu'à 40°C. Ce résultat peut être expliqué par la nature hybride cyclique/acyclique de **NO2A-AHM** en tant que chélateur acyclique pouvant complexer le métal à basse température (25-40°C).

Concernant le taux d'EtOH, les résultats montrent que la présence de co-solvant tel que l'EtOH a un effet délétère vis-à-vis du TC. Les meilleurs résultats de complexation sont obtenus sans aucun co-solvant.

Les meilleures conditions trouvées sont l'utilisation d'un tampon NaOAc 0,1 M pH 4,5, 40°C pendant 30 min. Ces conditions conduisent à un TC de 98% déterminé par HPLC. Le complexe ^{nat}**Lu-NO2A-AHM** a ensuite été purifié par RP-HPLC pour éliminer le sel du tampon et l'excès de Lu(NO₃)₃. La purification par HPLC doit être effectuée sans présence de TFA car une décomplexation à hauteur de 35% est observée. ^{nat}**Lu-NO2A-AHM** a été obtenu avec un excellent rendement de 66% et une bonne pureté >98%.

La comparaison des spectres RMN ¹H des composés **NO2A-AHM** et ^{nat}**Lu-NO2A-AHM** montre une modification des massifs correspondant aux protons du cycle (Figure 49) et permet de prouver la complexation de Lu³⁺ par **NO2A-AHM**. Après complexation avec Lu³⁺, le spectre RMN ¹H a montré un massif intégrant pour douze protons dans la région de δ 2,90 - 3,40 ppm contenant des multiplets peu résolus se chevauchant dus au dédoublement des 12 protons du cycle NOTA (cycle N-CH₂-CH₂-N) (initialement dans la région de δ 3,21 - 3,46 ppm). Un dédoublement du singulet initialement à δ 3,93, intégrant pour les trois chaînes latérales alkyles (3 N-CH₂-COO⁻), est observé. Ces multiplets peuvent être expliqués par les interconversions de conformation du cycle et par les protons des chaînes latérales alkyles qui ne sont plus équivalents lors de la coordination.

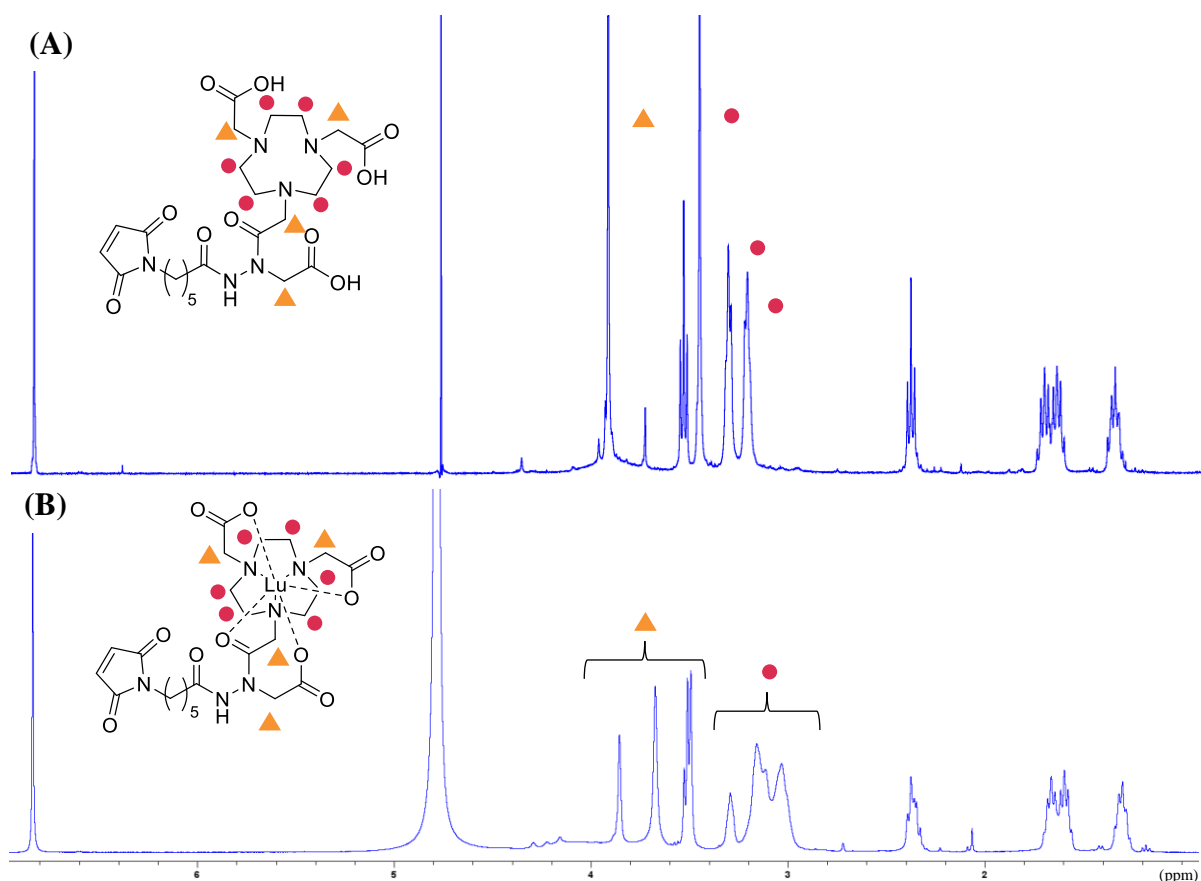


Figure 49 : (A) Spectres RMN ^1H de **NO2A-AHM** et de (B) $^{\text{nat}}\text{Lu-NO2A-AHM}$ dans le D_2O à 330 K (400 MHz) (le pic à 4,75 ppm correspond à H_2O)

Le complexe $^{\text{nat}}\text{Lu-NO2A-AHM}$ est modérément stable dans du PBS car 53% de décomplexation ont été observés après 17 jours (Figure 50). La stabilité du complexe est néanmoins bonne dans l'eau et le tampon NaOAc, puisque, respectivement, 11 et 8% de décomplexation sont observés avec 18 jours.

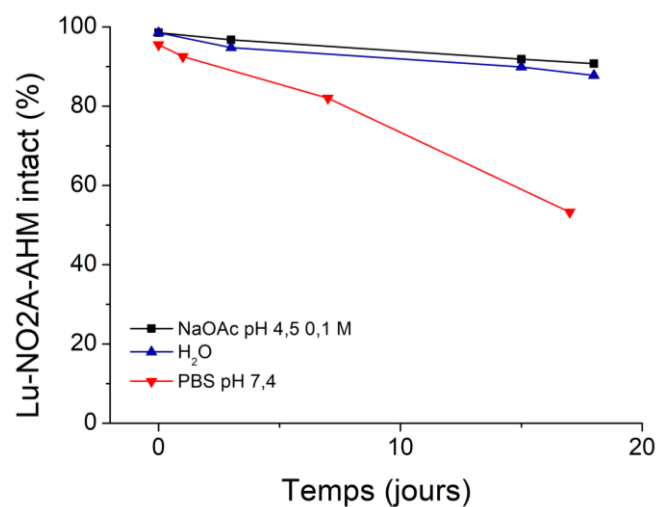
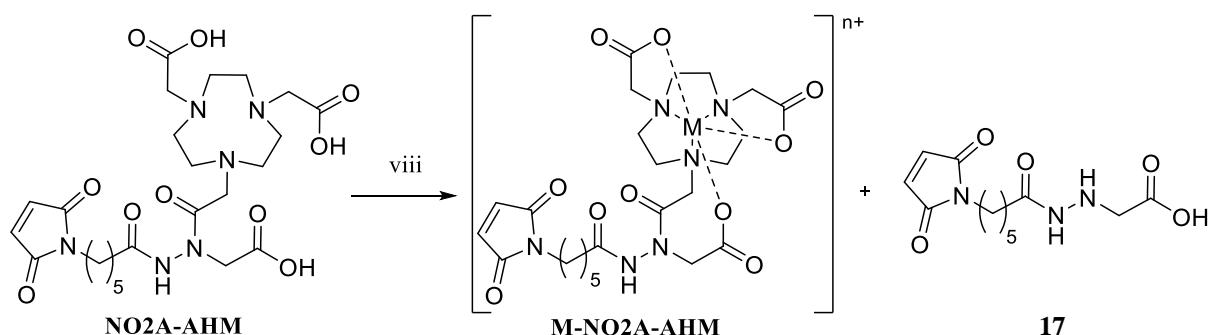


Figure 50 : Stabilité dans le temps de $^{\text{nat}}\text{Lu-NO2A-AHM}$ dans du PBS pH 7,4 de l'eau et du tampon NaOAc pH 4,5 0,1 M mesuré par HPLC à 214 nm

2.4. Étude de complexation d'autres métaux par NO2A-AHM

Nous avons pu voir dans les paragraphes précédents que l'aluminium et surtout le gallium possèdent la capacité d'induire une réaction secondaire de coupure de la fonction amide située entre l'hydrazine et la cage après leur complexation avec **NO2A-AHM**. Afin de mieux comprendre ce mécanisme de réaction, nous avons étudié la complexation d'autres métaux par **NO2A-AHM** (Schéma 32).



Conditions et réactifs : i) Tampon NaOAc 0,1 M pH 4,5, 1,5 équiv. M^{n+} (1,5 équiv.), 40°C, 30 min.

Schéma 32 : Synthèse de différents **M-NO2A-AHM**

Dans un premier temps, des cations chargés 3+, comme le gallium et lutécium, sont testés avec les éléments aluminium (Al^{3+}) et fer (Fe^{3+}) (Entrées 4-5, Tableau 19). Le produit **17** est observé majoritairement après 30 min, alors que le composé complexé n'est jamais observé.

Pour confirmer l'influence de la charge, le cation 2+ cuivre (Cu^{2+}) est testé, et comme pour $\{AlF\}^{2+}$, une complexation par **NO2A-AHM** majoritaire est observée (Entrée 6, Tableau 19). Le complexe au cuivre est stable en solution tampon NaOAc pH 4,5 0,1 M pendant 6 mois. On peut donc supposer que les éléments de charges globales 2+ n'induisent pas de clivage tandis que des éléments de charges 3+ induisent le clivage. Concernant le lutétium chargé 3+, le fait qu'il n'induit un clivage mais qu'en proportion bien moindre que Ga^{3+} , cela pourrait être expliqué par le fait que c'est un lanthanide et qu'il n'a donc pas les mêmes couches électroniques ni le même rayon atomique que le gallium.

Tableau 19 : Conditions de marquage de **NO2A-AHM** à l'aluminium, aluminium-fluor, au gallium, lutécium, fer et cuivre, solvant : tampon NaOAc pH 4,5 0,1 M, 30 min

Entrée	Métal	Charge du Métal	Équiv.	Température (°C)	Ratio NO2A-AHM/M-NO2A-AHM/17 (HPLC 214 nm)
1	Ga(NO ₃) ₃	+3	1	40	0/0/100
2	AlCl ₃ + NaF	+2	1,5 + 4,5	90	0/0/100
3	Lu(NO ₃) ₃	+3	1,5	40	2/0/98
4	AlCl ₃	+3	1,5	90	0/0/100
5	Fe(NO ₃) ₃	+3	1,5	40	58/0/42
6	CuCl ₂	+2	1,5	40	0/100/0

2.5. Conclusion de l'étude de complexation

Les études de complexation de **NO2A-AHM** par les métaux d'intérêts gallium, lutécium et aluminium-fluor ont montré que l'ACB conçu ne permet pas d'obtenir des complexes stables pour des cations trivalents comme le gallium. Afin de mieux comprendre la conformation tridimensionnelle des complexes, des tentatives de formations de monocristaux ont été menées mais n'ont pas conduit à l'obtention de monocristaux permettant une étude de la structure par cristallographie. Pour pallier cela, une étude des structures 3D par modélisation moléculaire a été réalisée en collaboration avec le Pr Antonio Monari du laboratoire ITODYS (Université Paris Diderot-CNRS).

3. Modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire est une technique de chimie qui comme son nom l'indique, permet de modéliser la structure des complexes *in silico* par calculs mathématiques. Avec cette technique, différents conformères peuvent être modélisés où le nombre de liaisons de coordination peut varier, ce qui a un réel intérêt pour l'étude de notre ACB hybride cyclique/acyclique et valider l'intérêt du bras chélatant supplémentaire pour la complexation.

3.1. Modélisation moléculaire des cations trivalents

3.1.1. Modélisation du complexe Al-NO2A-AHM

Pour évaluer pleinement la complexation entre **NO2A-AHM** et l'aluminium trivalent (Al(III)), la stabilité de trois conformères différents a été étudiée à l'aide de la théorie de la fonctionnelle de la densité en utilisant la fonctionnelle B3LYP et la base 6-31G(d)* (Figure 51). Dans ce

cadre, le résultat le plus remarquable est la comparaison entre le complexe pentacoordonné (Penta_Al) et le complexe hexacoordonné (Hexa_Al_bras) dans lequel le site de coordination libre sur le métal est occupé par le bras chélatant supplémentaire. Nous avons trouvé une différence d'énergie libre significative (ΔG ca. 30 kcal/mol) en faveur du complexe Hexa_Al_bras. Pour permettre une meilleure comparaison avec la situation rencontrée en solution, nous avons également rempli le site de coordination vacant du complexe Penta_Al par coordination avec une molécule d'eau (Penta_Al_H₂O). Bien que le complexe Penta_Al_H₂O soit plus stable que Penta_Al, il est toujours très défavorisé par rapport au complexe Hexa_Al_bras, avec une différence d'énergie libre d'environ 20 kcal/mol (Tableau 20).

Cette différence d'énergie considérable démontre l'importance du système chélateur pour la complexation du métal. Pour explorer davantage l'espace conformationnel complexe des systèmes chélateurs, nous avons également modélisé un complexe hexacoordonné supplémentaire dans lequel l'oxygène de la fonction amide coordonne directement Al (Hexa_Al_O=C). Il est intéressant de noter que ce dernier semble posséder une stabilité similaire à Hexa_Al_bras, avec une faible différence d'énergie libre de 5,51 kcal/mol. Par conséquent, et également en fonction de la barrière énergétique, les deux minima peuvent être peuplés. La stabilité du complexe hexacoordonné est également confirmée par le fait que même en incluant explicitement une molécule d'eau, nous n'avons pas observé d'échange de coordination avec le bras ou l'amide, au lieu de quoi la molécule de solvant explicite a développé une liaison hydrogène avec certains des oxygènes du carboxylate.

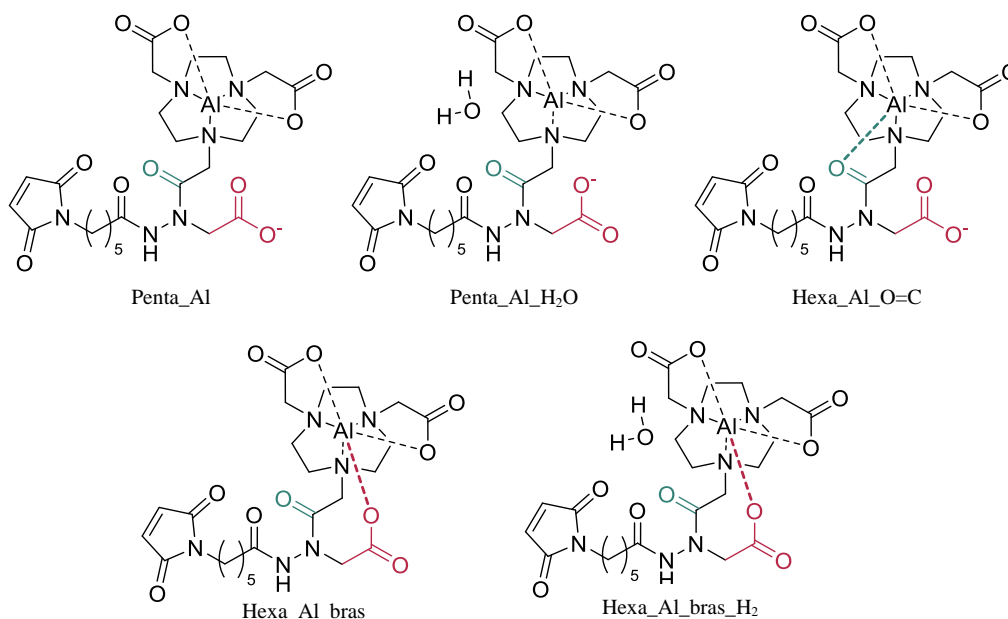


Figure 51 : Structures des complexes à l'aluminium étudiés par modélisation moléculaire

Tableau 20 : Énergie libre des complexes à l'aluminium étudiés

Complexe	Énergie libre (Ha)	ΔE par rapport à Hexa_Al_bras (kcal/mol)
Penta_Al	-2434,154	33,4239
Penta_Al_H ₂ O	-2434,175	20,2115
Hexa_Al_bras	-2434,208	0,0000
Hexa_Al_bras_H ₂ O	-2434,206	0,7539
Hexa_Al_O=C	-2434,199	5,5051

Ha : Hartree

Enfin, la commutation entre les conformations complexes a été étudiée (Figure 52). Une barrière énergétique significative de 26,11 kcal/mol a dû être franchie pour passer de la conformation Hexa_Al_O=C à Hexa_Al_bras. Ceci démontre que le passage entre ces deux conformations n'est pas spontané car une énergie minimale doit être donnée au système pour passer d'une conformation à l'autre.

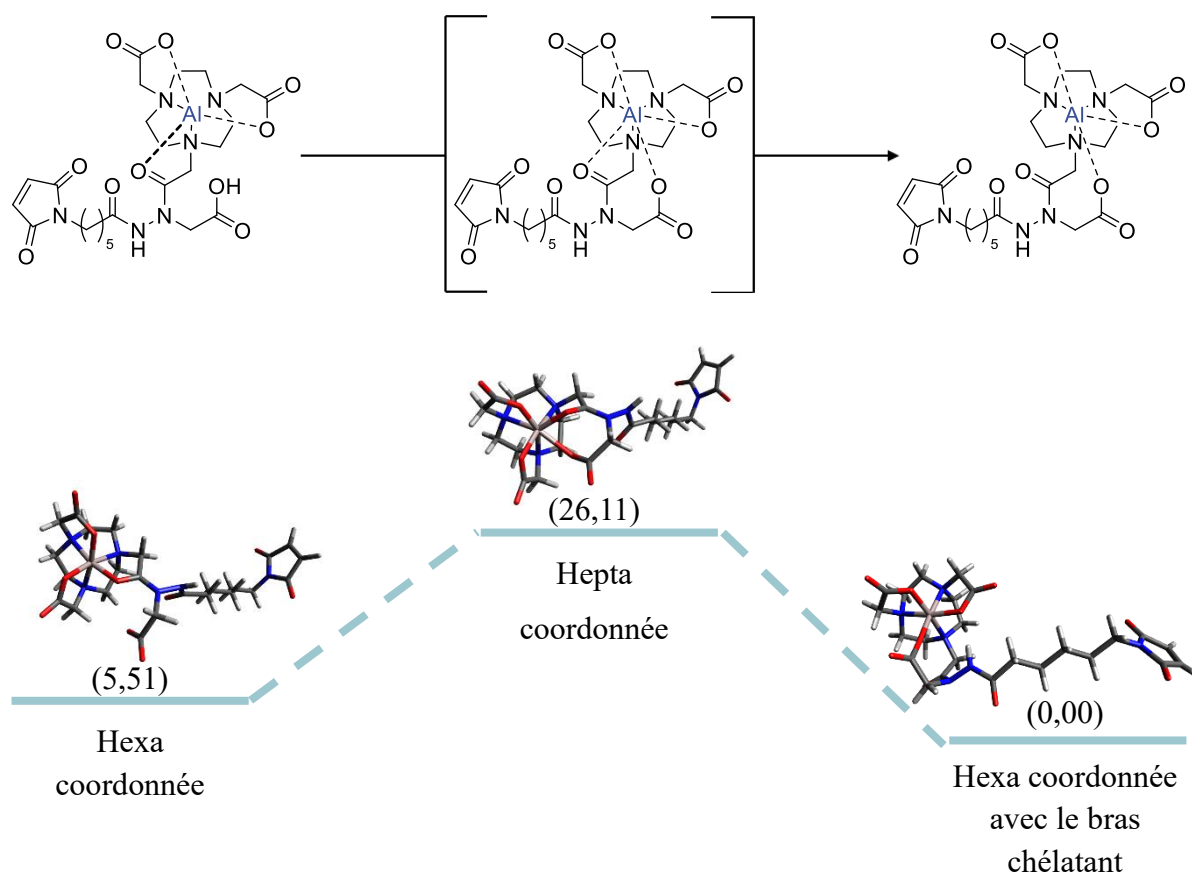


Figure 52 : Transition de la conformation Hexa_Al_O=C à la conformation Hexa_Al_bras. (énergie libre en kcal/mol).

3.1.2. Modélisation du complexe Ga-NO2A-AHM

La même étude a été menée pour le gallium à l'aide de la théorie de la fonctionnelle de la densité en utilisant la fonctionnelle B3LYP et la base 6-31G(d)* (Figure 53). Nous avons trouvé une différence d'énergie libre significative entre les complexes Hexa_Ga_bras et Penta_Ga (ΔG : 25,93 kcal/mol) en faveur de Hexa_Ga_bras. Bien que le complexe Penta_Ga_H₂O soit plus stable que Penta_Ga, il est toujours très défavorisé par rapport à Hexa_Ga_bras, avec une différence d'énergie libre de 19,29 kcal/mol. Cette différence d'énergie considérable démontre l'importance du bras chélateur supplémentaire pour la complexation du métal. Les complexes Hexa_Ga_O=C et Hexa_Ga_bras ont des énergies libres quasi identiques (ΔG : 2,37 kcal/mol). Par conséquent, en fonction de la barrière énergétique, les deux minima peuvent co-exister. La stabilité du complexe hexacoordonné est également confirmée par le fait que même en incluant explicitement une molécule d'eau, nous n'avons pas observé d'échange de coordination avec le bras ou l'amide, au lieu de quoi la molécule de solvant explicite a développé une liaison hydrogène avec certains des oxygènes du carboxylate. Inversement, la saturation de la sphère de coordination du gallium par un atome de fluor et la cage NOTA a donné lieu au complexe le plus favorable et a permis une stabilisation remarquable par rapport à l'Hexa_Ga_bras de 67,03 kcal/mol (Tableau 21).

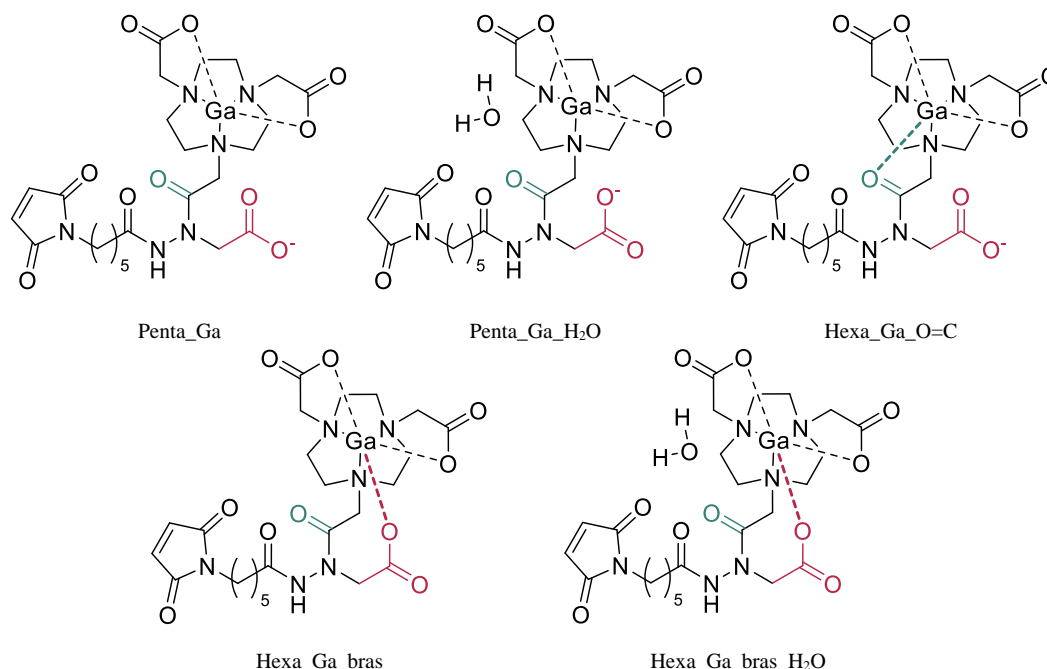


Figure 53 : Structures des complexes au gallium étudiés par modélisation moléculaire

Tableau 21 : Énergie libre des complexes de gallium étudiés

Complexe	Énergie libre (Ha)	ΔE par rapport à Hexa_Ga_bras (kcal/mol)
Penta_Ga	-4114,617	25,925
Penta_Ga_H ₂ O	-4114,628	19,286
Hexa_Ga_bras	-4114,658	0,000
Hexa_Ga_O=C	-4114,655	2,3682
Hexa_Ga_bras_H ₂ O	-4114,670	-7,4507

Ha : Hartree

De plus, une comparaison entre les géométries à l'équilibre des complexes Hexa_Ga_bras et Hexa_Ga_O=C peut être appréciée dans la Figure 54. Les deux complexes sont neutres et présentent une coordination octaédrique autour du gallium avec une sphère de coordination N₃O₃. En examinant les paramètres géométriques plus en détail, les distances de coordination moyennes Ga-N et Ga-O sont de 2,144 et 1,935 Å pour Hexa_Ga_bras et de 2,097 et 1,944 Å pour Hexa_Ga_O=C, respectivement (Annexe 2). Ces distances sont relativement courtes et montrent une bonne stabilité de la coordination entre le gallium et le chélateur.

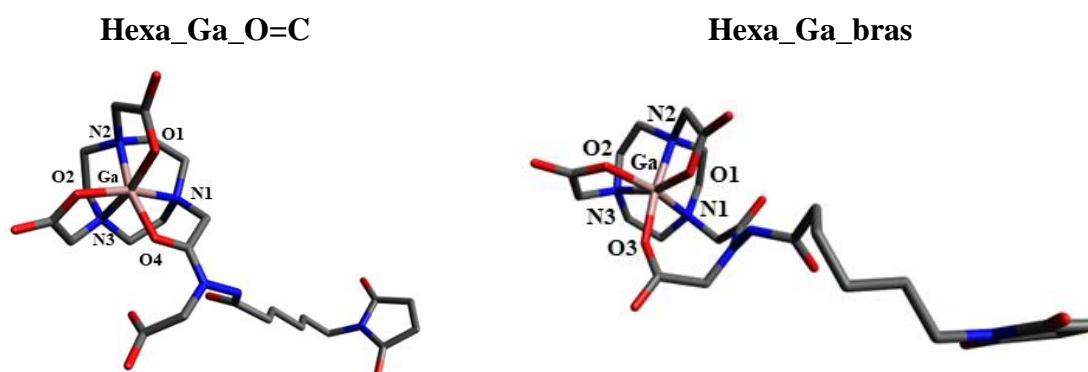


Figure 54 : Géométries optimisées des complexes Hexa_Ga_O=C et Hexa_Ga_bras (les hydrogènes ont été supprimés pour plus de lisibilité)

Pour les deux structures, un octaèdre légèrement déformé a été observé car les 12 angles orthogonaux et les 3 angles linéaires sont proches des valeurs idéales de 90° et 180°, respectivement. Les angles orthogonaux sont en moyenne de 90,223° pour Hexa_Ga_bras et 90,191° pour Hexa_Ga_O=C, tandis que les angles linéaires sont centrés à 164,884° et 166,841°, respectivement. Les deux conformations présentent une très forte similitude. La moyenne de la différence entre les angles orthogonaux idéaux (90°C) et les angles orthogonaux est de 6,769° et 6,250°, respectivement, et la différence moyenne entre les angles linéaires idéaux (180°) et les angles linéaires est de 15,116° et 13,159°, respectivement. Le complexe Ga-NOTA a été modélisé par Wang *et al.* et montre que le gallium est hexacoordonné donnant

au complexe une géométrie octaédrique distordue avec des valeurs d'angles similaires aux nôtres.^[233]

Concernant l'isomérisation *Z/E* des liens hydrazides présents sur le composé, nous constatons une isomérisation *Z* pour les liens $C(O)_{\text{espaceur}}-N^{\alpha}-N^{\beta}$ et $C(O)_{\text{maléimide}}-N^{\beta}-N^{\alpha}$ dans la géométrie Hexa_Ga_bras tandis qu'une isomérisation *E* pour le lien $C(O)_{\text{espaceur}}-N^{\alpha}-N^{\beta}$ et une isomérisation *Z* pour le lien $C(O)_{\text{maléimide}}-N^{\beta}-N^{\alpha}$ dans la géométrie Hexa_Ga_O=C sont observées. Nous apercevons donc la présence d'une isomérisation *E* bien plus contrainte que l'isomérisation *Z* dans le cas où le bras chélatant est impliqué dans la complexation du gallium (Figure 55).

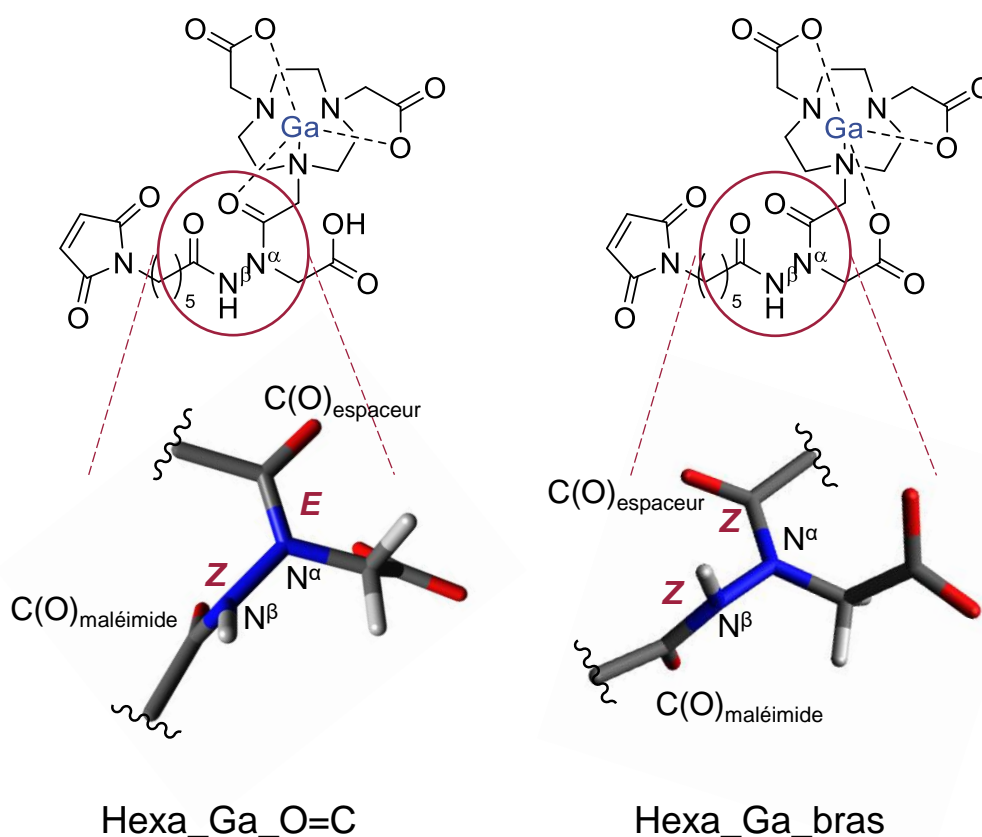


Figure 55 : Comparaison des isomérisations *Z/E* des hydrazides dans les configurations Hexa_Ga_bras et Hexa_Ga_O=C

Nous avons ensuite étudié la voie d'interconversion possible pour passer de Hexa_Ga_bras à Hexa_Ga_O=C. Une barrière énergétique 20,39 kcal/mol doit être franchie, par l'intermédiaire d'un état de transition heptacoordonné, pour passer d'une conformation à l'autre (Figure 56). Cette barrière énergétique n'est pas trop importante et peut facilement être dépassée créant donc un équilibre et une interconversion facile entre les deux conformations qui co-existent.

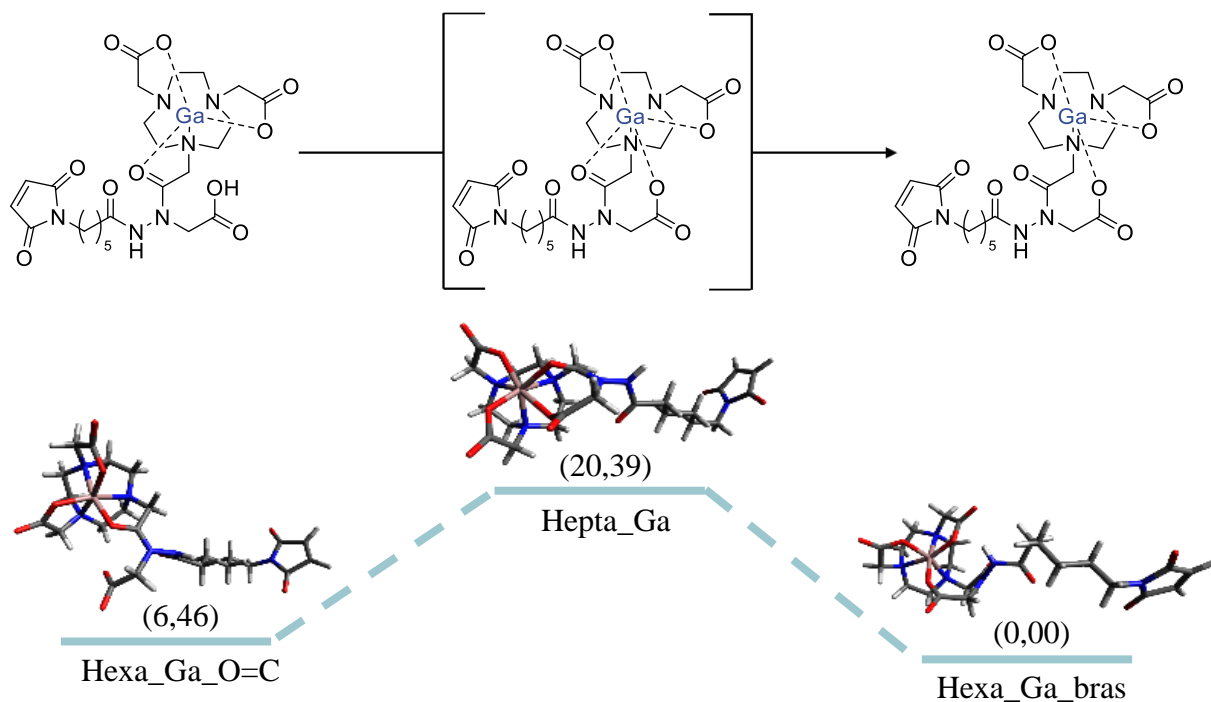


Figure 56 : Transition de la conformation Hexa_Ga_O=C à la conformation Hexa_Ga_bras (énergie libre en kcal/mol)

3.1.3. Modélisation du complexe Lu-NO₂A-AHM

L'étude de modélisation a été étendue au complexe **Lu-NO₂A-AHM** à l'aide de la théorie de la fonctionnelle de la densité en utilisant la fonctionnelle B3LYP et la base def2-TZVP+SDD. Comme le lutécium est capable de former un complexe avec un chélateur *via* 6 à 9 liaisons de coordination, deux complexes hexacoordonnés et un heptacoordonné (Hexa_Lu_O=C, Hexa_Lu_bras et Hepta_Lu, respectivement) ont été modélisés pour déterminer la conformation la plus stable. La structure heptacoordonnée est la plus stable par rapport aux structures hexacoordonnées. La différence d'énergie entre les complexes Hexa_Lu_O=C, Hexa_Lu_bras est significative (ΔG : 9,33 kcal/mol) et démontre l'importance du bras chélateur supplémentaire pour la complexation du métal. Le complexe heptacoordonné Hexa_Lu a une énergie similaire à Hexa_Lu_bras (ΔG : 1,31 kcal/mol) (Figure 57).

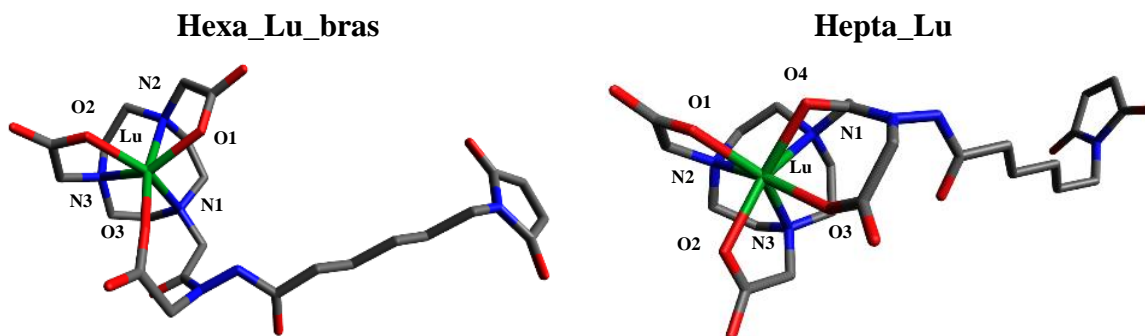


Figure 57 : Géométries optimisées des complexes Hexa_Lu_bras et Hepta_Lu (les hydrogènes ont été supprimés pour plus de lisibilité).

En examinant les géométries des complexes Hexa_Lu_bras et Hepta_Lu, une analyse structurale a été faite pour la comparaison avec le complexe d'aluminium. La structure hexacoordonnée présente une géométrie octaédrique avec le lutécium comme atome central complexé par un ensemble de donneurs N_3O_3 (complexation avec les trois azotes du cycle NOTA, les deux oxygènes du carboxylate des chaînes latérales alkyles et l'oxygène du bras chélateur). Les longueurs moyennes des liaisons de coordination Lu-N et Lu-O sont respectivement de 2,527 et 2,148 Å et sont plus longues que les longueurs des liaisons de coordination Al-N et Al-O en raison du rayon atomique plus grand du lutécium (différence entre la longueur de la liaison Lu-N et Al-N de 0,397 Å et différence entre la longueur de la liaison Lu-O et Al-O de 0,295 Å). Ces longueurs de liaisons démontrent la force de la coordination du lutécium avec le chélateur. Un octaèdre déformé a été observé car les 12 angles orthogonaux et les 3 angles linéaires sont proches des valeurs d'angle idéales de 90° et 180° respectivement. La moyenne des angles orthogonaux est de 89,476° et la moyenne des angles linéaires est de 150,783°. La moyenne de la différence entre les angles orthogonaux idéaux (90°) et les angles orthogonaux est de 15,318° et la différence moyenne entre les angles linéaires idéaux (180°) et les angles linéaires est de 29,217°. Ainsi, la géométrie Hexa_Lu est plus déformée que la géométrie Hexa_Al_F et pourrait être expliquée par une déformation annulaire plus importante. La structure heptacoordonnée présente une géométrie bipyramidale pentagonale distordue avec le lutécium comme atome central complexé par un ensemble de donneurs N_3O_4 . (complexation avec les trois azotes du cycle NOTA, les deux oxygènes du carboxylate des chaînes latérales alkyles, l'oxygène du bras chélateur et l'oxygène du carbonyle). Les longueurs moyennes des liaisons de coordination Lu-N et Lu-O₃ de la structure Hepta_Lu sont proches des longueurs des liaisons Lu-N et Lu-O₃ de la structure Hexa_Lu_bras (longueur Lu-N de 2,543 Å et 2,527 Å, respectivement, et Lu-acide carboxylique de 2,192 Å et 2,148 Å, respectivement). La longueur de la liaison de coordination Lu-O₄ est plus longue que

celle des liaisons Lu-acide carboxylique (2,337 Å). Cette longueur de liaisons démontre l'implication la plus faible du groupe carbonyle comme donneur par rapport à l'oxygène de l'acide carboxylique. Néanmoins, ce groupe carbonyle a permis d'augmenter la stabilité du complexe car l'énergie libre du complexe Hepta_Lu est inférieure à celle de Hexa_Lu_bras (ΔG : 1,31 kcal/mol) (Annexe 3).

Comme vu dans la Figure 55, l'observation des deux fonctions hydrazide montre une isomérisation *Z* pour le lien $C(O)_{\text{espaceur}}-N^{\alpha}-N^{\beta}$ et une isomérisation *E* pour le lien $C(O)_{\text{maléimide}}-N^{\beta}-N^{\alpha}$ dans les géométries Hexa_Lu et Hepta_Lu. Nous apercevons donc la présence d'une isomérisation *E* bien plus contrainte que l'isomérisation *Z* dans les deux géométries où le bras chélatant est impliqué dans la complexation du lutécium.

3.2. Modélisation moléculaire des complexes avec cations divalents

3.2.1. Modélisation du complexe AlF-NO2A-AHM

Une comparaison entre les géométries à l'équilibre des complexes Hexa_Al_bras et Hexa_Al_F peut être appréciée dans la Figure 58. Les deux complexes sont neutres et présentent une coordination octaédrique autour de l'aluminium avec une première sphère de coordination N_3O_2F pour Hexa_Al_F et N_3O_3 pour Hexa_Al_bras. L'aluminium est situé au centre de l'anneau chélateur et est coordonné par les trois azotes du cycle NOTA, les deux oxygènes du carboxylate des chaînes latérales alkyles et le fluor. La géométrie est en corrélation avec le calcul DFT décrit par Wang *et al.*^[236] La saturation de la sphère de coordination de l'aluminium avec le fluor a donné lieu au complexe le plus favorable et a permis une stabilisation remarquable par rapport au complexe Hexa_Al_bras de 67,38 kcal/mol (Tableau 22).

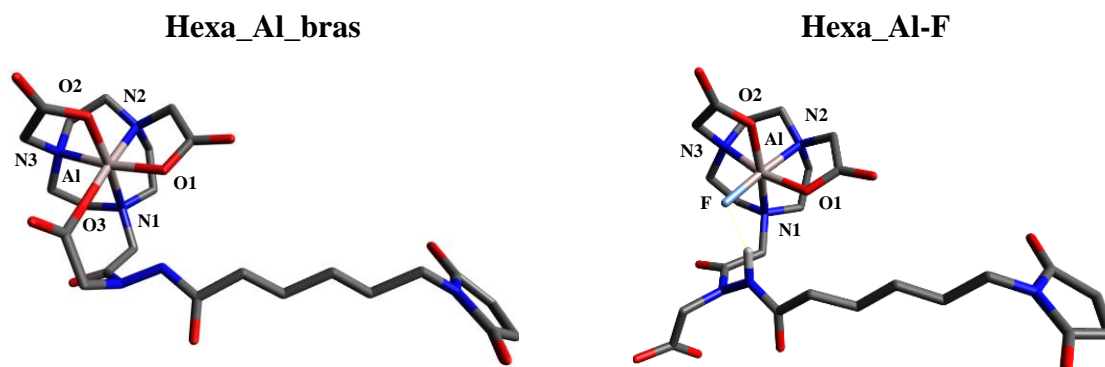


Figure 58 : Géométries optimisées des complexes Hexa_Al_bras et Hexa_Al_F (les hydrogènes ont été supprimés pour plus de lisibilité)

Tableau 22 : Comparaison de l'énergie libre du complexe d'aluminium-fluor aux complexes d'aluminium

Complexe	Énergie libre (Ha)	ΔE par rapport à Hexa_Al_F (kcal/mol)
Penta_Al	-2434,154	100,810
Hexa_Al_bras	-2434,208	67,386
Hexa_Al_O=C	-2434,199	72,891
Hexa_Al_F	-2434,315	0,000

Ha : Hartree

En examinant les paramètres géométriques plus en détail, les distances de coordination moyennes Al-N et Al-O sont de 2,130 et 1,853 Å, respectivement, et elles se comportent de manière similaire pour les deux complexes (Annexe 4). Les longueurs de liaisons relativement courtes corroborent davantage la stabilité de la coordination entre Al et le chélateur. En effet, même la présence de fluor ne déforme pas significativement l'environnement de coordination. Cependant, la liaison Al-F dans le complexe Hexa_Al_F est significativement plus courte (1,733 Å) que les autres liaisons Al-N et Al-O, comme prévu à cause de la haute affinité du fluor pour l'aluminium. De plus la liaison Al-F possède une forte énergie de stabilisation (580 – 670 kJ/mol)^[89]. Pour les deux structures, un octaèdre légèrement déformé a été observé car les 12 angles orthogonaux et les 3 angles linéaires étaient proches des valeurs idéales de 90° et 180°, respectivement. Les angles orthogonaux sont en moyenne de 89,809° pour Hexa_Al_bras et 89,843° pour Hexa_Al_F, tandis que les angles linéaires sont centrés à 168,330° et 168,015°, respectivement. Malgré la grande similitude entre les deux structures, la géométrie de Hexa_Al_F apparaît légèrement plus déformée que celle de Hexa_Al_bras. La moyenne de la différence entre les angles orthogonaux idéaux (90°C) et les angles orthogonaux est de 5,741° et 5,482°, respectivement, et la différence moyenne entre les angles linéaires idéaux (180°) et les angles linéaires est de 11,984° et 11,670°, respectivement. Un arrangement octaédrique déformé similaire a été observé dans les structures cristallographiques de AlF-NODA présentant des angles orthogonaux et linéaires d'une moyenne de 89,89° et 169,60°, respectivement.^[89]

Comme vu dans la Figure 55, l'observation des deux fonctions hydrazide montre une isométrie *E* pour le lien C(O)_{espaceur}-N^α-N^β et une isométrie *Z* pour le lien C(O)_{maléimide}-N^β-N^α dans les géométries Hexa_Al_bras et Hexa_Al_F. Nous apercevons donc la présence d'une isométrie *E* bien plus contrainte que l'isométrie *Z* dans les deux géométries. Dans le cas de la géométrie Hexa_Al_F, nous pouvons supposer que la présence de l'isométrie *E* pour le lien C(O)_{espaceur}-

N^{α} - N^{β} est favorisée par la diminution de la répulsion électronique de l'atome de fluor par rapport à l'isométrie Z.

3.2.2. Modélisation du complexe Cu-NO₂A-AHM

Étant donné que la complexation du cuivre s'est avérée fructueuse et que le couple cuivre 64/cuivre 67 est un couple théranostic très intéressant pour le diagnostic et le traitement de cancers, nous avons entrepris une étude de modélisation du complexe **Cu-NO₂A-AHM** à l'aide de la théorie de la fonctionnelle de la densité en utilisant la fonctionnelle B3LYP et la base 6-31G(d)*, pour compléter l'étude de modélisation moléculaire (Figure 59).

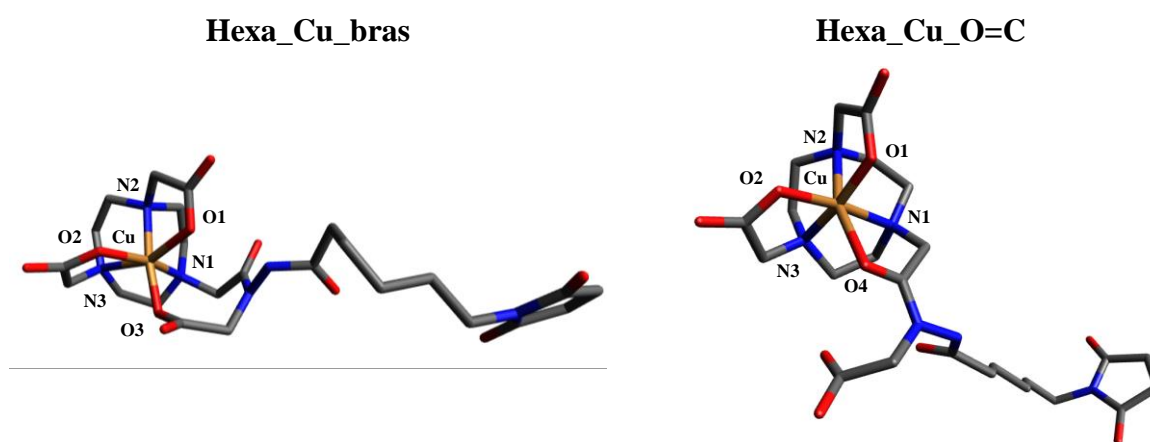


Figure 59 : Géométries optimisées des complexes Hexa_Cu_bras et Hexa_Cu_O=C (les hydrogènes ont été supprimés pour plus de lisibilité)

Le cuivre peut former de 4 à 6 liaisons de coordination avec un ligand. Les complexes Hexa_Cu_bras et Hexa_Cu_O=C ont été modélisés pour déterminer la conformation la plus stable. Ici, deux structures hexacoordonnées présentant une géométrie octaédrique sont observées. L'atome central de cuivre est complexé par un ensemble de donneurs N_3O_3 . La différence d'énergie entre Hexa_Cu_O=C, Hexa_Cu_bras est de 7,734 kcal/mol avec une structure légèrement plus stable lorsque le cuivre est complexé par le carbonyle. Concernant les paramètres géométriques des deux structures, les longueurs de liaisons Cu-N observées sont très similaires à celles des structures Hexa_Ga_bras et Hexa_Ga_O=C, respectivement. Cependant, les liaisons Cu-O sont en moyenne plus longues que celles de Ga-O car les longueurs des liaisons Cu-O₁ (2,227 Å) pour Hexa_Cu_bras et Cu-O₃ (2,299 Å) pour Hexa_Cu_O=C sont plus longues que la moyenne. Une géométrie plus distordue est observée pour Hexa_Cu_bras par rapport à Hexa_Cu_O=C et les structures au gallium (moyenne des angles orthogonaux : 90,190° et écart à la moyenne de 16,464°, moyenne des angles linéaires : 163,536° et écart à la moyenne de 7,320°). Cependant, Hexa_Cu_O=C est bien moins distordu

que ces derniers (moyenne des angles orthogonaux : $90,161^\circ$ et écart à la moyenne de $11,331^\circ$, moyenne des angles linéaires : $168,699^\circ$ et écart à la moyenne de $5,15^\circ$) (Annexe 5). Les moyennes et écarts des angles sont similaires à la structure Hexa_Al_F. Concernant l'isomérisie *Z/E* des liens hydrazide présents sur le composé, nous constatons des configurations identiques à celles des complexes au gallium présenté Figure 55.

3.3. Étude de la défluoration du complexe AlF-NO₂A-AHM par modélisation moléculaire

Afin de tester la stabilité de AlF-NO₂A-AHM, la défluoration a été modélisée en utilisant des coordonnées de balayage pour éloigner progressivement le fluor de l'aluminium dans la géométrie Hexa_Al_F (Figure 60).

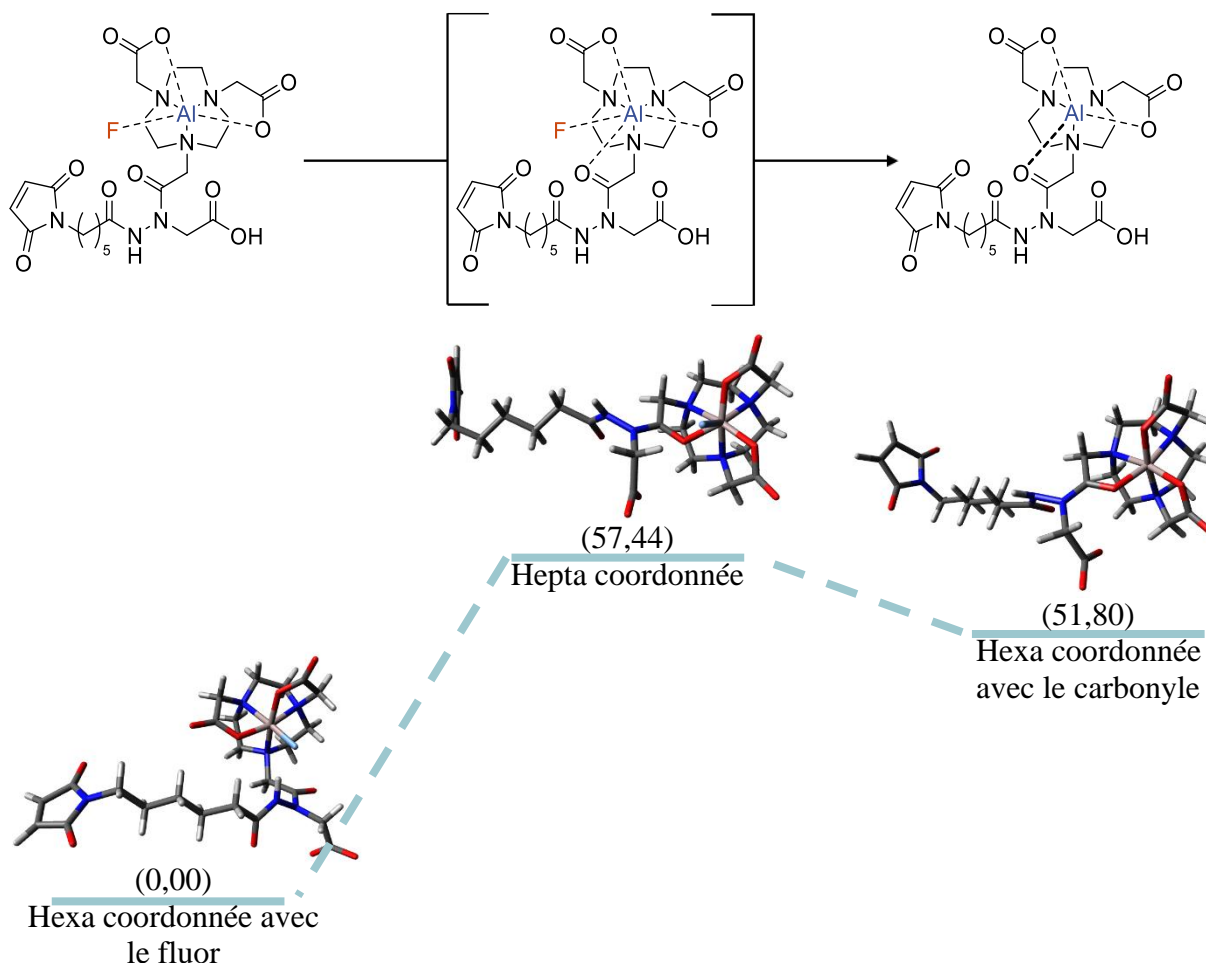


Figure 60 : Évaluation de la réaction de défluoration de AlF-NO₂A-AHM en Al-NO₂A-AHM (énergie libre en kcal/mol)

Une barrière énergétique élevée de 57,43 kcal/mol a dû être franchie pour rompre la liaison entre l'aluminium et le fluor, confirmant la force du complexe aluminium-fluor et la robustesse

de la liaison aluminium-fluor. La défluoruration a conduit à la formation de la conformation Hexa_{Al}O=C où l'oxygène de la fonction carbonyle forme une liaison de coordination avec l'aluminium. Cette géométrie Hexa_{Al}O=C a une énergie libre plus élevée que Hexa_{Al}F (ΔG : 51,80 kcal/mol). Cela démontre que le complexe aluminium-fluor est la structure favorisée car elle possède l'énergie libre la plus faible.

4. Conclusion du chapitre

Des études de complexation de l'ACB **NO2A-AHM** ont été menées sur les trois éléments d'intérêt : gallium, aluminium-fluor et lutécium. La formation des complexes **Al^{nat}F-NO2A-AHM** et **^{nat}Lu-NO2A-AHM** a été réalisée avec succès et l'impact de la température de marquage et du taux d'EtOH sur le TC a été évaluée afin de trouver les conditions optimales de marquage. Ainsi, des TC de >99% et 98% ont été obtenus respectivement. Des études de stabilité ont montré une forte stabilité du complexe **Al^{nat}F-NO2A-AHM** et d'une stabilité correcte pour le complexe **^{nat}Lu-NO2A-AHM**. Les études de marquage au gallium ont démontré que notre ACB n'est pas adapté pour la complexation au gallium puisqu'on observe une hydrolyse de l'ACB après mise en contact avec du gallium. Une étude approfondie nous a permis de mettre en évidence que les cations trivalents (Al^{3+} , Ga^{3+} , Fe^{3+}) induisent l'hydrolyse du composé tandis que les cations divalents ($\{AlF\}^{2+}$, Cu^{2+}) ne l'induisent pas. De plus, le site exact de la coupure entre l'hydrazine et la cage NOTA a été déterminé par HPLC-MS et RMN et une proposition de mécanisme a été donnée. En parallèle de ces études de complexation, des études de modélisation moléculaire ont été conduites afin de déterminer la géométrie des complexes ainsi que de mettre en évidence les atomes donneurs présents sur l'ACB. Ces études ont montré l'importance du bras chélatant supplémentaire de notre ACB hybride dans la complexation des cations bivalents (Cu^{2+}) et des cations trivalents (Ga^{3+} , Lu^{3+}) en produisant des complexes stables. La recherche des conformations les plus stables a montré qu'un autre atome était capable de participer à la formation de géométries stables, à savoir l'oxygène de la fonction carbonyle du bras entre l'hydrazine et le NOTA, permettant la cohabitation de deux géométries distinctes. Concernant le complexe à l'aluminium-fluor, des études complémentaires de défluoruration ont été menées et confirment la stabilité du complexe **AlF-NO2A-AHM** puisque la défluoruration est très défavorable. Ces études de modélisation et de complexation nous permettent d'envisager l'utilisation de l'ACB avec d'autres radionucléides tel que le couple apparié cuivre-64/67 utilisable en théranostic.

CHAPITRE 4 : SYNTHÈSE
DES AGENTS DE CIBLAGE
MODIFIÉS, COUPLAGE AU
NOUVEL ACB ET
SYNTHÈSE DES
RÉFÉRENCES NON-
RADIOACTIVES

1. Choix des agents de ciblage

Les progrès en biologie moléculaire ont permis la découverte de protéines membranaires (récepteurs membranaires) spécifiques surexprimées au niveau des zones cancéreuses. La découverte de ligands naturels et le design d'agents de ciblage capables de reconnaître spécifiquement ces protéines membranaires sont devenus des enjeux primordiaux dans la quête de proposer des traitements ciblés et adaptés à chaque type de cancer (médecine personnalisée). Ces agents de ciblage sont souvent des biomolécules pouvant être de trois natures différentes : des petites molécules (*i.e.*, des vitamines, des sucres), des peptides ou des anticorps. Les peptides et les anticorps (*i.e.*, agents de ciblage peptidiques) sont issus des biotechnologies et possèdent de grandes affinités envers les protéines membranaires à cibler. Ces agents de ciblage de nature peptidique ont l'avantage de pouvoir être facilement couplés à d'autres molécules telles que des agents chélatants ou des fluorophores grâce (i) aux chaînes latérales de certains acides aminés possédant un groupement fonctionnalisable, ou (ii) à l'extrémité *N*-terminale de la chaîne peptidique par SPPS.

Le développement de radiotraceurs incluant des agents de ciblage spécifiques dans leurs structures chimiques est donc primordial pour offrir aux patients un diagnostic par imagerie nucléaire et une thérapie des plus sélectifs vis-à-vis de la pathologie considérée (*i.e.*, le choix de l'agent de ciblage dépendra de la pathologie visée).

Cependant, les peptides peuvent avoir des stabilités plus faibles dans l'organisme par rapport aux petites molécules de ciblage ou aux anticorps du fait de leur dégradation par les protéases présentes naturellement dans notre organisme. Ils peuvent être radiomarqués par des radionucléides utilisés en thérapie comme le lutécium-177 ou l'actinium-225 possédant des $t_{1/2}$ longs (6,7 et 10 jours, respectivement). Plusieurs stratégies ont ainsi été mises en place afin de contourner ce problème de dégradation et d'offrir une meilleure stabilité vis-à-vis des protéases et peptidases et, de ce fait, induire de meilleures propriétés pharmacocinétiques aux radiotraceurs :

- Utilisation de pseudopeptides (*e.g.*, azapeptide, oligourée, β - ou γ -peptides^[237]^[238])
- Ajout d'un groupement protecteur aux extrémités *C*- ou *N*- terminales ou *N*-méthylation^[237,239]
- La cyclisation des peptides (*e.g.*, c(RGD)^[75])
- Remplacement d'un acide aminé (AA) naturel par son homologue de la série D^[239]
- Dimérisation (*e.g.*, NODAGA-c(RGDyK)₂)^[240]

- Conjugaison à un groupement PEG^[135]
- Séquence rétro-inverso (acides aminés de la série D et synthèse de l'extrémité C-terminale vers N-terminale)^[241]
- Conjugaison à une entité liant l'albumine (acide 4-(*p*-iodophényl)butyrique)^[242] ou à un sucre.^[243]

Ces modifications sont utilisées dans la conception de traceurs (Tableau 23).^[244]

Tableau 23 : Quelques exemples de radiotraceurs proposant des modifications permettant une amélioration de leur stabilité et/ou de leur pharmacocinétique^[244]

Modification	Composé	Radionucléide	Réf.
β -peptide	DOTA- β hGly-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile- β^3 hLeu-OH	⁶⁸ Ga	[239]
N-term protection, D-AA, N $^\alpha$ -méthylation	DOTA-MGS5 (DOTA-D-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-(N-Me)Nle-Asp-1-Nal-NH ₂)	⁶⁸ Ga, ¹¹¹ In, ¹⁷⁷ Lu	[240]
Cyclisation et conjugaison à un sucre	F-C-glyco-c(RGDyK)	¹⁸ F	[75]
Cyclisation et conjugaison à un sucre	Fluoropropionate-c(RGDfK)-SAA	¹⁸ F	[243]
PEGylation	Fluorobenzoyl-PEG-c(RGDyK)	¹⁸ F	[245]
Cyclisation, PEGylation et dimérisation	NOTA-PEG ₃ -E[c(RGDyK)] ₂	⁶⁸ Ga	[240]
Entité de fixation à l'albumine et PEGylation	NOTA-K(AB)-PEG-NAVPNLRGDLQVLAQRVART-PEG-NH ₂	Al ¹⁸ F	[246]

Nle-Asp-1-Nal : Norleucine-acide aspartique-1-naphtyl-L-alanine, SAA : Sugar amino acid

Notre choix concernant les agents de ciblage s'est porté sur les trois composés suivants ayant un intérêt clinique :

- Le premier concerne **la séquence peptidique RGD** (Figure 61), capable de reconnaître spécifiquement les intégrines $\alpha_v\beta_3$ impliquées dans l'angiogenèse et permettant le ciblage des néovaisseaux de nombreux types de cancers tel que le glioblastome. Notre équipe de recherche a auparavant travaillé sur le RGD et plus particulièrement sur la synthèse d'un agent de ciblage, c(RGDfC), possédant le motif RGD. De même, notre équipe a également marqué un radiotracer comportant le motif RGD, le NODAGA-RGD, au gallium-68.^[86]
- Le second est basé sur le **motif de reconnaissance DUPA** (acide 2-[3-(1,3)-dicarboxylpropyl)ureido]pentanedioïque) capable de se fixer au récepteur PSMA surexprimé à la surface des cellules cancéreuses de la prostate (Figure 61). Notre choix se porte sur l'utilisation de la séquence KuE (lysine-urée-acide glutamique) présentant

le motif DUPA et pouvant être modifiée au niveau de l' ϵ NH₂ de la lysine. Ce type de cancer, très fréquent chez l'homme, est intensément étudié. Ainsi, les modèles cellulaires sont facilement disponibles pour l'évaluation *in vitro* de l'affinité de ce motif vis-à-vis des cellules cancéreuses de la prostate. Le motif DUPA est composé de deux résidus lysine et acide glutamique liés entre eux *via* leurs extrémités *N*-terminales par un lien urée.

- Le dernier agent de ciblage, non peptidique, est **l'acide folique (AF)** (Figure 61), également très étudié au sein de notre équipe de recherche et qui permet la reconnaissance spécifique des cellules cancéreuses surexprimant le RFA permettant, notamment, la détection du cancer de l'ovaire.^[247–253]

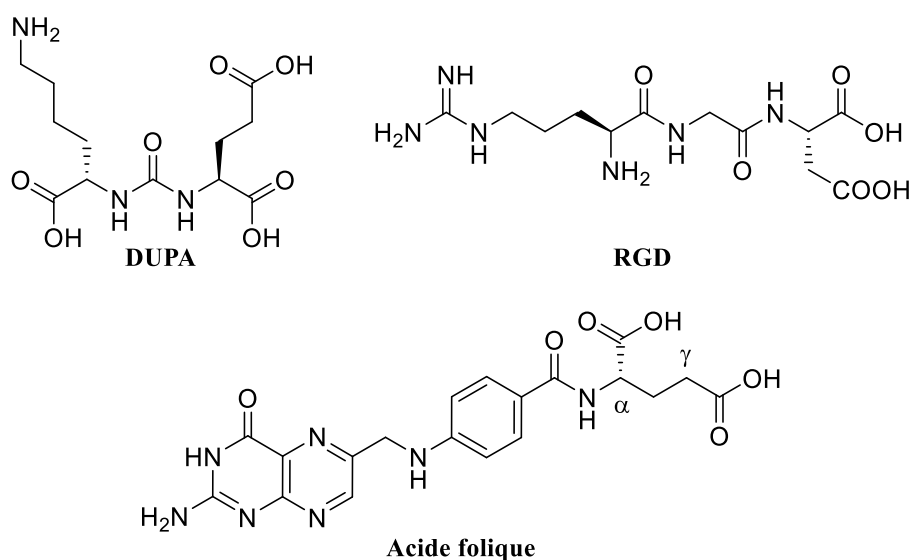


Figure 61 : Structures chimiques des motifs de reconnaissance DUPA, RGD et AF

2. Modification des agents de ciblage

2.1. Stratégie mise en place

Afin de pouvoir coupler les trois agents de ciblage d'intérêts à notre ACB de manière sélective par réaction de CCTM (*i.e.*, correspondant à une réaction entre une fonction thiol sur l'agent de ciblage et un groupement maléimide), une fonction thiol peut être facilement fixée sur un peptide puisque l'acide aminé cystéine (Cys) possède une fonction thiol sur sa chaîne latérale et peut être ajoutée sur les extrémités *N*- (*i.e.*, Cys-AA_n-résine) ou *C*-terminale (*i.e.*, AA_n-Cys-résine) du peptide en SPPS.

Des solutions alternatives sont également décrites pour incorporer une fonction thiol sur une amine primaire d'une biomolécule comme l'utilisation du réactif de Traut (2-iminothiolane) en pH légèrement basique (pH 7-9)^[254] (Schéma 33) ou grâce au couplage sur une amine primaire du composé SATA (S-acétylthioacétate de succinimidyl) suivi de la déprotection de la fonction thiol protégée par un acétyle en présence d'hydroxylamine^[255] (Schéma 34).

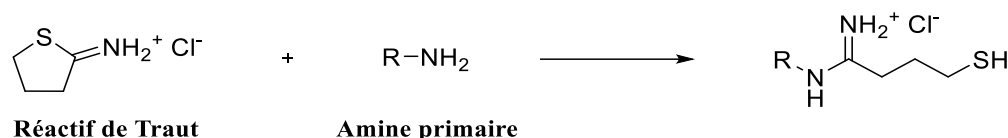


Schéma 33 : Réaction de Traut

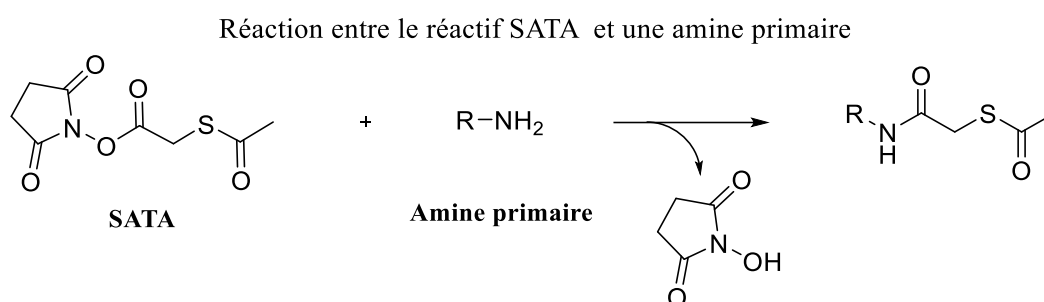


Schéma 34 : Fixation d'un groupement sulfhydryle à l'aide du réactif SATA en deux étapes

Afin de pouvoir évaluer les propriétés biologiques des radiotraceurs avec des tests *in vitro* (détermination de la constante d'affinité, tests d'internalisation cellulaire et de viabilité cellulaire...), la solution la plus aisée est d'incorporer un fluorophore sur la molécule d'intérêt. Il existe de nombreux fluorophores (fluorescéine, cyanine, rhodamine X, gamme Alexa fluor, rose de Bengale, porphyrine) qui peuvent être choisis en fonction de leurs propriétés photophysiques ainsi que d'autres caractéristiques telle que la nature de la molécule sur laquelle sera incorporé le fluorophore (petite molécule, protéine, ADN). Notre équipe travaillant dans le domaine des peptides, la stratégie la plus simple consiste en l'ajout d'un acide aminé fluorescent (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) sur la séquence peptidique de ciblage. Le tryptophane est l'acide aminé le plus fluorescent comparé à la phénylalanine et la tyrosine.

Ainsi, les radiotraceurs pourront être facilement mis en évidence après irradiation à la longueur d'onde d'excitation correspondante, grâce à la visualisation de la fluorescence émise.

Dans le cas du **motif de reconnaissance DUPA**, nous nous sommes inspirés de la structure chimique du PSMA-617^[163,256] ainsi que du PSMA-11 qui sont deux précurseurs de marquage utilisés pour le diagnostic et le traitement du cancer de la prostate (Figure 62).^[257] Ces 2 composés présentent le motif de reconnaissance DUPA (en bleu) et des groupements fluorescents (en rouge). Pour le PSMA-617, c'est le naphtalène qui est utilisé comme fluorophore alors que pour le PSMA-11, c'est le chélatant acyclique HBED-CC lui-même qui joue ce rôle par le biais de ces deux groupements phényles.

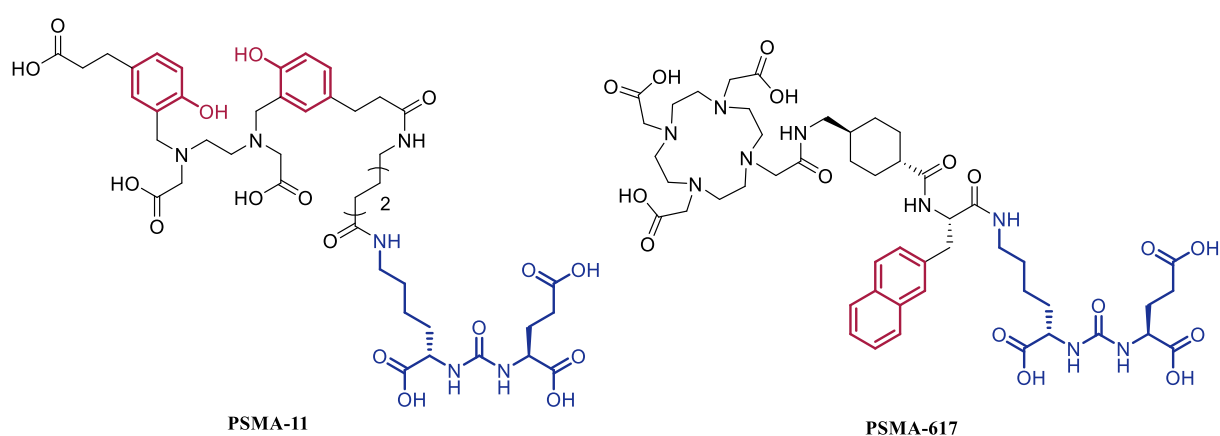


Figure 62 : Structures chimiques du PSMA-617 et du PSMA-11

Notre choix d'agent de ciblage **20 (CWKuE)** est constitué du motif DUPA couplé à un résidu tryptophane (fluorophore) ainsi qu'à un résidu cystéine pour le couplage par réaction CCTM avec **NO2A-AHM**. Les résidus tryptophane et cystéine ont été additionnées sur le groupement ϵNH_2 de la lysine du motif DUPA puisque ce dernier n'est pas impliqué dans le motif de reconnaissance et peut être facilement fonctionnalisé par couplage peptidique (Figure 63).

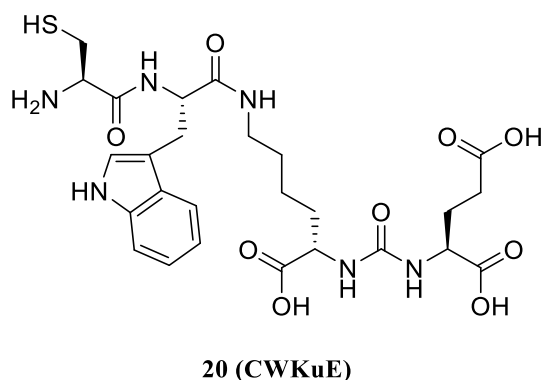


Figure 63 : Structure chimique de notre agent de ciblage **20 (CWKuE)** pour les récepteurs PSMA contenant le motif DUPA.

Dans le cas du **motif de reconnaissance RGD**, notre choix s'est porté sur l'utilisation du RGD cyclique de type **c(RGDfC)** qui est intensément décrit dans la littérature et qui est déjà utilisé en tant qu'agent de ciblage dans des radiotraceurs tels que [¹⁸F]fluoro-C-glyco-c(RGDfC) et [¹⁸F]FDR-c(RGDfC).^[75,258,259] La forme cyclique du peptide RGD possède une meilleure stabilité *in vivo* due à une dégradation plus lente par les protéases ainsi qu'une meilleure affinité pour les intégrines $\alpha_v\beta_3$.^[75] Il existe deux RGD cycliques principalement utilisés, le c(RGDfC) et le c(RGDyK), comportant tous deux un résidu fluorescent (phénylalanine et tyrosine) et un acide aminé cystéine ou lysine afin de le fixer à un agent chélatant soit par formation d'un lien amide ou thiourée pour la lysine soit par réaction CCTM pour la cystéine (Figure 64). Dans la littérature, nous trouvons plus de radiotraceurs utilisant le motif c(RGDyK) que c(RGDfC). Cependant, voulant utiliser une stratégie de bioconjugaison de l'agent de ciblage à l'ACB par réaction CCTM, notre choix s'est porté sur le **c(RGDfC)** comportant une fonction thiol.

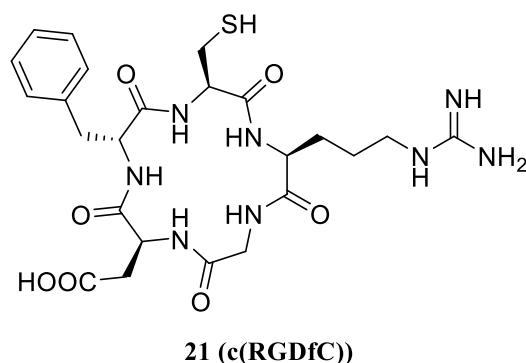


Figure 64 : Structure chimique de **21 (c(RGDfC))** ciblant les intégrines $\alpha_v\beta_3$

L'**AF** est un agent de ciblage de grand intérêt puisqu'il reconnaît spécifiquement les RFA permettant la détection des nombreux types de cancers (ovarien, endométrique, poumon non à petites cellules...). Dans le cadre de cette thèse, une revue de la littérature a été réalisée et publiée dans le journal *Coordination Chemistry Reviews* (IF = 24,833) afin de faire un état de l'art sur tous les radiotraceurs développés à base de folate en démontrant l'intérêt clinique de ce type de radiotraceur pour des applications en diagnostic et en thérapie.^[251]

L'**AF** étant une biomolécule très hydrophobe, nous avons décidé de synthétiser deux agents de ciblage pouvant être couplés à notre ACB. Le premier, **22**, est l'**AF** couplé à un résidu cystéine et le second, **23**, est l'**AF** modifié par une chaîne PEG (O2Oc-O2Oc), deux unités éthylène glycol reliées par une fonction amide) et d'un résidu cystéine (Figure 65). L'addition de groupement PEG permet d'augmenter l'hydrophilie des composés organiques comme l'ont montré les équipes de Chen *et al.*^[106,135] et de Müller *et al.*^[39] La cystéine, quant à elle, permet

le couplage au nouvel ACB par réaction CCTM. L'AF étant visible à la longueur d'onde d'excitation de 290 nm, l'ajout d'un fluorophore n'est pas nécessaire. La fixation du bras O2Oc-O2Oc-Cys-OH ou du résidu cystéine est effectuée sur l'un ou l'autre des acides carboxyliques (α ou γ) de l'acide glutamique de l'AF puisqu'il a été démontré que l'acide glutamique ne joue pas de rôle significatif dans la reconnaissance du RF α .^[260,261]

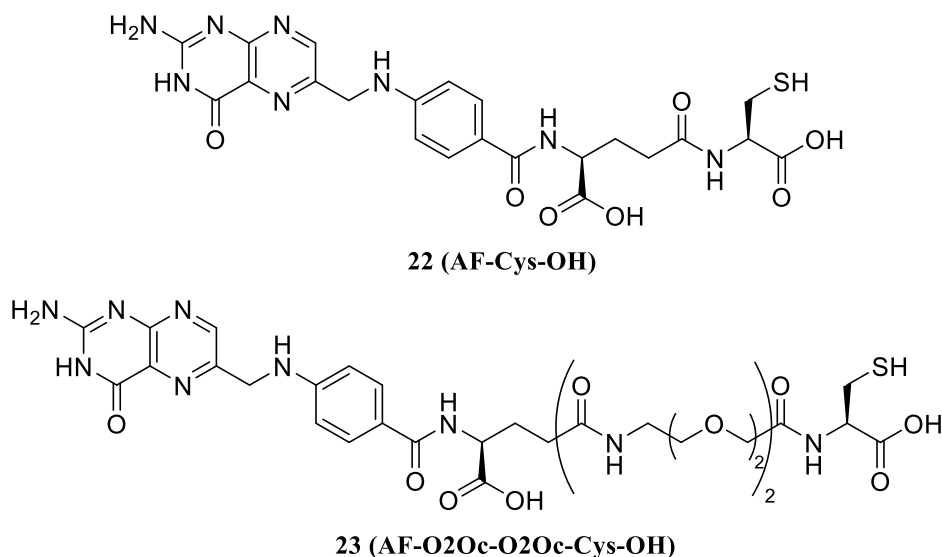


Figure 65 : Structures chimiques de nos agents de ciblage des RF α , **22** et **23**

2.2. Principe de la SPPS

Le développement de la SPPS est attribué à Robert Merrifield qui a obtenu un prix Nobel pour ce travail en 1984.^[262,263] La SPPS consiste à faire croître un peptide fixé à une phase solide correspondant à des billes de résine constituées le plus souvent de polystyrène réticulé avec du divinylbenzène. Le support solide est une révolution dans la synthèse peptidique car il accélère la synthèse en raccourcissant le nombre d'étapes (solvant et réactifs éliminés par filtration, une seule purification finale). Ainsi, le support solide doit être physiquement stable (inerte aux réactifs) et doit gonfler dans le solvant pour permettre la bonne pénétration des réactifs et ne pas entraver les réactions de couplage et de déprotection. Le premier AA de la séquence est fixé par une liaison covalente sur un linker lui-même fixé sur les billes de résine (*i.e.*, bras chlorotrityle, Ramage, DEG aminoéthyle). Le peptide se développe de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale contrairement à la synthèse biologique.

Le principe de la SPPS consiste à ajouter chaque AA un par un en réitérant un cycle de quatre étapes : (i) déprotection de l'extrémité N-terminale de la chaîne peptidique en croissance, (ii) un lavage, (iii) une réaction de couplage entre les fonctions amine préalablement déprotégée

(étape (i)) et acide carboxylique d'un AA protégé sur sa chaîne latérale et son extrémité *N*-terminale et enfin, (iv) un lavage. Une étape de *capping* peut également être insérée après l'étape iv). Le *capping* consiste à acétyler les fonctions amines libres n'ayant pas réagi lors de l'étape ii) afin de les neutraliser et ainsi éviter la formation de peptides de délétion. Cette étape permet également une simplification de l'étape de purification.

De nombreux AAs possèdent une chaîne latérale ayant une fonction réactive. Ces fonctions sont protégées à l'aide de groupements protecteurs permanents, ce qui permet de prévenir les réactions secondaires. Ainsi, deux stratégies de SPPS ont émergé en fonction du choix des groupements protecteurs semi-permanents et permanents : la stratégie (Fmoc/*t*Bu) et la stratégie Boc/Benzyle (Bzl). La stratégie Fmoc/*t*Bu offre un protocole de déprotection doux (étape i)) en condition basique (généralement de la pipéridine (20 à 50%) dans de la DMF) afin d'éliminer le groupe Fmoc et une étape de clivage et déprotection des groupements permanents (groupes Boc et *t*Bu) en condition acide (généralement du TFA). L'avantage du Fmoc est qu'il est clivé dans des conditions très légèrement basiques, mais reste stable dans des conditions acides tandis que les groupement Boc et *t*Bu restent stables en conditions basiques. La stratégie Boc/Bz nécessite, quant à elle un protocole de déprotection (étape i) nécessitant un acide faible (généralement du TFA) et une étape de clivage et de déprotection des groupements permanents nécessitant un acide fort (généralement l'acide inorganique HF). Ainsi, des groupes d'ancrage, qui tolèrent le traitement répétitif de TFA, doivent être employés pour la fixation du peptide à la résine. Habituellement, l'HF utilisé pour le clivage final, limite la taille du lot et le choix du réacteur. La stratégie Fmoc/*t*Bu est la plus populaire et la plus utilisée des deux stratégies. Elle peut être automatisée beaucoup plus facilement que la stratégie Boc/Bzl et elle peut être utilisée à l'échelle du kilogramme.

L'utilisation de groupements protecteurs permanents orthogonaux permet de modifier le peptide en cours de synthèse (cyclisation, modifications des chaînes latérales par phosphorylation, glycosylation...). Ces groupements peuvent être déprotégés en conditions spécifiques pour lesquels le groupement Fmoc et les autres groupements permanents sont stables (*i.e.* : Allyl/Alloc déprotégé par palladium tétrakis triphénylphosphine/phénylsilane).

La réaction entre deux AAs n'est pas naturellement rapide et quantitative. Cette réaction nécessite l'aide d'un réactif de couplage ajouté au moins en quantité équimolaire. Ils appartiennent à la famille des carbodiimides comme le *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC) ou à celles des sels de phosphonium comme le PyBOP ou encore à celles des sels d'uronium

(HATU). L'agent de couplage réagit avec l'acide carboxylique de l'AA rentrant et permet la formation d'une espèce *O*-acylisourée, une espèce très réactive. Cette espèce réagit avec la fonction amine de l'extrémité *N*-terminale de la chaîne peptidique en croissance. Pour éviter les réactions secondaires indésirables et pour favoriser la réaction, des additifs de couplage tels que le cyano(hydroxyimino)acétate d'éthyle (Oxyma)^[264] ou l' HOBt^[265] peuvent être ajoutés en quantités équimolaires.

L'étape de déprotection du groupement Fmoc à l'extrémité *N*-terminale de la chaîne peptidique en croissance se fait dans des conditions très légèrement basiques avec un mélange de 20 à 50% de pipéridine dans de la DMF.

Une fois tous les AAs de la séquence incorporés, le peptide doit être séparé des billes au cours de l'étape de clivage. Cette étape permet également la déprotection de toutes les chaînes latérales des résidus peptidiques. Pour la stratégie Fmoc, le peptide est clivé à l'aide de TFA. Des capteurs des carbocations formées à l'issue de la déprotection (comme les *t*Bu) appelés « *scavengers* », comme le thioanisole ou l'éthanedithiol, peuvent être ajoutés pour limiter les réactions secondaires indésirables. Une fois le clivage effectué, le peptide brut peut être isolé en le précipitant avec un éther. Enfin, le peptide est purifié par RP-HPLC préparative.

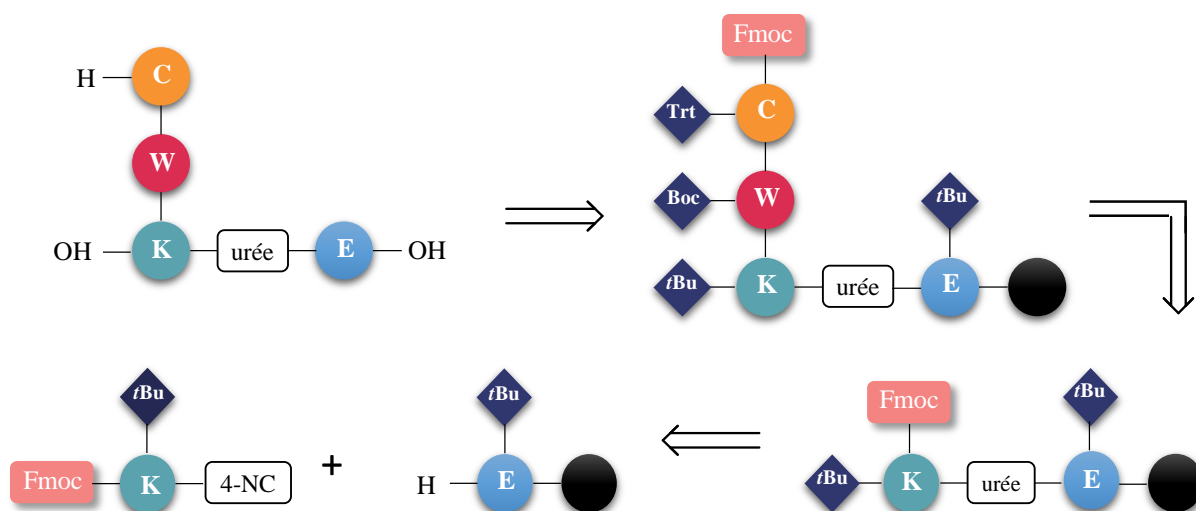
Des automates de synthèse permettent une synthèse rapide de peptides. Ils permettent ainsi un gain de temps de synthèse et une forte reproductibilité des résultats. Cependant, les quantités de matière engagées sur un synthétiseur sont élevées (couplage avec 3-6 équiv. d'AAs contre 1,2-1,5 équiv. d'AAs en manuel) pour maintenir des temps de couplage et de déprotection très courts (5-15 min). Cependant, leur utilisation peut être limitée lors de la synthèse de pseudopeptides. Par exemple, les étapes de déprotection des groupements orthogonaux nécessitent des conditions spécifiques non communes avec les déprotection du Fmoc ou un chauffage par exemple.

Nous avons utilisé cette technologie SPPS pour la construction de nos agents de ciblage modifiés en ajoutant au motif de reconnaissance un résidu cystéine permettant d'ajout d'une fonction thiol et/ou un résidu fluorescent et/ou des motifs PEG.

2.3. Synthèse d'un agent de ciblage des récepteurs PSMA (20)

2.3.1. Stratégie de synthèse

Afin de déterminer la meilleure stratégie de synthèse de **20**, une revue de la littérature sur les méthodes de synthèse du motif DUPA est effectuée ainsi que de celles permettant la formation d'un lien urée. La stratégie la plus efficace pour la synthèse de peptide étant la SPPS par rapport à une synthèse en phase liquide, nous décidons d'utiliser cette stratégie pour la synthèse de **20**. Cependant, ce composé étant un pseudopeptide (lien urée entre la lysine et l'acide glutamique), il n'est pas possible d'utiliser des conditions de SPPS classique pour la formation du lien urée. Comme notre objectif est de synthétiser **20** sur résine, dans un premier temps, la lysine protégée H-Lys(Fmoc)-OtBu doit être activée au niveau de son extrémité *N*-terminale par un groupement nitrophényle. Dans un second temps, le lien urée sera réalisé entre la lysine et l'amine α de l'acide glutamique sur support solide. Enfin, des conditions de couplage classique seront utilisées pour la formation des liens amides entre la lysine et le tryptophane et le tryptophane et la cystéine (Figure 66). La stratégie de synthèse par SPPS utilisant les groupements protecteurs Fmoc/*t*Bu est choisi pour la synthèse de **20**.



2.3.2. Synthèse du composé 20

Comme décrit dans la stratégie de synthèse, le composé **20** est synthétisé en 3 étapes.

2.3.2.1. Création du Motif DUPA

Le motif DUPA, correspondant à un résidu acide glutamique relié par un autre AA (lysine ou acide glutamique) à l'aide d'un lien urée, est présent dans les composés KuE (Lys-urée-Glu) et EuE (Glu-urée-Glu). Pour créer le lien urée entre les AAs protégés lysine et acide glutamique, la méthode la plus décrite fait appel à l'utilisation du triphosgène en milieu basique. Barnerjee *et al.* utilisent le triphosgène pour former un lien urée entre les AAs protégés lysine et acide glutamique afin d'obtenir le composé KuE.^[263] L'utilisation du triphosgène permet d'activer l'amine en passant par une fonction isocyanate (Schéma 35). Des méthodes similaires ont été décrites par Kozikowski et Bandari pour la formation de divers inhibiteurs de PSMA basés sur un motif urée comme EuE et leurs dérivés.^[267,268] L'équipe de Greifenstein *et al.*, quant à elle, décrit cette réaction en phase solide (Schéma 35).^[166]

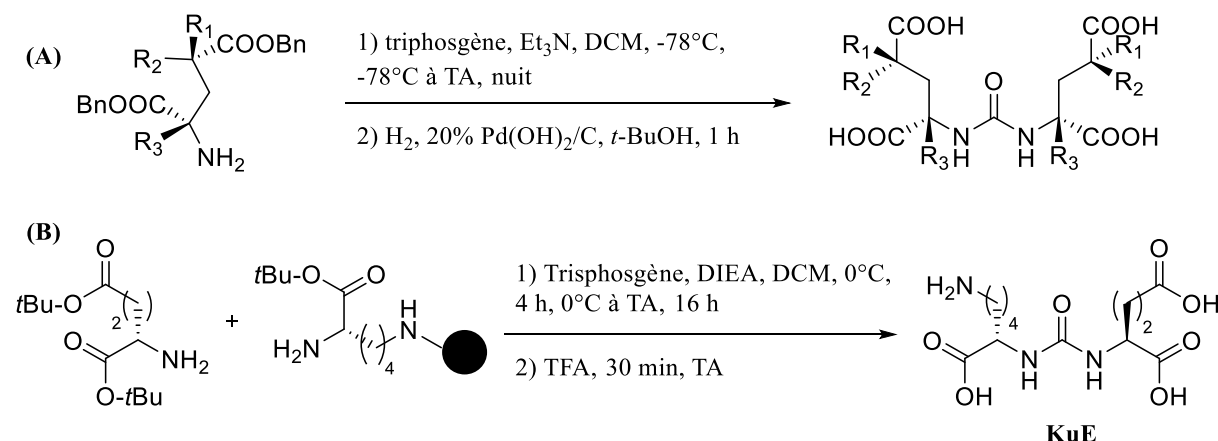


Schéma 35 : Synthèse (A) de dérivés de EuE en phase liquide (R_1 , R_2 , R_3 : Me, Bz, H) et (B) de KuE en support solide à l'aide du triphosgène^[166,267,268]

Une méthode alternative de création d'un lien urée consiste en l'activation d'une amine par un groupement nitrophényle à l'aide du chloroformate de 4-nitrophényle (4-NC) comme activateur d'amine. Cela conduit à l'obtention d'un intermédiaire réactionnel 4-nitrophénylcarbamate pouvant être couplé à une seconde amine libre.^[269] Ainsi, Zhang *et al.* a réalisé le couplage entre une amine secondaire et un acide carboxylique en phase liquide (Schéma 36).^[270] Ce type de réaction a également été utilisé pour la synthèse d'oligourées en SPPS.^[271,272] La seconde stratégie, *via* l'activation de l'amine, est privilégiée par rapport à celle utilisant du triphosgène car le composé 4-NC est beaucoup moins toxique que le triphosgène.

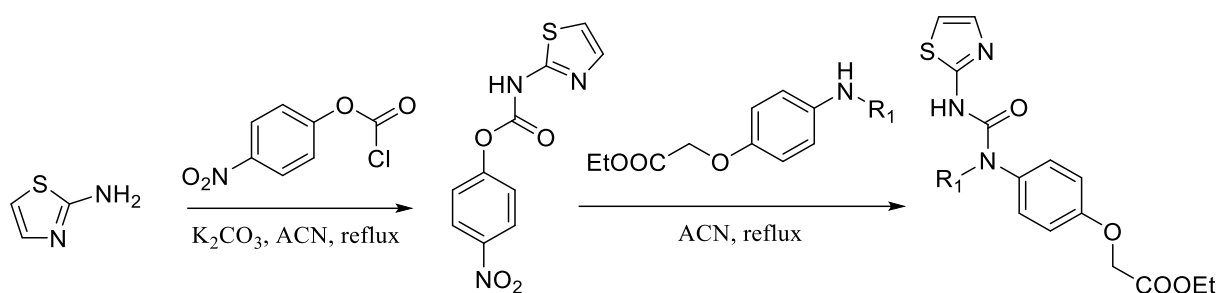


Schéma 36 : Synthèse d'une fonction urée *via* l'activation de l'amine par du chloroformate de 4-nitrophényle^[270]

2.3.2.2. Synthèse de l'intermédiaire 4-NC-Lys(Fmoc)-OtBu (**24**)

La stratégie de synthèse consiste à activer H-Lys(Fmoc)-OtBu par du 4-NC et d'isoler le composé **24** résultant. Ensuite, ce composé **24** pourra être utilisé comme réactif en SPPS automatique et ainsi être couplé à l'acide glutamique protégé (OtBu) fixé sur résine Wang.

La synthèse de la lysine activée **24** a été réalisée en présence de base et en utilisant 4-NC comme activateur (Schéma 37).

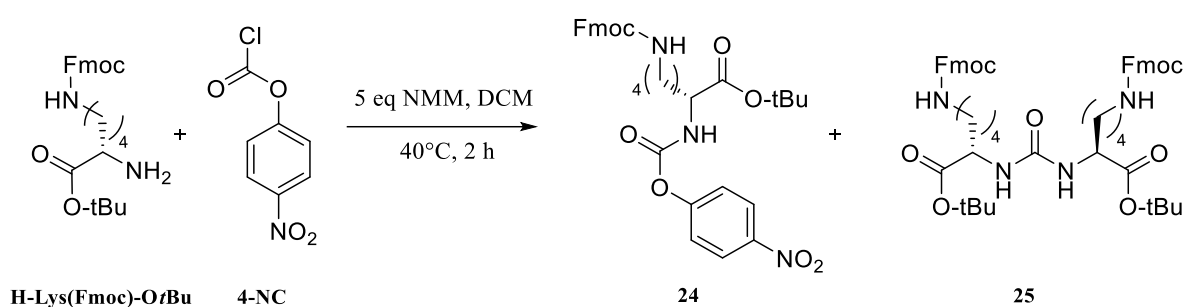


Schéma 37 : Activation de l'extrémité *N*-terminale de H-Lys(Fmoc)-OtBu par du 4-NC

Les premières conditions testées sont celles décrites par Bizet *et al.*^[273] utilisant 3 équiv. de pyridine et 1,2 équiv. de 4-NC à température ambiante dans le DCM anhydre et sous azote (Entrée 1, Tableau 24). Le suivi de la réaction est réalisé par HPLC en analysant les aires relatives des pics obtenus par HPLC des produits de départ, **24** et **25** (5 – 100% B en 15 min (A : H₂O/CH₃CN 95/5 v/v, 0,1% TFA, B : CH₃CN : 0,1% TFA), 214 nm). Après 22 heures de réaction, nous observons bien la formation du composé souhaité **24** mais la réaction n'est pas totale. Une optimisation de cette réaction est donc nécessaire.

Nous avons étudié l'influence de la **nature de la base** utilisée et deux autres bases (DIPEA et NMM) sont testées dans les mêmes conditions que précédemment (Entrées 2 et 3, Tableau 24). Avec ces deux bases, nous observons la formation d'un sous-produit indésirable majoritaire

après 22 heures de réaction, identifié comme étant la bis-lysine urée **25** par HPLC-MS et ¹H RMN. Ce composé est constitué de deux lysines reliées entre-elles par un lien urée, issue de la réaction de la lysine activée sur la lysine. Une réaction totale est obtenue avec de la DIPEA (Entrée 2, Tableau 24). Une réaction non totale est obtenue avec de la NMM (Entrée 3, Tableau 24).

Nous avons poursuivi l'optimisation de cette réaction en étudiant le nombre **d'équivalents de base** : 3 et 5 équiv. pour les trois bases sont testées (Entrées 4-6, Tableau 24). Après 22 heures de réaction, des résultats quasi identiques sont obtenus pour 3 et 5 équiv. de pyridine (Entrées 1 et 4, Tableau 24) avec une formation minoritaire du sous-produit **25** et une réaction non totale. Pour la DIPEA (Entrées 2 et 5, Tableau 24), les résultats sont également similaires puisque le sous-produit **25** est le composé majoritaire et la réaction est quasi-totale. Pour la NMM (Entrées 3 et 6, Tableau 24), nous observons une réaction quasi-totale et la formation du sous-produit **25** mais de manière minoritaire comparé au produit désiré **24** qui est formé avec un ratio de 60/40.

Tableau 24 : Optimisation de la formation du composé **24**

Entrée	Température (°C)	Base	Équiv. Base	Équiv. 4-NC	Ratio H-Lys(Fmoc)-OtBu/24/25 ^a	
					4 h	22 h
1	25	pyridine	3	1,2	71/29/0	65/35/0
2	25	DIPEA	3	1,2	37/44/19	1/31/68
3	25	NMM	3	1,2	40/50/10	32/20/48
4	25	pyridine	5	1,2	/	60/38/2
5	25	DIPEA	5	1,2	/	2/19/79
6	25	NMM	5	1,2	/	9/60/31
7	40	pyridine	5	1,2	48/52/0	44/56/0
8	40	NMM	5	1,2	1/71/26	/
9	40	pyridine	6	1,2	31/64/5	4/27/69
10	40	NMM	5 ^b	1,5	6/82/12	6/69/25

^a : Déterminé par HPLC à 214 nm ; ^b : goutte-à-goutte pendant 3 h

Ces meilleures conditions trouvées (5 équiv. de pyridine ou de NMM), nous ont permis ensuite d'envisager l'étude de l'influence de la **température**. Deux températures sont testées 20°C et 40°C (Entrées 7 et 8 vs. Entrées 4 et 6, Tableau 24). Pour la pyridine (Entrées 4 et 7, Tableau 24), nous observons une meilleure consommation de la lysine de départ à 40°C, puisqu'après 22 heures, il reste 44% de lysine de départ contre 60% à température ambiante. Pour la NMM

(Entrée 8, Tableau 24), après 4 heures à 40°C, nous observons une consommation totale de la lysine de départ et la réaction est donc stoppée. Cependant, nous constatons la formation modérée du sous-produit **25** (26%).

Pour poursuivre l'optimisation, les conditions réactionnelles de l'Entrée 8 (Tableau 24) sont réalisées à nouveau mais la NMM est ajoutée goutte à goutte pendant 3 heures (Entrée 10, Tableau 24). Une heure après la fin du goutte à goutte, nous observons que la réaction est presque totale (6% de lysine de départ restante) et qu'un taux de 82% de produit désiré est obtenu. Les conditions de l'Entrée 10 (Tableau 24) permettent d'obtenir les meilleurs résultats après 4 heures de réaction. Cependant, nous constatons que si le temps de réaction est trop long, la formation du sous-produit **25** devient majoritaire.

Les conditions de l'Entrée 10 (Tableau 24) sont celles qui permettent de former *in situ* le composé **24** désiré avec un TC optimisé. Cependant, le traitement en fin de réaction par lavage/extraction conduit à l'augmentation de la formation du sous-produit **25** de 12% à 41% (*i.e.*, déterminé par HPLC à 214 nm). Des essais de purification ont été réalisés par chromatographie sur gel de silice (NaOAc/éther de pétrole, 30/70, v/v) sans extraction préalable pour tenter de limiter la formation du sous-produit **25**. Ces essais ont donné des rendements en produits isolés de 71,4% pour le sous-produit **25** et de 17,3% pour le composé **24**, alors que *in situ*, les proportions étaient de 24/74/2. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant de l'alumine neutre en lieu et place de la silice (*i.e.*, rendements isolés de 83,86% pour le composé **25** et 10,3% pour le composé **24**). Ces tests de purification montrent que le composé **24** désiré est difficilement isolable sous forme de poudre afin d'être utilisé en SPPS sur automate de synthèse et de plus instable induisant la formation du sous-produit **25** et l'obtention d'un rendement très faible. Nous avons donc opté pour l'utilisation de la lysine activée **24** directement dans la synthèse du composé **20** sans aucune purification préalable.

2.3.2.3. Formation du lien urée entre Fmoc-E(*t*Bu)-résine Wang et le composé **24**

La création du lien urée est une synthèse multi-étape qui nécessite à la fois (i) la formation de la lysine activée **24**, selon le protocole des Entrées 8 ou 10 du Tableau 24 conduisant à un TC du composé **24** *in situ* de 91% et (ii) la préparation en parallèle du composé H-E(*t*Bu)-Wang résine en SPPS sur automate (Schéma 38).

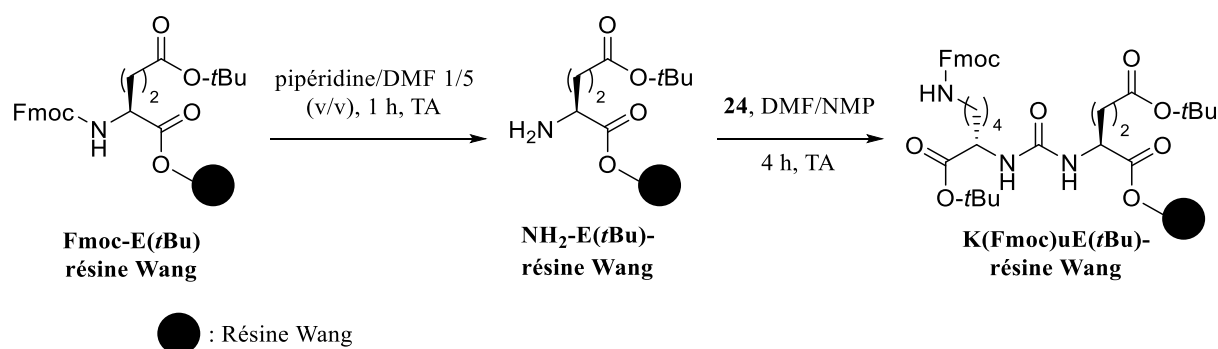


Schéma 38 : Couplage du composé **24** sur Fmoc-E(*t*Bu)-résine Wang en SPPS sur automate.

Le gonflement de la résine dans du DCM suivi d'une étape de déprotection du groupement Fmoc de Fmoc-E(*t*Bu)-Wang résine par un mélange pipéridine/DMF (1/5, v/v) et de lavages à la DMF sont effectués en SPPS sur automate. Ces deux préparations (*i.e.*, lysine activée et Fmoc-E(*t*Bu)-résine Wang) ont lieu en même temps sur un temps d'environ 1 heure. Ensuite, la lysine activée **24**, repris dans la DMF, est ajouté dans l'automate puis le programme de couplage est réalisé en automatique pendant 2 heures à température ambiante afin de créer le lien urée. Un micro-clivage est effectué afin de s'assurer que la lysine a bien été couplée à la résine. Après analyse par HPLC-MS, la présence majoritaire d'un composé ayant un $[M+H]^+$, $m/z_{\text{observé}}$ de 542,10 (t_R : 11,90 min) ($[M+H]^+$, $m/z_{\text{calculé}}$: 541,21) est observée (Annexe 6), confirmant ainsi la formation du lien urée.

2.3.2.4. Couplage des AAs (W et K) sur K(Fmoc)-urée-E(*t*Bu)-Wang résine

L'ensemble des étapes suivantes sont réalisées en SPPS sur automate de synthèse et sont décrites dans le Schéma 39. Après déprotection du Fmoc du groupement ϵNH_2 de la lysine par un mélange pipéridine/DMF (1/5, v/v) et lavage à la DMF, le résidu tryptophane (W) est couplé en utilisant 6 équiv. de Fmoc-W(Boc)-OH, 9 équiv. de NMM et 6 équiv. de HBTU. Le même cycle déprotection/couplage est réalisé pour le couplage du résidu cystéine (C) en utilisant Fmoc-C(Trt)-OH. Des micro-clivages effectués après chaque couplage montrent la bonne insertion des AAs. Une analyse par HPLC-MS ((5 – 100% B en 15 min (A : H₂O/CH₃CN 95/5 v/v, 0,1% TFA, B : CH₃CN : 0,1% TFA), 214 nm) des micro-clivages indiquent un t_R = 12,7 min, $[M+H]^+$, $m/z_{\text{calculé}}$ = 728,25, $[M+H]^+$, $m/z_{\text{observé}}$ = 728,20 pour l'insertion du tryptophane (Annexe 7), et un t_R = 12,90 min, $[M+H]^+$, $m/z_{\text{calculé}}$ = 831,25, $[M+H]^+$, $m/z_{\text{observé}}$ = 831,25 pour l'insertion de la cystéine (Annexe 8). Ainsi, la synthèse du composé **20** est obtenue par SPPS en semi-automatique (Schéma 39), puisque l'activation de l'extrémité *N*-terminale de la lysine

par 4-NC se fait en manuelle sous hotte et l'ensemble des autres étapes sont réalisées sur automate.

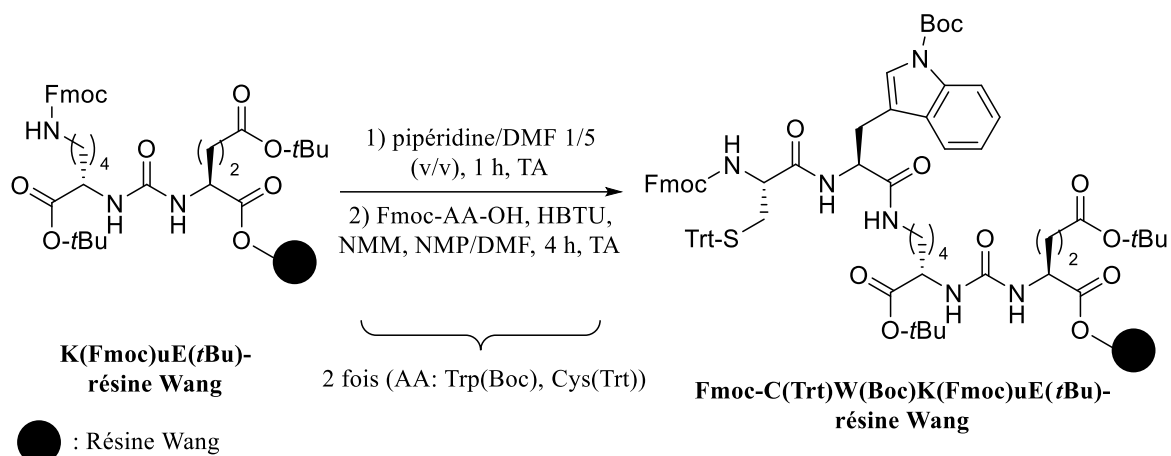


Schéma 39 : Couplage des AA Fmoc-W(Boc)-OH et Fmoc-C(Trt)-OH sur K(Fmoc)uE(tBu)-résine Wang

2.3.2.5. Clivage et purification du composé 20

La dernière étape de déprotection du groupement Fmoc est effectuée, selon les mêmes conditions que précédemment, suivie de l'étape de clivage de la résine et des déprotections des groupements Boc, *t*Bu et trityle (Trt) réalisée avec un mélange TFA/H₂O/triisopropylsilane (TIPS) (2 mL, 92,5/5/2,5, v/v/v) pendant 2 heures à température ambiante. De l'eau et du TIPS sont utilisés comme *scavengers* pour prévenir les potentiels réactions avec le carbocation *t*Bu produits après déprotection de l'acide glutamique et du 1,2-éthanedithiol prévenir la formation de ponts disulfures.

Après analyse HPLC-MS (5 – 100% B en 15 min (A : H₂O/ CH₃CN 95/5 v/v, 0,1% TFA, B : CH₃CN, 0,1% TFA), 214 nm), deux pics majoritaires sont observés dont un correspondant au composé **20** désiré ($[M+H]^+$, $m/z_{\text{observé}}$: 609,20 ($[M+H]^+$, $m/z_{\text{calculé}}$ = 609,23). Le second composé ($[M+H]^+$, $m/z_{\text{observé}}$ = 653), nommé **26**, correspond au composé désiré sur lequel le groupement protecteur Boc est partiellement éliminé, puisque seul le groupement *t*Bu de la fonction Boc est éliminé (Schéma 40). Pour éviter la formation de ce second produit, le pseudopeptide clivé est lyophilisé en présence de 0,1% d'acide acétique. Après analyse HPLC-MS, le second produit avec un m/z de 653,15 n'est pas observé, montrant que cette lyophilisation en milieu acide est efficace pour finaliser la déprotection du tryptophane.

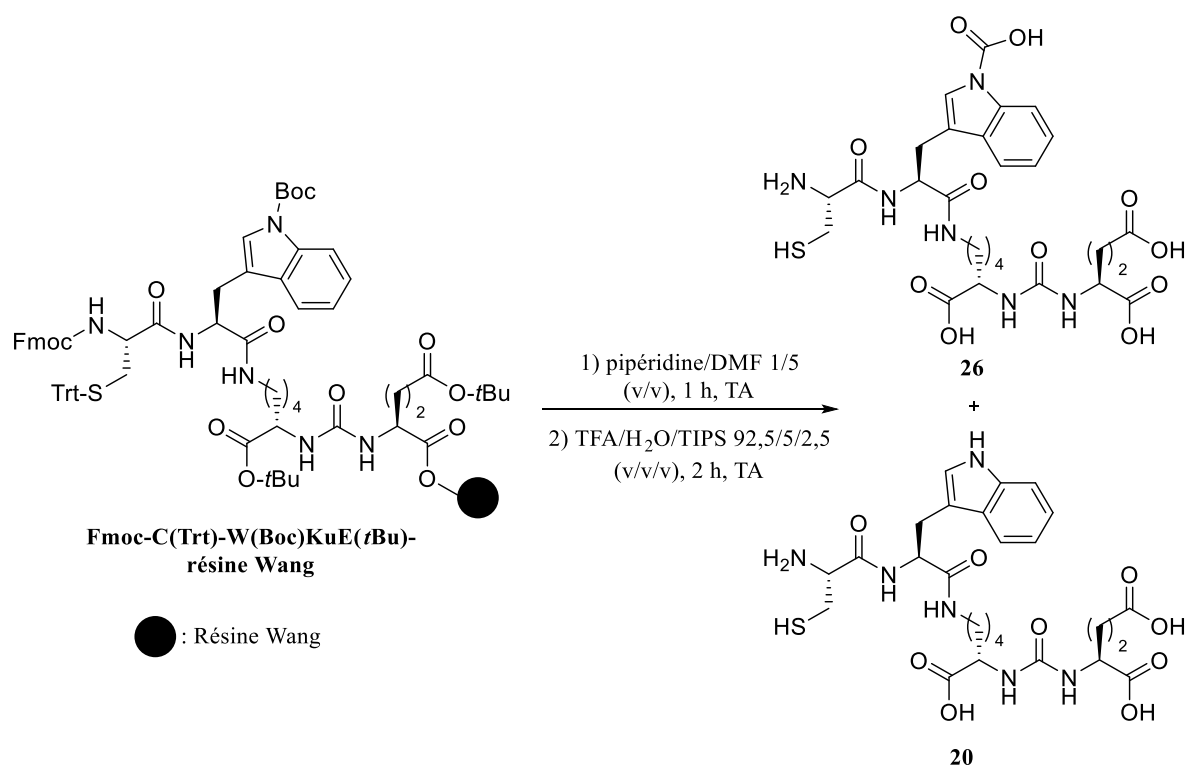


Schéma 40 : Déprotection finale et clivage de la résine Wang du pseudopeptide **20**

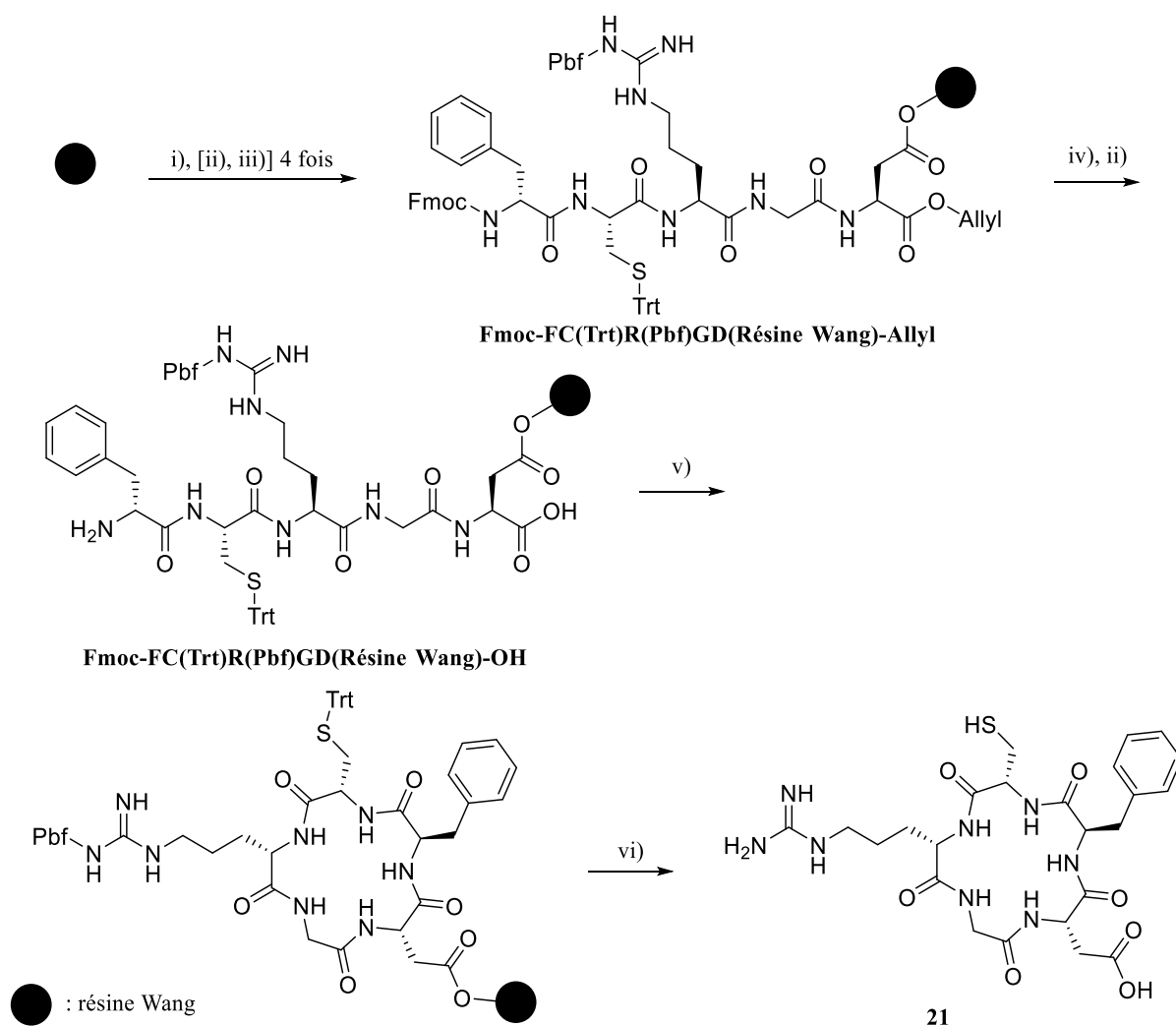
La purification du pseudopeptide **20** est réalisée par RP-HPLC avec un gradient de 5-40%B en 20 min. Trois pics sont isolés ($t_{R1} = 15,22$ min, $t_{R2} = 17,09$ min et $t_{R3} = 18,29$ min) ayant tous trois un m/z observé de 609,20 ($[M+H]^+$, $m/z_{calculé} = 609,23$). Le produit avec le temps de rétention le plus faible est largement majoritaire comparé aux deux autres (Annexe 9). Une analyse 1H RMN dans le DMSO- d_6 , effectuée sur les trois produits isolés, montre qu'il s'agit bien du même composé (Annexe 10) bien que l'intensité de certains pics sont différents sur les spectres 1H RMN. Ces résultats nous laisseraient penser que le composé **20** serait présent sous 3 différentes conformations, chacune interagissant différemment avec la colonne préparative et sortant donc à des temps de rétention différents. Le rendement global de synthèse du composé **20** est de 46% pour une pureté HPLC déterminé à 280 nm > 95%.

2.4. Synthèse du c(RGDfC) (**21**)

La stratégie de synthèse du cyclopeptide **21** (c(RGDfC)) a été mise en place au LCPM en s'inspirant de la synthèse en SPPS sur automate du cyclopeptide c(RGDfK).^[274] Brièvement, sur automate de synthèse en SPPS, les couplages des 5 AAs (L-Asp, Gly, L-Arg, L-Cys et D-Phe) ont été réalisés par une stratégie Fmoc/*t*Bu (Schéma 41).

Le premier AA de la séquence, l'acide aspartique (*N*- α -Fmoc-Asp(OAll)), est accroché à la résine Wang *via* l'acide carboxylique de sa chaîne latérale. Cet accrochage est effectué en

utilisant 2 équiv. de *N*- α -Fmoc-Asp(OAll) et 5 équiv. de DIPEA à température ambiante pendant 3 heures dans le DCM. L'utilisation d'un groupement protecteur allyl ester (OAll) à l'extrémité C-terminale permet une protection orthogonale par rapport aux autres groupements protecteurs qui seront utilisés pour les autres AAs (Trt et 2,2,4,6,7-Pentaméthylidihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf) pour les chaînes latérales de la L-Cys et L-Arg, respectivement, et Fmoc pour l'extrémité N-terminale de la D-Phe).



Conditions et réactifs : i) *N*- α -Fmoc-Asp-OAll, HBTU, DIPEA, TA, 3 h, DCM puis 30 min, MeOH. ii) Pipéridine/DMF (1/5, v/v), 14 min, TA. iii) Fmoc-AA-OH, HBTU, NMM, NMP, DMF, 30 min, TA (AAs: Gly, L-Arg(Pbf), L-Cys(Trt) et D-Phe). iv) Pd(PPh₃)₄, CHCl₃/AcOH/NMM (92,5/5/2,5, v/v/v) TA, 2 h. v) HBTU, NMM, NMP, DMF, TA, 16 h

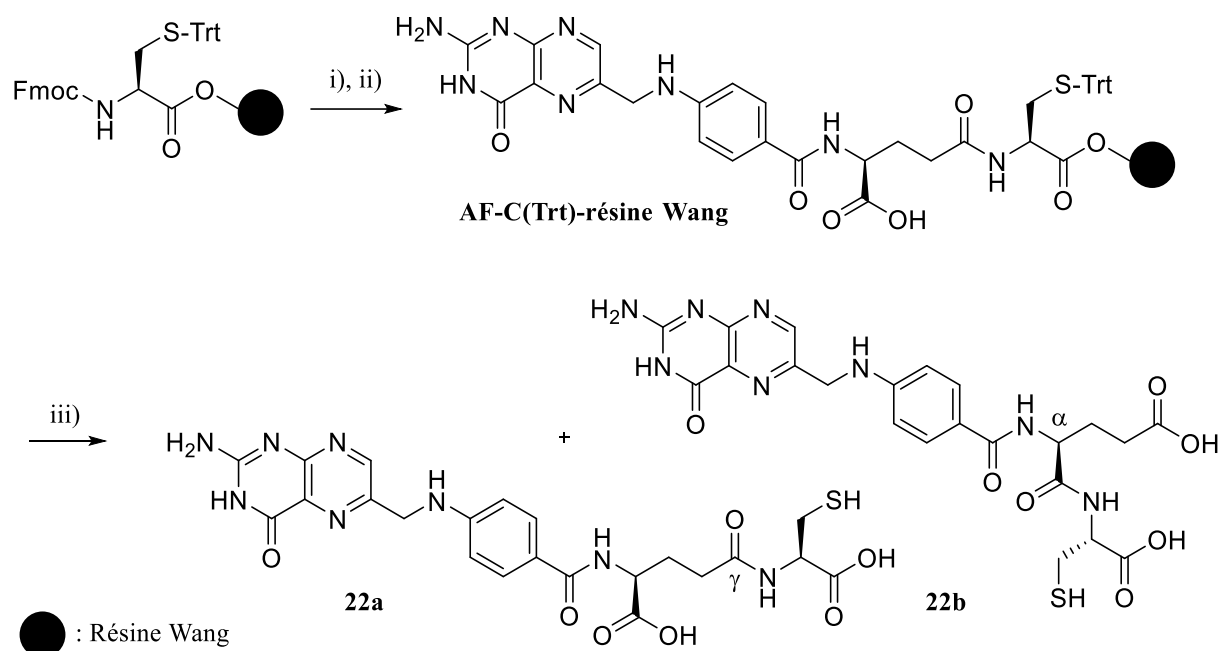
Schéma 41 : Synthèse du composé **21** (c(RGDfC)) par SPPS sur automate.

Les 4 autres AAs de la séquence peptidique (Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Cys(Trt)-OH et Fmoc-D-Phe-OH) sont couplés à l'aide de 2 équiv. de Fmoc-AA-OH, 3 équiv. de HBTU comme activateur, 9 équiv. de NMM et 3 équiv. de NMP dans 2 mL de DMF à TA

pendant 15 minutes. Les déprotections des groupements Fmoc sont réalisées avec une solution de pipéridine/DMF (1/5, v/v) pendant 14 minutes. Une fois les 5 AAs de la séquence peptidique insérés sur la résine Wang, les groupements protecteurs Fmoc et OAll en position *N*- et *C*-terminale sont déprotégés, successivement. La déprotection du groupement protecteur OAll s'effectue avec du Pd(PPh₃)₄ à TA pendant 2 heures et pour le groupement Fmoc, les mêmes conditions que précédemment sont utilisées. Une cyclisation intramoléculaire entre les deux extrémités terminales est réalisée par couplage peptidique dans des conditions classiques (HBTU, NMM, NMP et DMF 16 heures). Le clivage du cyclopeptide de la résine ainsi que la déprotection des groupements Trt et Pbf sont réalisés en utilisant une solution de TFA/TIPS/H₂O (92,5/2,5/5, v/v/v). Après précipitation dans de l'éther diéthylique à -20°C, le cyclopeptide est purifié par RP-HPLC (10% B pendant 15 min, 10 à 100% B en 5 min. (t_R : 19,05 min)) conduisant au cyclopeptide **21** (c(RGDfC)) avec un rendement global de 42% et une pureté HPLC >98% à 280 nm.

2.5. Synthèse de AF-linker-Cys

Le premier agent de ciblage dérivé de l'AF qui fut synthétisé est l'AF couplé au résidu cystéine (**22a** et **22b**) en SPPS *via* ces deux groupements acides carboxyliques en position α et γ portés par l'acide glutamique (Schéma 42).



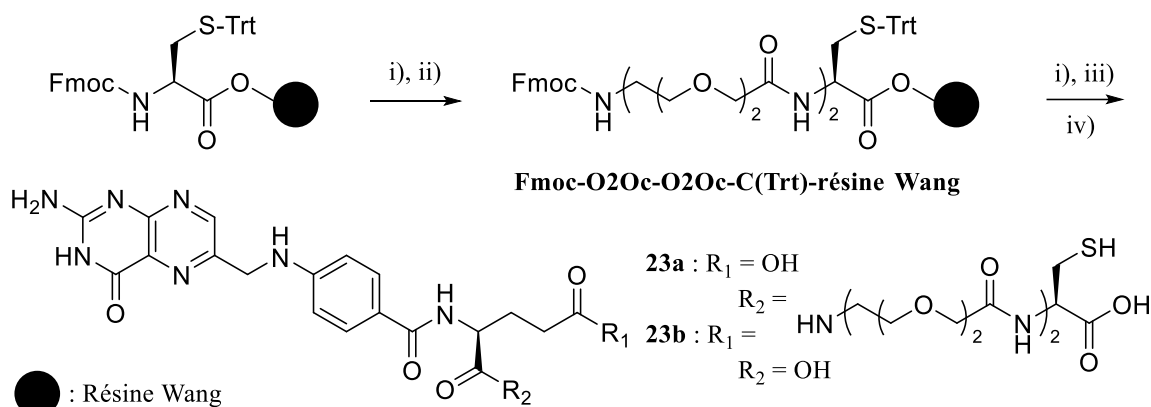
Conditions et réactifs : i) Pipéridine/DMF (1/5, v/v), 1 h, TA. ii) AF, HBTU, NMM, DMF, NMP, 8 h, TA. iii) TFA/H₂O/TIPS (92,5/5/2,5, v/v/v), 1 h, TA

Schéma 42 : Synthèse des composés **22a/22b** en SPPS

La synthèse réalisée par SPPS en mode manuel consiste, dans un premier temps, à coupler l'AF sur la résine Fmoc-Cys(Trt)-Wang, préalablement déprotégée sur son extrémité *N*-terminale, par 1,5 équiv. d'AF, 1,5 équiv. de HBTU et 3 équiv. de NMM dans 5 mL de DMF pendant 8 heures à TA sous agitation à 470 rpm. Une fois le couplage effectué, le décrochage de la résine et la déprotection du groupement Trt sont réalisés par une solution de TFA/TIPS/H₂O (92,5/2,5/5, v/v/v). Le produit est ensuite précipité dans de l'éther diéthylique à -20°C. La présence du produit souhaité est confirmé par HPLC-MS (*t_R* : 10,54 et 10,63 min, ratio 65/35, [M+H]⁺, *m/z*_{théorique} : 545,16, *m/z*_{observé} : 545,20). Vu qu'il a été montré par Müller *et al.* et Leamon *et al.* qu'aucun des deux acides carboxyliques de l'AF ne soit significativement impliqué dans la reconnaissance par le RF α , aucune protection d'un des deux acides carboxyliques n'est réalisée au préalable avant le couplage.^[260,261] Ainsi, un mélange des deux régiosomères AF α -Cys-OH (**22a**) et AF γ -Cys-OH (**22b**) est obtenu. Malheureusement ce mélange n'étant soluble que dans le DMSO, il n'a pas été possible de le purifier par HPLC préparative et donc, de le caractériser correctement par RMN. Ce problème de solubilité souligne le caractère hydrophobe de l'AF-Cys-OH et valide notre choix de synthèse d'un autre dérivé d'AF **23** comportant un bras espaceur à base de PEG entre l'AF et le résidu cystéine (AF-O2Oc-O2Oc-Cys-OH).

La stratégie de synthèse de **23** a été conçue de sorte qu'elle puisse être facilement réalisée par SPPS (Schéma 43). Le bras espaceur O2Oc-O2Oc choisi est inséré à l'aide du composé Fmoc-O2Oc-O2Oc-OH possédant une fonction acide carboxylique libre et une fonction amine protégée par un groupement Fmoc. Ce composé a été choisi pour mimer les AAs protégés qui sont employés en SPPS en stratégie Fmoc/*t*Bu. La synthèse des composés **23a** et **23b** est réalisée manuellement en SPPS. La même résine Fmoc-Cys(Trt)-Wang, que celle précédemment utilisée pour la synthèse des dérivés **22a** et **22b**, est utilisée. Cette résine, préalablement déprotégée sur son extrémité *N*-terminale, est couplée au bras espaceur Fmoc-O2Oc-O2Oc-OH dans des conditions classiques de SPPS par l'utilisation de 2 équiv. de Fmoc-O2Oc-O2Oc-OH, 4 équiv. de NMM, 2 équiv. de HBTU dans de la DMF pendant 5 heures à TA sous agitation à 470 rpm. Ensuite, après déprotection du groupement Fmoc dans les conditions basiques classiques, l'AF est inséré à son tour sur la résine dans des conditions classiques de SPPS (2 équiv. d'AF, 4 équiv. de NMM, 2 équiv. de HBTU dans de la DMF pendant 5 heures à température ambiante et sous agitation à 470 rpm). Finalement, après clivage de la résine et déprotection du groupement Trt par du TFA, les deux régiosomères **23a** et **23b** sont purifiés par HPLC préparative avec une colonne C18 (5 – 35% B en 35 min (A : H₂O, B : CH₃CN)). En

effet, le dérivé brut **23** est soluble dans un mélange H₂O/CH₃CN, permettant sa purification par RP-HPLC. Cette solubilité souligne le caractère plus hydrophile de **23** par rapport à **22**. Comme précédemment, un mélange de deux régioisomères AF-O₂Oc-O₂Oc-Cys-OH (**23a/23b**) est obtenu avec un ratio 60/40 (t_R : 7,30 et 7,49 min, [M+H]⁺, m/z_{théorique} : 835,30 m/z_{observé} : 835,20) un rendement de 15% et une pureté HPLC à 290 nm de 89% (Schéma 43).



Conditions et réactifs : i) Pipéridine/DMF (1/5, v/v), 1 h, TA. ii) Fmoc-O₂Oc-O₂Oc-OH, HBTU, NMM, NMP, DMF, 5 h, TA. iii) AF, HBTU, NMM, NMP, DMF, 5 h, TA. iv) TFA/TIPS/H₂O (92,5/2,5/5, v/v/v), 2 h, TA

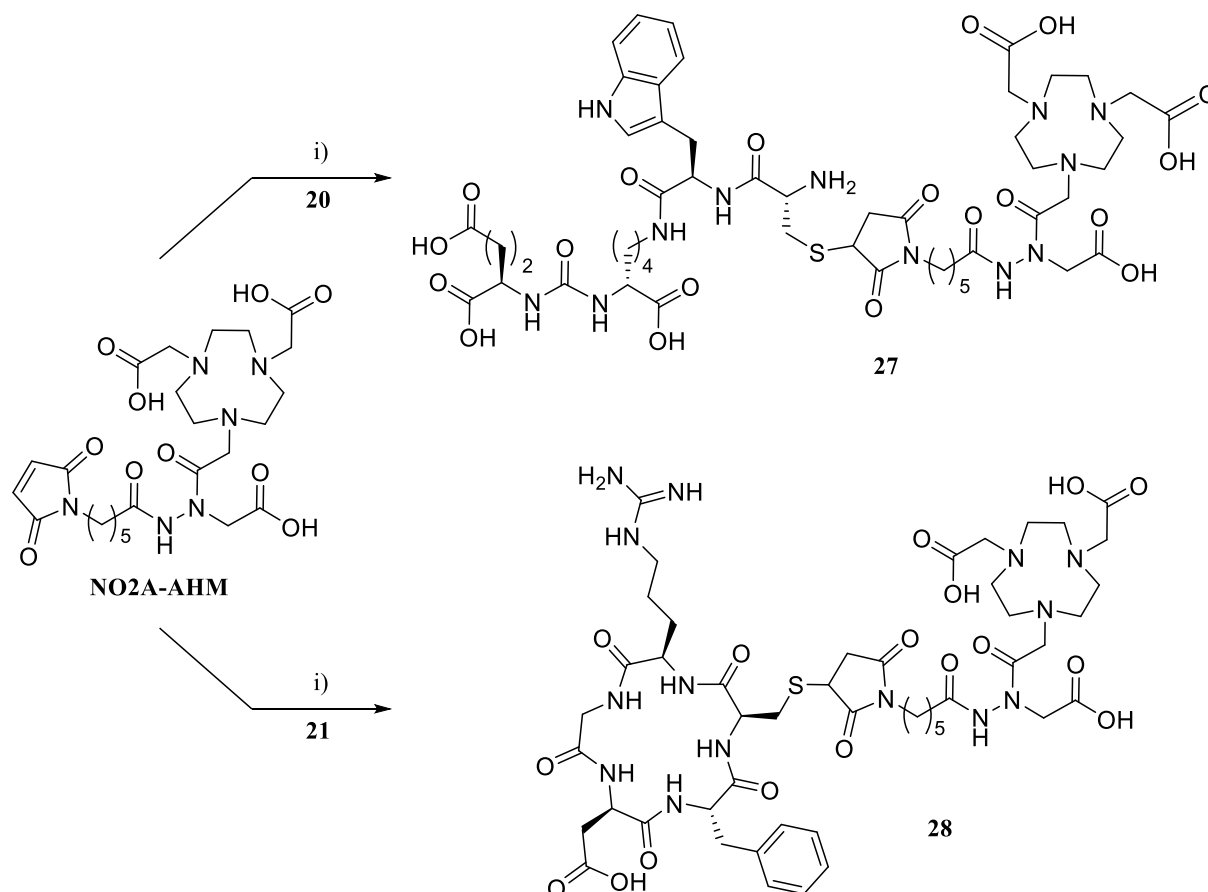
Schéma 43 : Synthèse de **23a/23b** (AF-O₂Oc-O₂Oc-Cys-OH) par SPPS

Pour conclure, 3 agents de ciblage **20**, **21** et **23** (CWKuE, c(RGDfC) et AF-O₂Oc-O₂Oc-Cys-OH) ont été développés et synthétisés avec succès (rendements globaux de 46%, 42% et 15%, respectivement). Ils possèdent tous les trois le motif de reconnaissance spécifiques à leur protéine d'intérêt, un groupement fluorescent ou UV actif permettant aisément de les suivre par HPLC pour des études *in vitro*, ainsi qu'un résidu cystéine pour leur couplage à NO₂A-AHM.

3. Couplage des agents de ciblage à l'ACB

Une fois les agents de ciblage modifiés obtenus, ceux-ci sont couplés à notre ACB (NO₂A-AHM) par réaction CCTM. Cette réaction est une addition 1,4 de Michael entre la fonction thiol du résidu cystéine, porté par l'agent de ciblage, et de la fonction maléimide de NO₂A-AHM, ce qui conduit à la formation d'une fonction N-alkyl thiosuccinimide (Schéma 44). NO₂A-AHM et les agents de ciblage **20** et **21** étant tous solubles dans l'eau, la réaction est conduite dans du PBS (0,1 M, pH 7,4).^[275] Un léger excès du composé possédant la fonction thiol est utilisé (1,1 équiv.). La réaction est totale après agitation pendant 90 minutes à 40°C. Les composés **27** (NO₂A-AHM-CWKuE) et **28** (NO₂A-AHM-c(RGDfC)) sont obtenus après purification par RP-HPLC avec un gradient de 5-35% B en 35 minutes. **27** et **28** sont obtenus tous deux avec un rendement de 77% et une pureté à 214 nm de 95% et >99%, respectivement.

Pour les deux composés, les chromatogrammes obtenus présentent un pic dédoublé en HPLC-MS montrant la présence de deux espèces de masse identique ($[M+H]^+$, $m/z_{\text{théorique}} : 1177,48$, $m/z_{\text{observé}} = 1177,55$ pour **27** et $[M+H]^+$, $m/z_{\text{théorique}} : 1147,48$, $m/z_{\text{observé}} = 1147,55$ pour **28**, Annexes 11 et 12). Cela est dû au fait que le couplage induit la formation d'un carbone asymétrique conduisant donc à la formation de deux diastéréoisomères.



Conditions et réactifs : i) PBS (0,1 M, pH 7,4), 40°C, 90 min.

Schéma 44 : Synthèse des composés **27** et **28**

Ces deux composés **27** et **28**, associant notre ACB et les agents de ciblage, sont appelés précurseurs de marquage pour l'étude du marquage en radiochimie conduisant à la synthèse des radioconjugués. Dans le cas de la synthèse du composé **27** à base du motif DUPA, on pourrait également expliquer la présence du pic dédoublé par la formation d'une espèce plus stable à l'hydrolyse et non sujette à la réaction de rétro-Michael. Ce composé peut se former après la réaction de CCTM au cours d'une réaction de transcyclisation décrit par Lahnsteiner *et al* (Figure 67).^[276] Pour vérifier cette hypothèse, une étude cinétique de la réaction ainsi qu'une caractérisation RMN des deux espèces serait nécessaire.

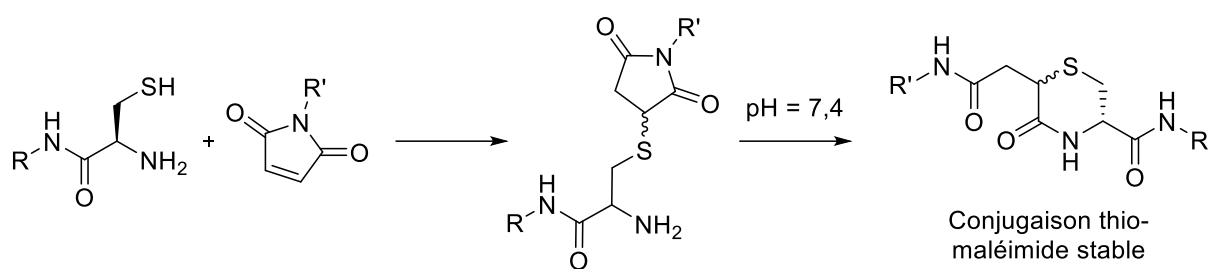
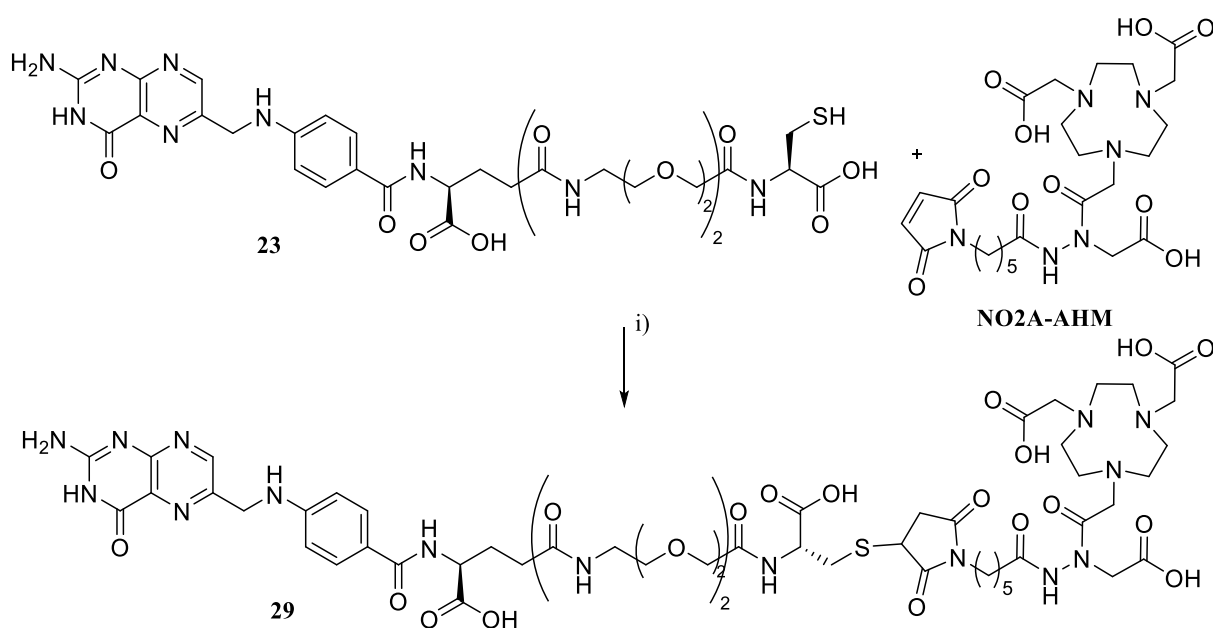


Figure 67 : Réaction de transcyclisation *in situ* suivant une réaction de CCTM

Concernant le couplage entre **NO2A-AHM** et le composé **23a/23b**, des essais ont été tenté dans du PBS à pH 7,4 (Schéma 45).



Conditions et réactifs : 1 équiv. **NO2A-AHM**, 1 équiv. du composé **23**, PBS pH 7,4, TA, 24 h.

Schéma 45 : Synthèse du composé **29**

La formation d'un composé **29** de m/z : 1403,70 est observé minoritairement (t_R : 9,8 et 10,3 min, $[M+H]^+$ $m/z_{théorique}$: 1403,44) après 24 heures d'agitation à TA. De plus, la réaction n'est pas totale et on observe la formation de nombreux sous-produit par l'analyse HPLC du brut réactionnel. Il est donc supposé une dégradation du composé **23a/23b**. En effet, il a été démontré par Gazzali *et al.* que l'AF est un produit très sujet à dégradation, surtout lorsqu'il est couplé à un autre composé.^[250] Un essai de couplage dans un mélange PBS pH 7,4/DMSO (1/1, v/v) a été réalisé, mais la formation du composé **29** n'a pas été observé. L'optimisation du couplage sera à poursuivre dans des essais complémentaires.

4. Synthèse des équivalents non-radioactifs

Les références non-radioactives sont indispensables pour valider la formation des radiotraceurs en radiochimie. En effet, elles permettent de réaliser l'identification par HPLC en comparant les temps de rétention du radiotraceur synthétisé et de son équivalent non-radioactif. En effet, travaillant avec des quantités de matière très faible, il n'est pas possible d'identifier par HPLC-MS la masse des composés radiomarqués puisque la quantité injectée est inférieure à la limite de détection. De plus, ces composés peuvent avoir un intérêt en biologie afin d'évaluer les activités biologiques des radiotraceurs *in vitro*. En effet, la détermination de la constante d'affinité ou l'IC₅₀ permet de vérifier que la conjugaison de l'agent de ciblage à un agent de complexation n'impacte pas négativement la capacité de reconnaissance de l'agent de ciblage par le récepteur, et que la complexation ne modifie pas également ses propriétés de biodistribution. De plus, d'autres tests d'internalisation cellulaire ou de viabilité cellulaire peuvent être réalisés pour obtenir plus d'informations sur la capacité d'internalisation du radiotraceur et donc de sa potentielle accumulation dans les cellules cancéreuses et la toxicité des précurseurs.

Étant donné que la complexation au gallium de **NO2A-AHM** est impossible du fait de l'hydrolyse de la liaison entre l'hydrazine et la cage NOTA, seuls les références non-radioactives pour les deux éléments aluminium-fluor (Al^{nat}F) et lutécium (^{nat}Lu) sont réalisées pour les deux précurseurs de marquage **27** et **28**.

4.1. Synthèse de Al^{nat}F-NO2A-AHM-CWkuE (Al^{nat}F-27) et Al^{nat}F-NO2A-AHM-c(RGDfC) (Al^{nat}F-28)

Les références non radioactives à l'aluminium-fluor sont synthétisées pour les deux précurseurs de marquage **27** et **28** (Schéma 46) en utilisant les conditions de marquage optimisées au Chapitre 3 (Parties 2.2. et 2.3.).

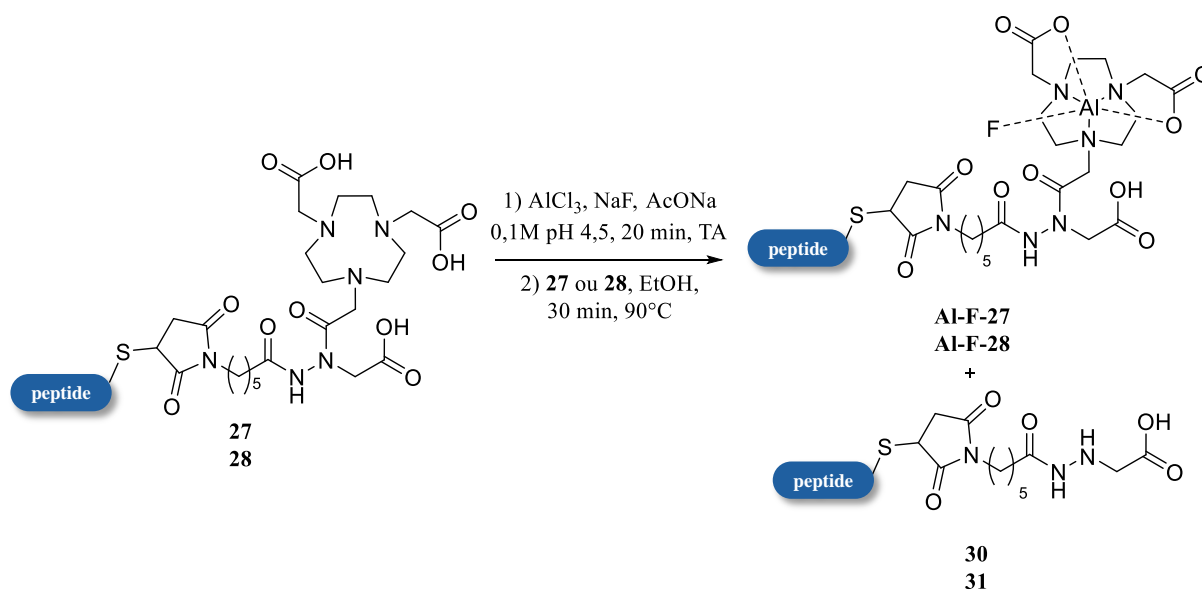


Schéma 46 : Complexation des composés **27** et **28** à l'aluminium-fluor (peptide = **20** pour **27** et **30**, et peptide = **21** pour **28** et **31**)

Ainsi, l'étape préalable de mise en contact de l' AlCl_3 (1,5 équiv.) et NaF (4,5 équiv.) est réalisée pendant 20 minutes à TA dans du tampon NaOAc 0,1 M pH 4,5 avant l'ajout du précurseur de marquage (1,0 équiv.) et de EtOH (50% du volume total) (Schéma 46). De même que pour la synthèse sur une échelle de 10 mg de la référence froide $\text{Al}^{\text{nat}}\text{F-NO}_2\text{A-AHM}$, une faible quantité du composé issue de la coupure par l'aluminium est observée (12% de Mal-Hyd-Bras-CWKuE (**30**), $[\text{M}+\text{H}]^+$, $m/z_{\text{théorique}}$: 892,35, $m/z_{\text{observé}}$: 892,30 et 16% de Mal-Hyd-bras-c(RGDfC) (**31**), $[\text{M}+\text{H}]^+$, $m/z_{\text{théorique}}$: 862,35, $m/z_{\text{observé}}$: 862,30) amenant à l'obtention des composés marqués $\text{Al}^{\text{nat}}\text{F-27}$ et $\text{Al}^{\text{nat}}\text{F-28}$ avec des TC de 83% et 88%, respectivement (mesuré par HPLC à 214 nm) (Annexes 13 et 14). Les complexes sont purifiés par RP-HPLC afin d'éliminer les sels et le précurseur n'ayant pas réagi. Les composés $\text{Al}^{\text{nat}}\text{F-27}$ et $\text{Al}^{\text{nat}}\text{F-28}$ sont obtenus avec des rendements de 78 et 81% respectivement. La complexation est également confirmée par RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) grâce à l'apparition d'un massif entre 2,8 et 3,8 ppm dû au dédoublement des 12 protons du cycle NOTA (3 motifs N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$) et aux 4 protons des deux chaînes latérales alkyles (2 N- $\text{CH}_2\text{-COO}^-$) du cycle NOTA (Annexes 15 et 16). De plus, le spectre RMN ^{19}F (D_2O , 282 MHz) montre un pic à -166,57 ppm prouvant la présence d'un atome de fluor dans la molécule (Annexe 17).

4.2. Synthèse de ^{nat}Lu-NO2A-AHM-CWKuE (^{nat}Lu-27) et Lu-NO2A-AHM-c(RGDfC) (^{nat}Lu-28)

Les références non-radioactives au lutécium (^{nat}Lu) sont synthétisées pour les deux précurseurs de marquage obtenus **27** et **28** (Schéma 47). Les conditions de marquage optimisées au Chapitre 3 (Partie 2.3.) sont employées pour le marquage des deux composés (*i.e.*, 1,5 équiv. de Lu(NO₃)₃, 40°C et 30 minutes, tampon NaOAc 0,1 M pH 4,5). De même que pour la synthèse à grande échelle de la référence froide ^{nat}Lu-NO2A-AHM, une faible quantité du composé issue de la coupure par le lutécium est observée (4,6% de Mal-Hyd-bras-c(RGDfC) (**31**) [M+H]⁺, m/z_{théorique} : 862,35, m/z_{observé} : 862,30) amenant à la formation du composé ^{nat}Lu-28 avec un rendement de 93%. ^{nat}Lu-27 est obtenu avec un TC de 88% (mesuré par HPLC à 214 nm) et le produit issu de la coupure n'est pas observé (Annexes 18 et 19). De même que pour le composé ^{nat}Lu-NO2A-AHM, les purifications sont effectuées avec 0,01% de TFA (pH 4) afin de limiter la décomplexation qui serait due à un pH trop acide lors de la purification. Après purification, les références ^{nat}Lu-27 et ^{nat}Lu-28 sont obtenues avec des rendements respectifs de 62 et 56%. La complexation est également confirmée par RMN ¹H (D₂O, 400 MHz) grâce à l'apparition d'un massif entre 2,8 et 3,8 ppm dû au dédoublement des 12 protons du cycle NOTA (3 motifs N-CH₂-CH₂-N) et aux 4 protons des deux chaînes latérales alkyles (2 N-CH₂-COO⁻) du cycle NOTA (Annexes 15 et 16).

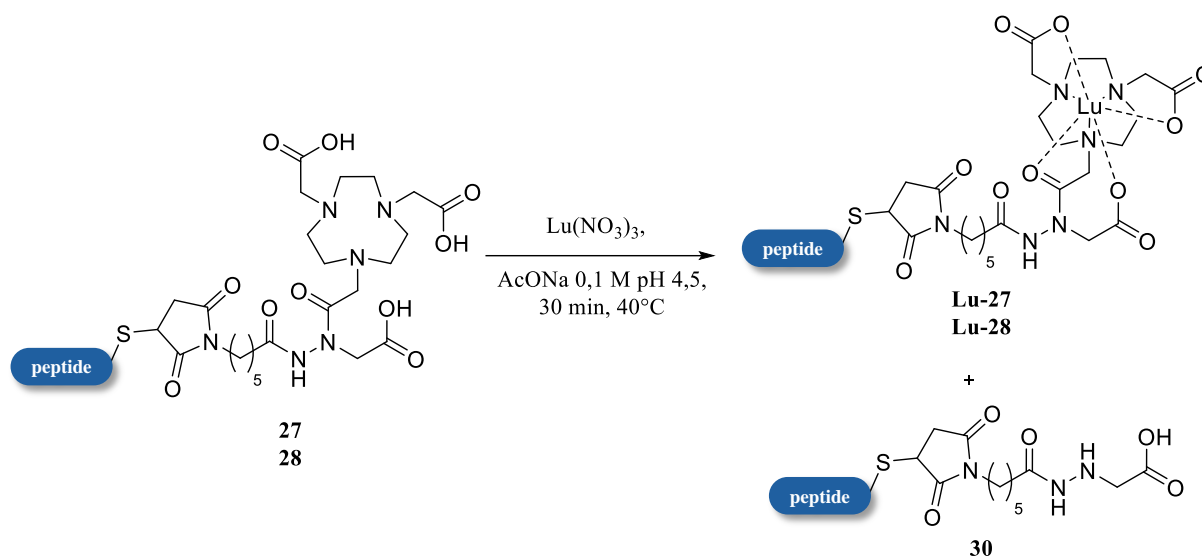


Schéma 47 : Complexation des composés **27** et **28** au lutécium (peptide = **20** pour **27**, peptide = **21** pour **28** et **31**)

5. Conclusion du chapitre

Trois agents de ciblage basés sur les motifs de reconnaissance DUPA, RGD et AF ont été développés de sorte à pouvoir être couplés par réaction de CCTM à l'ACB **NO2A-AHM**. Les composés **20**, **21** et **23a/23b** ont été synthétisés sur support solide selon la stratégie SPPS Fmoc/*t*Bu avec des rendements respectifs de 46, 42 et 15%. Les agents de ciblage **20** et **21** ont été couplés par réaction de CCTM à **NO2A-AHM** avec succès (rendement de 77% chacun). Ces résultats montrent que l'ACB **NO2A-AHM** peut être couplé à diverses agents de ciblage par chimie click. Les références froides au lutécium et à l'aluminium-fluor des composés **27** et **28** ont été obtenues et caractérisées par HPLC, HPLC-MS et RMN. En perspective, les références non radioactives pourront être utilisées pour des évaluations *in vitro* sur des modèles de cellules cancéreuses surexprimant les récepteurs PSMA et les intégrines $\alpha_v\beta_3$. En ce qui concerne l'AF, compte tenu des problèmes de synthèse lié à son couplage avec **NO2A-AHM**, des essais complémentaires seront à mener pour synthétiser le composé **29 (NO2A-AHM-Cys-O2Oc-O2Oc-AF)**. Comme décrit dans notre revue, les radiofolates utilisés en RTIV, décrits dans la littérature, présentent une forte internalisation dans les reins, ce qui peut induire de la néphrotoxicité. Pour tenter de pallier cela, il sera possible d'envisager le couplage d'une entité liant l'albumine comme un dérivé de l'acide 4-(*p*-iodophényl)butyrique par SPPS afin d'augmenter le temps de résidence dans la circulation sanguine et diminuer l'internalisation dans les reins tout en augmentant la fixation aux cellules tumorales.^[242]

CHAPITRE 5 : ÉTUDE DE RADIOMARQUAGE DU NOUVEL ACB

Dans ce chapitre dédié aux études de radiochimie, nous décrirons les résultats de radiomarquage obtenus avec les radionucléides gallium-68, fluor-18 et lutécium-177. Les radiomarquages au fluor-18 et au gallium-68 sont réalisés à Nancyclotep tandis que ceux au lutécium-177 sont réalisés au sein du service de médecine nucléaire du CHRU de Nancy qui a récemment obtenu l'autorisation de l'Autorité de Sûreté Nucléaire.

La radiochimie du gallium-68 est bien connue de la plateforme Nancyclotep.^[86,119,223] Des essais de radiomarquage du nouvel ACB **NO2A-AHM** ont été entrepris malgré les résultats de complexation au gallium-69 qui ont montré une coupure de l'ACB (Chapitre 3, Partie 2.1.). En effet, les conditions de marquage des éléments non-radioactifs étant très différentes des conditions de radiosynthèse (utilisation d'un excès de métal lors d'une complexation de l'élément non-radioactifs *vs.* un nombre d'équivalent de radiométal engagé pour la radiochimie très largement inférieur à la quantité de précurseur), il est nécessaire de réaliser la preuve que l'ACB **NO2A-AHM** n'est pas un ACB viable pour le marquage au gallium-68.

Concernant la radiochimie du fluor-18, Nancyclotep possède une forte expérience en radiofluoration par SN pour la création de liaison C-F.^[26,31,75,118,258,277] Cependant, l'équipe de radiochimistes n'a jamais exploré la radiofluoration par stratégie de complexation Al¹⁸F. Ainsi, la mise en place de la radiochimie à l'Al¹⁸F à Nancyclotep est à réaliser. Pour ce faire, la radiochimie de l'Al¹⁸F sera, dans un premier temps, réalisée avec un précurseur de radiomarquage commercial, le PSMA-11, puis sera transposée à notre ACB, le **NO2A-AHM**. Le PSMA-11 a été choisi du fait de sa disponibilité commerciale et de son radiomarquage antérieure au gallium-68 par l'équipe de Nancyclotep.

Une collaboration avec le Pr Thierry Bastogne a été mise en place au cours de cette thèse pour l'étude d'optimisation du radiomarquage par stratégie Al¹⁸F. Il est professeur au laboratoire CRAN (UMR CNRS-UL 7034), mais également co-fondateur et expert scientifique de la start-up CYBERNANO, spécialisée dans les plans d'expériences et les études en *quality by design* (QbD) pharmaceutique (ICH Q8-R2) pour aider les entreprises pharmaceutiques à développer plus rapidement des médicaments innovants de meilleure qualité.

1. Mise en place de la radiochimie de l'Al¹⁸F sur automate de synthèse AllInOne (Trasis)

1.1. État de l'art du radiomarquage Al¹⁸F

L'analyse bibliographique de cette stratégie de radiomarquage à l'Al¹⁸F montre que majoritairement, les auteurs décrivent des radiosynthèses en mode manuel. Seul sept articles de la littérature présentent des radiosynthèses automatisées sur des automates AllInOne[®] (AIO[®]) (Trasis), SynthraFCHOL (Synthra), TracerLabTM FXFN (GE) et CFN-MPS200 (Sumitomo Heavy Industries).^[103,109,278–282]

La radiosynthèse par stratégie Al¹⁸F se décompose en trois grandes étapes :

- La préparation du fluor-18 (Figure 68, étape 1) qui consiste à éliminer l'eau enrichie et les impuretés en produisant du [¹⁸F]NaF.
- Le radiomarquage du précurseur (Figure 68, étape 2) ; étape clé au cours de laquelle le fluor-18 est incorporé dans la molécule d'intérêt.
- La purification du radiotracer incluant une étape de formulation afin de rendre injectable le [¹⁸F]AlF-radiotracer (Figure 68, étape 3).

Afin d'évaluer la performance de chaque radiosynthèse, le RRC est calculé. La Figure 68 montre comment est calculé le rendement de chacune des trois étapes. Le RRC correspond au produit des efficacités d'accrochage (EA) du fluor-18, d'élution (EE) du [¹⁸F]NaF, du TCRC, ainsi que de l'efficacité de purification (EP) par extraction en phase solide (SPE) selon la formule (E11) :

$$RRC = (EA \times EE \times TCRC \times EP) \times 100 \quad (E11)$$

Le RRC peut également être déterminé par le ratio de l'activité finale obtenue par rapport à l'activité initiale engagée dans la radiosynthèse. Chaque étape clé va impacter le RRC. L'étape 3 est cruciale, puisqu'un bon TCRC permet l'obtention d'un bon RRC. Après purification, il est possible de mesurer la pureté radiochimique (PRC) par radio-HPLC et radio-chromatographie sur couche mince (radio-CCM) afin de vérifier que l'étape de purification a bien fonctionné.

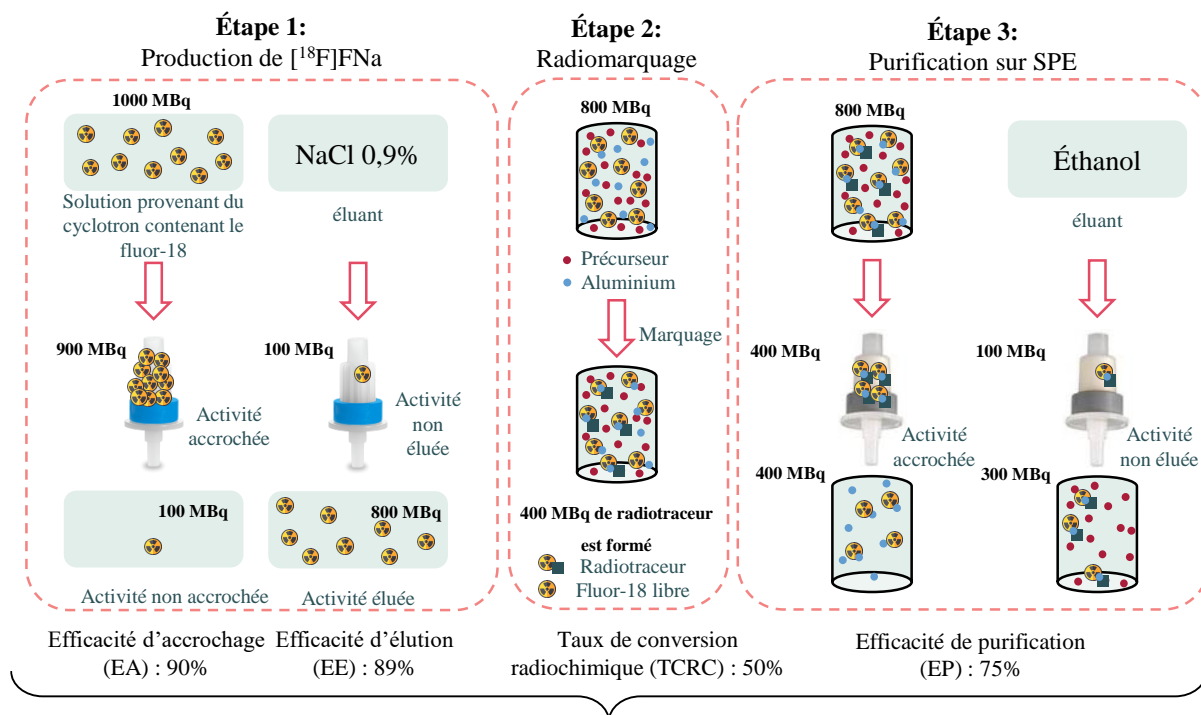


Figure 68 : Description d'un procédé de radiomarquage à l' Al^{18}F permettant l'explication du TCRC et du RRC (toutes les valeurs d'activité sont corrigées de la décroissance)

1.2. Objectif

La radiochimie à l' Al^{18}F est une technique de radiomarquage par chimie de complexation très en vogue dans la littérature. L'objectif est de développer une technique de radiomarquage robuste, puis la transposer en mode automatique sur l'automate de radiosynthèse AIO[®] (Trasis) de la plateforme Nancyclotep. Afin de mettre en œuvre une technique de radiomarquage robuste, nous avons fait le choix d'utiliser la méthode d'analyse des plans d'expériences afin d'étudier la significativité de chaque facteur et déterminer leur niveau optimal en vue du développement de cette technique de radiomarquage. Ce développement a été réalisé dans un premier temps avec un précurseur de marquage connu de la littérature et déjà étudié pour le radiomarquage à l' Al^{18}F , le PSMA-11. Ce précurseur de marquage présente une cage chélatante acyclique HBED-CC couplée à un motif de reconnaissance du PSMA (voir Chapitre 4 partie 2.1.). Afin de mettre rapidement en place la radiosynthèse à l' Al^{18}F et étudier indépendamment les différentes étapes du radiomarquage, une première étude en mode manuel est réalisée. Cette étude a pour but de faciliter, dans un second temps, l'implémentation du radiomarquage en mode automatique.

1.3. L'analyse statistique en Radiochimie

L'étape de la radiosynthèse sur laquelle l'optimisation prend le plus de temps, est l'étape de radiomarquage puisque que cette dernière est celle qui implique le plus de facteur à évaluer. La méthode d'optimisation la plus commune, que ce soit en radiochimie ou d'en d'autres domaines comme la chimie, est la méthode dites OVAT (One Variable At a Time). Elle consiste à fixer tous les paramètres sauf un qui restera variable, afin de visualiser son influence sur la réponse étudiée. Cette méthode possède l'avantage d'être simple à mettre en place et permet d'obtenir des résultats facilement interprétables. Cependant, cette méthode est chronophage en temps et en nombre d'essais. De plus, elle nécessite de devoir préalablement fixer des paramètres de manière arbitraire sans qu'ils aient été évalués auparavant. C'est le cas par exemple des travaux de l'équipe de Vogg sur le radiomarquage par stratégie $Al^{18}F$ de l'agent chélatant NODA.^[230] Cette équipe a étudié par la méthode OVAT l'impact de la nature du co-solvant, le taux d'éthanol dans le milieu réactionnel, le pH du tampon, la température et le temps de radiomarquage sur le RRC. De ce fait, l'équipe a montré que la présence d'un co-solvant, permet d'augmenter significativement le RRC, de 30 et 70% en remplaçant 50% du milieu par du CH_3CN et $EtOH$ respectivement. De plus, plus la concentration en $EtOH$ est élevé et plus le RRC obtenu est élevé. Un optimum à pH 4,8 a également été reporté. Pour chacun de ces facteurs, une étude indépendante a été menée, ce qui a conduit à l'obtention de conclusions sur l'influence de chaque paramètre pour des conditions données. Outre le manque de précision statistique de cette méthode, une autre limite est l'impossibilité de détecter des effets synergiques entre plusieurs facteurs.

Une autre méthode d'optimisation suscitant de plus en plus d'intérêt est la méthodologie des plans d'expériences (*Design of Experiments*, DoE).^[283] Elle consiste à traiter tous les facteurs de la même manière, peu importe leurs unités. En faisant varier tous les facteurs à étudier à la fois, le nombre de tests à réaliser par étude est réduit et le domaine d'étude est exploré dans son intégralité.

Ainsi, cette méthodologie d'optimisation en radiochimie fut utilisée en 2018 par l'équipe de Luxen pour l'optimisation du radiomarquage au gallium-68 du NOTA-PRGD2 et NODAGA-PRGD2.^[240] En parallèle de ces travaux, l'équipe de Maurer utilisa la méthode DoE pour optimiser le marquage par radiofluoruration catalysé au cuivre de différents composés comme des arylstannanes^[284] et aussi l'Olaparib et Talazoparib, utilisés pour le ciblage des protéines PARP (poly(ADP-ribose) polymérase) surexprimées par de nombreux types de cancers.^[285,286]

L'utilisation de la méthode DoE pour le radiomarquage d'arylstannanes leur a permis de réaliser une étude comportant 36 essais (19 essais pour un plan de criblage permettant d'évaluer six facteurs, suivis de 17 essais pour un plan d'optimisation étudiant trois facteurs) contre 74 essais minimum réalisés par l'équipe de Makaravage *et al.* pour une étude similaire en utilisant la méthode OVAT.^[287] Cette étude leur a permis d'obtenir un TCRC de $58 \pm 5,3\%$ ($n = 4$).

La Figure 69 permet de mieux visualiser le balayage complet du domaine d'étude dans le cas de la méthode DoE, ce qui n'est pas le cas pour la méthode OVAT.

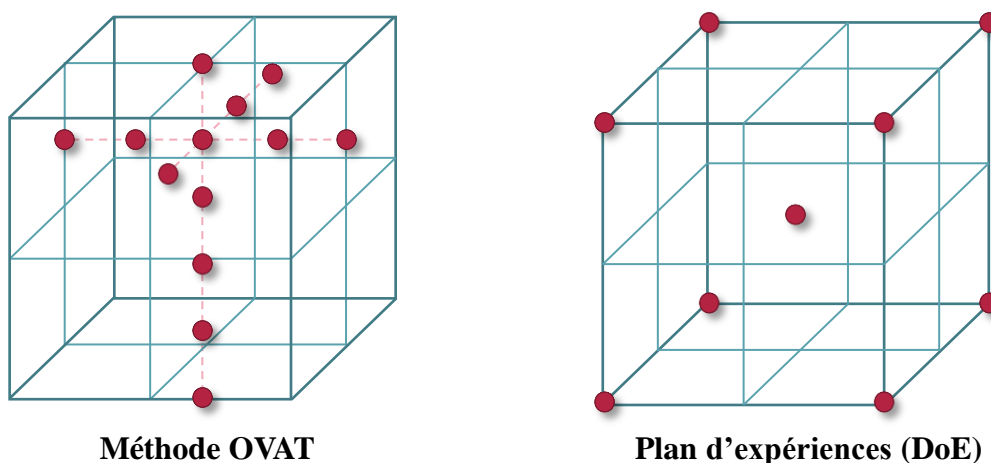


Figure 69 : Schématisation d'une étude selon la méthode OVAT ou DoE

Afin construire un plan d'expériences robuste, il est nécessaire de définir :

- Les facteurs de l'étude, c'est-à-dire les paramètres qui exerceront une influence sur la réponse.
- Le domaine de valeur qui doit être établi au préalable de l'étude pour chaque facteur (*i.e.*, la température de radiomarquage de 20°C à 90°C).
- La réponse, qui correspond à la donnée de sortie que l'on souhaite optimiser (*i.e.*, un rendement).

L'objectif du plan d'expériences est de déterminer un domaine dans lequel les facteurs choisis permettent d'atteindre une valeur cible à atteindre pour la réponse à étudier (*i.e.*, rendement > 80%). L'analyse des facteurs étudiés permet de déterminer si le facteur a un impact ou non sur la réponse, c'est-à-dire, si en faisant varier ce paramètre, la valeur du résultat obtenu change. Si lorsque l'on augmente la valeur codée du facteur, la valeur de la réponse augmente également, alors il est dit que ce facteur a un effet positif. Si la réponse diminue, alors ce même facteur a

un effet négatif. Un facteur ayant un effet quadratique signifie que l'impact de ce facteur présente un ou plusieurs optimums dans le domaine étudié.

Il existe deux catégories principales de plans d'expériences :

- Des plans de criblage, qui permettent d'évaluer des facteurs dont l'impact n'est pas connu. Ils sont utilisés pour évaluer de nombreux facteurs (>5) très rapidement pour savoir lesquels pourraient avoir un impact ou non sur la réponse. Les plans de Plackett et Burman sont des exemples de plans de criblage où les seules conditions testées sont les extrémités du domaine (Figure 70).
- Des plans d'optimisation, aussi appelés plans de surface de réponse, qui sont utilisés après les plans de criblage ou toutes autres études préalables (*i.e.*, étude préalable par méthode OVAT). Ils sont utilisés afin de trouver les meilleures conditions permettant d'atteindre la valeur ciblée de la réponse. Ces plans s'effectuent sur un nombre réduit de facteurs (4 maximum) et permettent d'obtenir des informations bien plus précises que les plans de criblage. Il est ainsi possible de savoir si un facteur a un effet quadratique ou si des paramètres interagissent entre eux (*i.e.*, pour des valeurs faibles d'un facteur 1, le facteur 2 aura un effet positif alors que pour des valeurs élevées du facteur 1, le facteur 2 aura un effet négatif sur la réponse). Les plans composites, de Box-Behnken ou de Doehlert sont des exemples de plans d'optimisation (Figure 70).

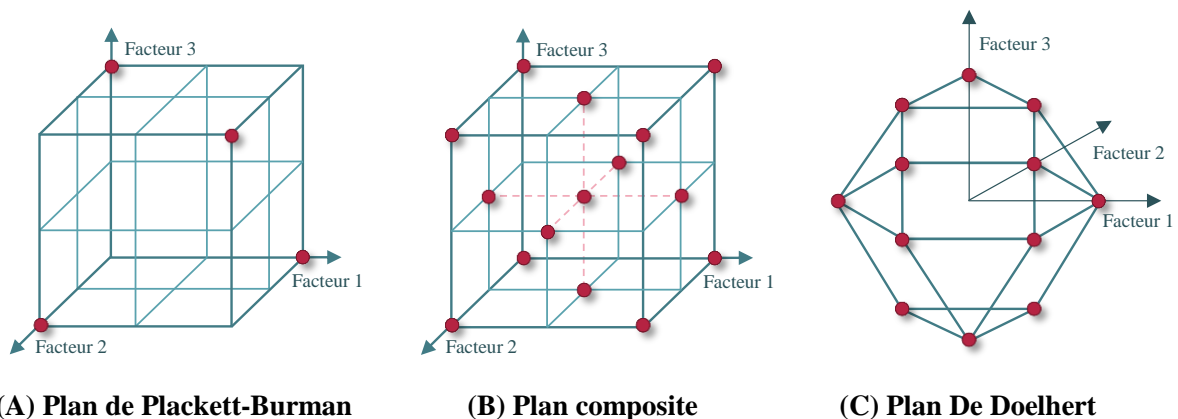


Figure 70 : Exemples de plans d'expériences. (A) plan de Plackett-Burman, (B) Plan central composite, (C) Plan de Doehlert

En plus de donner plus d'informations sur l'impact des facteurs, les plans d'optimisation permettent de composer des cartes prédictives de la réponse. Elles indiquent les valeurs théoriques moyennes à choisir pour chaque facteur, de manière à obtenir une valeur de réponse la plus proche possible de la cible. Il existe de nombreux plans de surface de réponse qui sont

tous équivalents en termes de robustesse et de prédiction du modèle mathématique. Ainsi, le choix du plan se fait en fonction des contraintes de l'utilisateur. Par exemple, le coût et le temps d'un test peuvent être des facteurs impactant le choix du plan. Un plan central composite, de Box-Behnken, de Doehlert et de Hartley nécessitent 25, 27, 21 et 14 tests, respectivement, pour quatre facteurs. Lors du choix d'un plan, il faut également choisir comment la reproductibilité des résultats va être évaluée. Trois stratégies sont possibles :

- Réaliser un duplicat ou triplicat de tous les points expérimentaux.
- Réaliser cinq réplicats du point central du plan et extrapoler les résultats obtenus sur l'ensemble du domaine.
- Réaliser un triplicat de quelques points du domaine et extrapoler les résultats obtenus sur l'ensemble du domaine.

Un plan d'expériences est toujours associé à un modèle mathématique qui se traduit par une régression linéaire sous forme d'une équation polynomiale (E12) :

$$Y = b_0 + b_1u_1 + b_2u_2 \quad (E12)$$

avec Y : la réponse, u_1 et u_2 , les facteurs et b_0 , b_1 et b_2 les coefficients (cas d'un plan de criblage à deux facteurs)

Après réalisation des essais, l'équation peut être résolue. En d'autres termes, les valeurs des coefficients b caractérisant les effets additifs de facteur sur la réponse sont obtenus. Si le coefficient est négatif, le facteur a un impact négatif, et inversement. Plus la valeur absolue est grande, et plus le facteur a un impact fort sur la réponse et inversement.

Dans le cas des plans de surface de réponse, pour estimer la qualité de la régression linéaire, les coefficients de détermination R^2 et R^2 ajusté sont calculés. Le R^2 , représentant la variabilité de la réponse expliquée par le modèle, est toujours compris entre 0 et 1. Un R^2 proche de 1 signifie que le modèle est bon pour expliquer la variation de la réponse en fonction des valeurs des facteurs. Au contraire, si le R^2 du modèle est proche de 0, la réponse n'est pas bien expliquée par le modèle. Le R^2 ajusté est également un indice de la qualité du modèle, et est calculé à partir du R^2 . L'intérêt de ce second indice est de prendre en compte la complexité du modèle. Dans le cas des cartes prédictives, plus le modèle sera fiable, et plus sa prédiction le sera également. Ainsi, un plan de validation doit être effectué pour vérifier la robustesse du modèle mathématique obtenu par le plan d'optimisation. Cette validation consiste à réaliser des essais à partir des meilleures conditions prédites ou choisies de manière aléatoire dans le domaine d'étude, puis de comparer les valeurs des réponses théoriques prédites par le modèle et expérimentales.

Les plans d'expériences s'insèrent parfaitement dans une démarche dite de QbD. Le concept du QbD est couramment utilisé dans le secteur pharmaceutique. Dans ce contexte, le QbD est une approche qui vise à optimiser de manière proactive la qualité des médicaments en utilisant des méthodes statistiques, analytiques et de gestion des risques dans la conception, le développement et la fabrication des médicaments. Cette approche vise (1) à repérer toutes les sources de variabilité affectant un procédé et son produit, (2) identifier les plus critiques, et (3) déterminer les plages de valeur de ces derniers dans lesquelles la probabilité de vérifier les exigences du cahier des charges sont acceptables. Il est centré sur l'utilisation d'analyses multivariées afin d'identifier et de comprendre des paramètres critiques du processus de fabrication. Cette démarche est résumée dans la Figure 71.

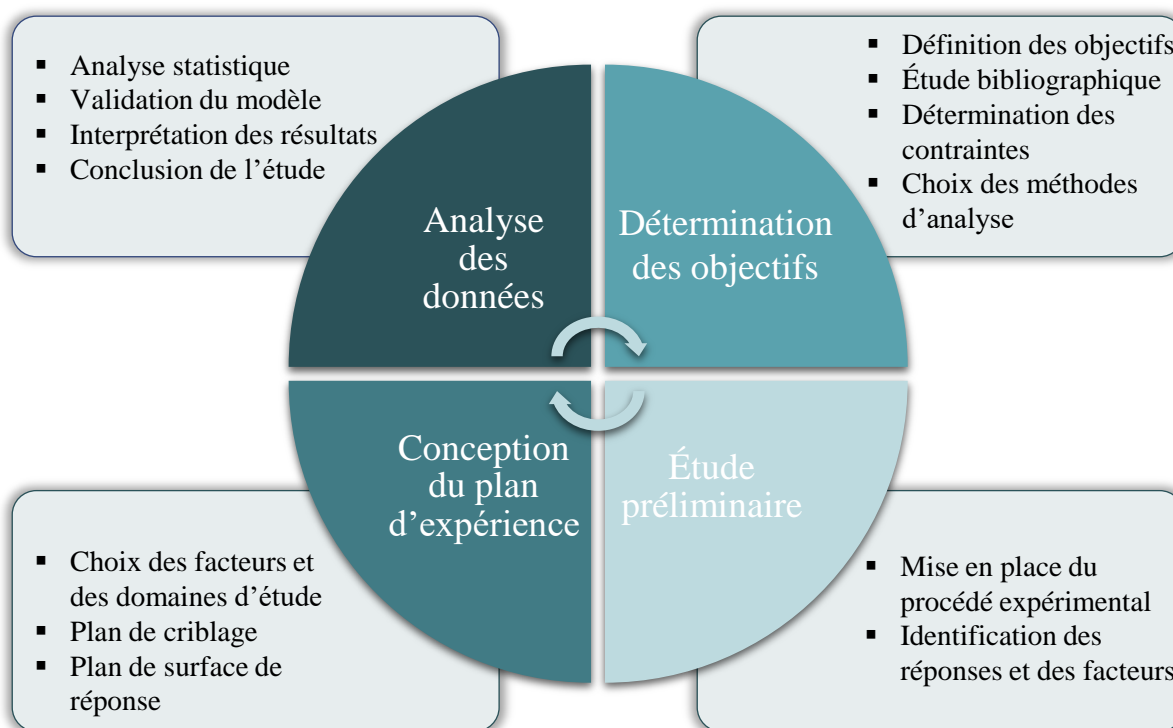


Figure 71 : Cycle du QbD pharmaceutique

Dans le cadre de notre projet, les plans d'expériences et l'analyse QbD sont utilisés pour mettre en place la radiochimie de l' $Al^{18}F$. Cependant, elle nécessitera d'identifier les facteurs d'influence sur le TCRC et de déterminer les méthodes d'analyse pour la quantification du TCRC.

1.4. Conditions d'analyse

Afin de pouvoir valider le TCRC de l'étape de radiomarquage du PSMA-11, il faut au préalable définir les méthodes d'analyse du brut de radiomarquage. En radiochimie, deux types

d'analyses chromatographiques sont communément utilisés : une CCM analysée à l'aide d'un lecteur radio-CCM et, l'HPLC utilisant un détecteur de radioactivité (radio-HPLC). Ces deux techniques permettent, en fonction des conditions d'analyse, de séparer le fluor-18 libre et le radiotracer $[^{18}\text{F}]\text{AIF-PSMA-11}$, le premier étant un composé inorganique, le second, un composé organique.

1.4.1. Analyse du radiomarquage par chromatographie sur couche mince (CCM)

Trois articles de la littérature présentent des conditions d'élution CCM pour des radiotraceurs marqués à l' Al^{18}F (Tableau 25).

Tableau 25 : Conditions d'analyse CCM référencées dans la littérature pour l'analyse du $[^{18}\text{F}]\text{AIF-PSMA-11}$ ^[105,279,288]

Phase stationnaire	Phase mobile	Références
ALUGRAM® SIL G/UV ₂₅₄	CH ₃ CN/H ₂ O (25/75, v/v)	[105]
iTLC-SG	NH ₄ OAc 1 M/MeOH (1/1, v/v)	[284]
ALUGRAM® RP-C18/UV ₂₅₄	CH ₃ CN/H ₂ O (7/3, v/v)	[275]

Une analyse radio-CCM, utilisant les deux premières conditions d'analyse, est effectuée sur du $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$, $[^{18}\text{F}]\text{AIF}$ et du brut réactionnel du radiomarquage de $[^{18}\text{F}]\text{AIF-PSMA-11}$. Avec ces conditions, les pics correspondant au fluor-18 libre et au radiotracer se superposent, rendant impossible l'utilisation de ces conditions pour notre étude. Cependant, en faisant varier le ratio CH₃CN/H₂O à 60/40 (v/v), une séparation correcte des deux espèces est obtenue (Tableau 26). Deux pics avec un rapport frontal (Rf) de 0,2 et 0,8 sont observables pour le $[^{18}\text{F}]\text{AIF}$ et le radiotracer, respectivement. Une élution dans ces conditions du $[^{18}\text{F}]\text{AIF-PSMA-11}$ post-purification, nous confirme que le pic avec le Rf de 0,8 correspond bien au radiotracer.

Tableau 26 : Analyses radio-CCM de $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$, $[^{18}\text{F}]\text{AIF}$ et $[^{18}\text{F}]\text{AIF-PSMA-11}$

Conditions d'élution radio-CCM	Rapport frontal (Rf)		
	$[^{18}\text{F}]\text{NaF}$	$[^{18}\text{F}]\text{AIF}$	$[^{18}\text{F}]\text{AIF-PSMA-11}$
iTLC-SG, NH ₄ OAc 1 M/MeOH (1/1, v/v)	0,9	0,8	0,9
ALUGRAM® SIL G/UV ₂₅₄ , CH ₃ CN/H ₂ O (75/25, v/v)	0,1	0,1	0,1
ALUGRAM® SIL G/UV ₂₅₄ , CH ₃ CN/H ₂ O (60/40, v/v)	0,3	0,2	0,8

1.4.2. Analyse du radiomarquage par Chromatographie Liquide (CL)

En complément de l'analyse par radio-CCM, nous avons mis en place une analyse par CL. Cette technique à l'avantage de permettre l'identification chimique du radiotracer.

Nous avons décidé d'utiliser une méthode analytique décrite dans la pharmacopée européenne pour le [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, à savoir l'utilisation d'une colonne HPLC C18 (150 x 3,0 mm, 3 μm), avec un palier isocratique (0,5 min) à 5% de B, suivi d'un gradient de 5 à 40% de B en 10 min à un débit de 0,6 mL/min (phase mobile A : H_2O , 0,1% TFA, B : CH_3CN , 0,1% TFA) sur une chaîne HPLC Alliance Waters. Après analyse du brut de radiomarquage par radio-HPLC, un pic à t_R : 1,60 min correspondant au [^{18}F]NaF, et un pic à t_R : 6,85 min correspondant au [^{18}F]AlF-PSMA-11 sont observés. (Figure 72).

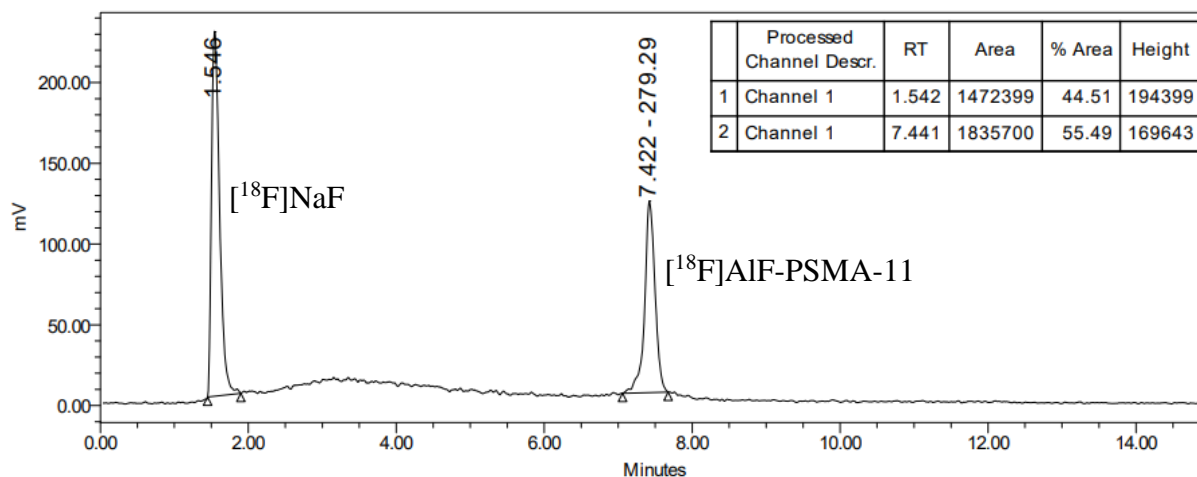


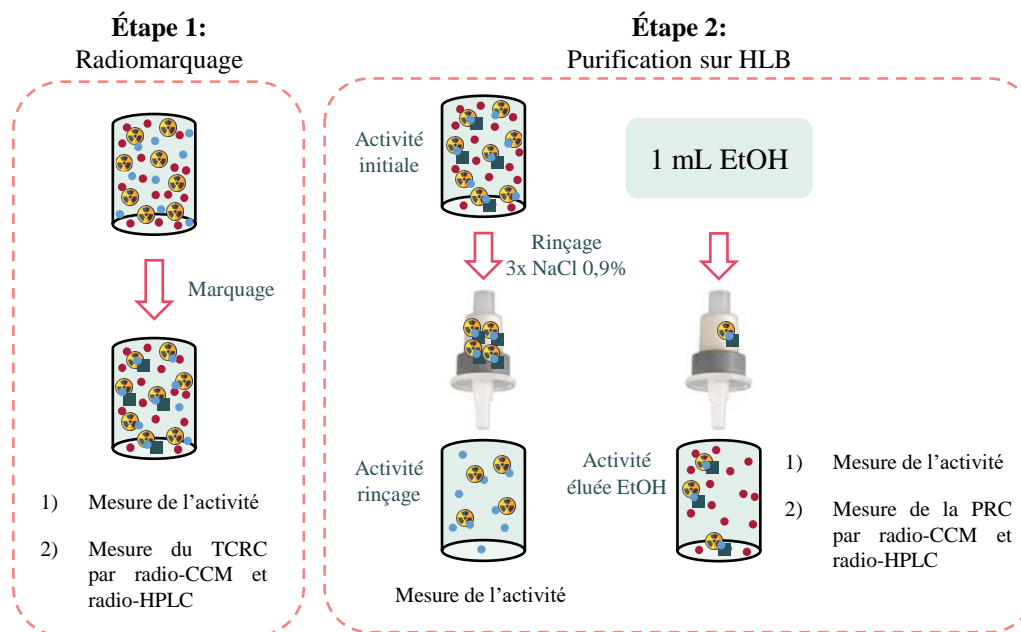
Figure 72 : Chromatogramme radio-HPLC d'un brut réactionnel de radiomarquage du [^{18}F]AlF-PSMA-11

1.4.3. Comparaison des deux techniques d'analyse

Afin de valider la conformité des résultats obtenus avec les précédentes techniques d'analyse, les TCRC calculés par radio-CCM et radio-HPLC sont comparés aux données d'activités obtenues lors de l'étape de purification. En effet, par séparation physique des composés [^{18}F]NaF et [^{18}F]AlF-PSMA-11, une appréciation exacte de leurs proportions relatives être obtenue.

La purification est réalisée par SPE sur cartouche de phase hydrophile HLB (Hydrophobic-Lipophilic Balance). Son efficacité est déterminée en mesurant les activités de la solution de radiomarquage (brut réactionnel), de la solution éluée lors de l'accrochage sur la cartouche et

après élution par de l'éthanol (Figure 73). Les mesures d'activité permettent de déterminer les proportions d'activité correspondant au $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ et au $[^{18}\text{F}]\text{AlF-PSMA-11}$.



$$A_{[^{18}\text{F}]\text{NaF}} = \frac{A_{\text{rinçage}}}{A_{\text{initiale}}} \quad \text{et} \quad A_{[^{18}\text{F}]\text{AlF-PSMA-11}} = \frac{A_{\text{élution EtOH}}}{A_{\text{initiale}}}$$

Figure 73 : Représentation schématique des étapes réalisées pour la purification sur HLB permettant la comparaison des méthodes d'analyse (avec PRC : pureté radiochimique)

Le Tableau 27 présente les résultats chromatographiques (radio-CCM et radio-HPLC) et leur comparaison aux résultats de détermination d'activité obtenus lors des tests de purification.

Tableau 27 : Mesure d'activité d'un radiomarquage du PSMA-11 par Al^{18}F par radio-CCM, radio-HPLC et purification

Méthode d'analyse	Composé	Test 1	Test 2
Purification	$[^{18}\text{F}]\text{NaF}$	32%	9%
	$[^{18}\text{F}]\text{AlF-PSMA-11}$	68%	91%
Radio-CCM	$[^{18}\text{F}]\text{NaF}$	31%	4%
	$[^{18}\text{F}]\text{AlF-PSMA-11}$	69%	96%
Radio-HPLC	$[^{18}\text{F}]\text{NaF}$	68%	85%
	$[^{18}\text{F}]\text{AlF-PSMA-11}$	32%	15%

Conditions : **Test 1** : Étape 1 : $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ (45 MBq), AlCl_3 (2 mM, 1 équiv.), tampon NaOAc pH 4,4 0,14 M/EtOH (1/5, v/v), 5 min, TA, Étape 2 : PSMA-11 (1 mg/mL, 1 équiv.), 15 min, 50°C ; **Test 2** : Étape 1 : $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ (45 MBq), AlCl_3 (2 mM, 0,75 équiv.), tampon NaOAc pH 4,4 0,14 M/EtOH (15/85, v/v), 5 min, TA. Étape 2 : PSMA-11 (1 mg/mL, 1 équiv.), 15 min, 50°C.

La mesure d'activité de la solution éluée lors de l'accrochage, correspondant au fluor-18 libre (32 et 9% pour les tests 1 et 2, respectivement), correspond à l'aire du pic du fluor-18 libre observée par radio-CCM (31 et 4% pour les tests 1 et 2, respectivement). Cependant, la valeur d'activité mesurée est différente de l'aire du pic de fluor-18 libre observée par radio-HPLC (68

et 85% pour les tests 1 et 2, respectivement). Cela laisse penser que la méthode radio-HPLC n'est pas adaptée pour l'analyse de nos échantillons. Il est à noter que sur l'analyse radio-CCM et radio-HPLC, seuls deux pics sont visibles, comme décrits dans les parties ci-dessus.

Pour des mêmes conditions de radiomarquage, des TCRC complètement différents sont obtenus en fonction des méthodes d'analyse radio-CCM ou radio-HPLC. Ces résultats nous laissent penser que l'analyse radio-CCM offre une observation de la réalité conforme puisque des résultats similaires sont obtenus avec la méthode de purification par HLB, qui est robuste et couramment employée par de nombreuses équipes de recherche.

De plus, une mesure de la PRC après purification est réalisée par radio-CCM et radio-HPLC (Annexe 20). L'analyse radio-CCM montre une PRC de 100% contre 28 et 38% en radio-HPLC pour les deux tests réalisés. Ces résultats par radio-HPLC sont incohérents et laisseraient suggérer une décomplexation au sein de la colonne analytique. Le suivi du radiomarquage est communément réalisé au sein des équipes de radiochimie par radio-CCM par rapport à des mesures par radio-HPLC puisque cette méthode permet de mieux refléter la réalité.

1.4.4. Optimisation de la méthode d'analyse par chromatographie liquide

1.4.4.1. Comparaison des conditions d'analyse par chromatographie liquide

Afin de tenter d'évaluer le TCRC par CL, d'autres conditions d'analyse sont testées, telles qu'une autre chaîne analytique présente à Nancyclotep. Cette chaîne est une UHPLC NEXERA LC40 XS (Shimadzu) (Chromatographie liquide ultra haute performance) sur laquelle des colonnes analytiques possédant une porosité inférieure à 2 μm et de courtes tailles (5 cm) peuvent être employées, induisant une pression pouvant atteindre 1050 bars dans le système. Ces tests ont consisté à évaluer l'impact de la chaîne analytique (Entrées 1 et 2, HPLC vs. UHPLC, Tableau 28), l'influence de la colonne C18 (Entrée 3, Tableau 28), des phases mobiles avec ou sans TFA (Entrée 1 et 4, Tableau 28) et la mise en place d'une méthode UHPLC de 4,5 min (Entrée 5, Tableau 28) afin d'étudier si le phénomène de décomplexation peut être limité. Le produit étudié est du [^{18}F]AIF-PSMA-11 obtenu après purification sur cartouche HLB (analyse radio-CCM : 100% de PRC).

Tableau 28 : Analyse du [¹⁸F]AIF-PSMA-11 après purification sur HLB avec plusieurs conditions HPLC et UHPLC différentes (analyse radio-CCM : 100% de PRC)

Entrée	Chaîne analytique	Colonne	Conditions d'analyse	PRC (%)
1	HPLC Waters	ACE Avantor C18	0,5 min 5%B, 5-40%B en 10 min H ₂ O, 0,1% TFA, B : CH ₃ CN, 0,1% TFA	28
2	UHPLC Shimadzu	ACE Avantor C18	0,5 min 5%B, 5-40%B en 10 min H ₂ O, 0,1% TFA, B : CH ₃ CN, 0,1% TFA	32
3	HPLC Waters	Symmetry C18	0,5 min 5%B, 5-40%B en 10 min H ₂ O, 0,1% TFA, B: CH ₃ CN, 0,1% TFA	13
4	HPLC Waters	ACE Avantor C18	0,5 min 5%B, 5-40%B en 10 min H ₂ O, B : CH ₃ CN	38
5	UHPLC Shimadzu	ACE Avantor excel2 superC18	0,5 min 5%B, 5-40%B en 4,5 min H ₂ O, 0,1% TFA, B: CH ₃ CN, 0,1% TFA	93

Les résultats obtenus pour les Entrées 2-4 (13% < PRC < 38%, Tableau 28) sont similaires à ceux de nos conditions initiales (Entrée 1, Tableau 28), hormis l'analyse réalisée par radio-UHPLC avec une colonne ACE Avantor excel2 superC18 (Entrée 5, Tableau 28) où une PRC de 93% est obtenue. Cela prouve que l'emploi d'une autre colonne C18 (*i.e.*, passage de ACE Avantor C18 à ACE Avantor excel2 superC18) induisant un temps d'analyse plus court, permet d'avoir un résultat cohérent avec celui obtenu en radio-CCM (PRC de 100%). Notons également que pour des conditions d'analyse sans TFA (Entrée 4 vs. Entrée 1, Tableau 28), une amélioration du TCRC de 10% est observée ; laissant penser que l'acidification des phases mobiles peut avoir un impact sur le résultat par radio-HPLC.

À la vue de ces résultats, nous avons décidé d'utiliser la méthode radio-UHPLC (Entrée 5, Tableau 28) pour analyser la réaction puisque le résultat est cohérent avec celui de la radio-CCM, bien qu'inférieur de 8%. En UHPLC, vu que le temps d'analyse est plus court, cela raccourcit le temps de passage du radiotracer sur la colonne et peut expliquer la diminution de la décomplexation du [¹⁸F]AIF-PSMA-11. De plus, l'étude de Lütje *et al.* a montré que la stabilité du [¹⁸F]AIF-PSMA-11 dépend du milieu.^[289] En effet, après 3 heures dans l'eau, la PRC n'est que de 64,5%, tandis qu'elle est de 98,5% dans un tampon NH₄OAc.

1.4.4.2. Influence de l'éthanol

L'influence du taux d'EtOH dans l'échantillon a été étudiée puisqu'un impact sur le résultat radio-UHPLC est observé, à l'inverse de la radio-CCM. En effet, nous avons constaté que pour un radiomarquage avec 80% d'EtOH, l'analyse du TCRC par radio-UHPLC, en utilisant le brut

réactionnel et le brut dilué deux fois (*i.e.*, 40% d'EtOH), montre une valeur supérieure pour l'échantillon dilué. Cependant, lorsque le radiomarquage est réalisé avec 50% d'EtOH, l'analyse radio-UHPLC donne la même valeur du TCRC, que nous utilisons le brut réactionnel ou le brut dilué deux fois (Figure 74).

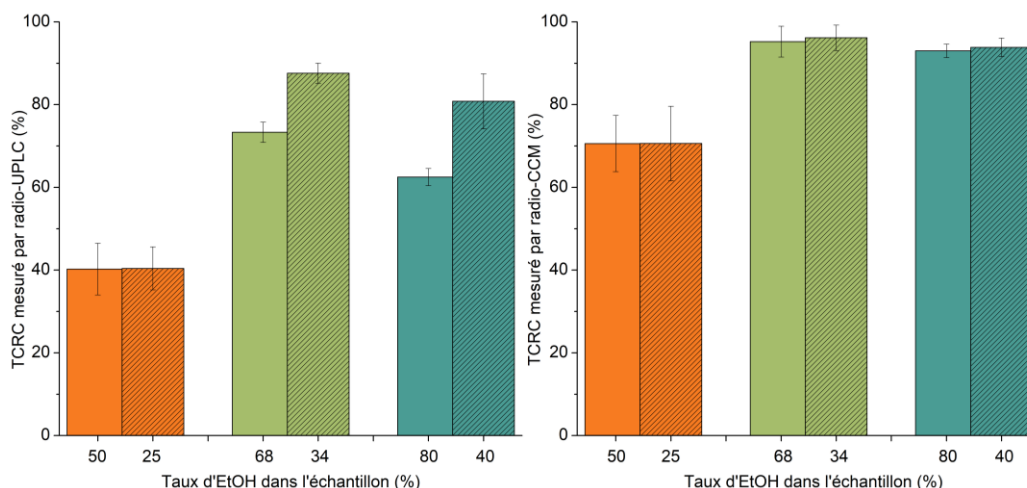


Figure 74 : Impact du taux d'EtOH présent dans les échantillons (brut réactionnel ou brut dilué deux fois avec de l'eau) sur la mesure du TCRC par **A**) radio-UHPLC et **B**) radio-CCM (n = 3)

Il est fort probable qu'un taux d'EtOH trop important (*i.e.*, > 50%) dans l'échantillon empêche l'accrochage de l'intégralité du radiotraceur formé sur la colonne UHPLC, faisant qu'une partie du radiotraceur sort dans le pic d'injection, donc au même endroit que le fluor-18 libre, induisant ainsi une sous-estimation du TCRC.

Partant de cette supposition, nous avons décidé d'utiliser la méthode radio-CCM, consistant à utiliser une plaque de silice avec un éluant CH₃CN/H₂O (60/40, v/v), ainsi qu'une méthode radio-UHPLC (Entrée 5, Tableau 28) pour l'analyse des bruts réactionnels et post-purification avec des échantillons n'excédant pas un taux d'EtOH de plus de 50%.

1.5. Radiosynthèse du PSMA-11

Dans cette partie, les trois étapes du radiomarquage à l'Al¹⁸F d'un radiotraceur seront étudiées successivement. Dans la littérature, des radiomarquages en mode manuel et automatique, à l'aide de module de radiosynthèse, ont été décrits, et ces deux modes de radiomarquage seront évalués dans le cadre de notre étude.

Le radiomarquage en mode manuel consiste à réaliser les différentes étapes du processus à la main, à l'aide de micropipettes pour le prélèvement et d'un ThermoMixer® pour l'étape de

chauffage et d'agitation. La Figure 75 montre les différentes étapes du radiomarquage en mode manuel.

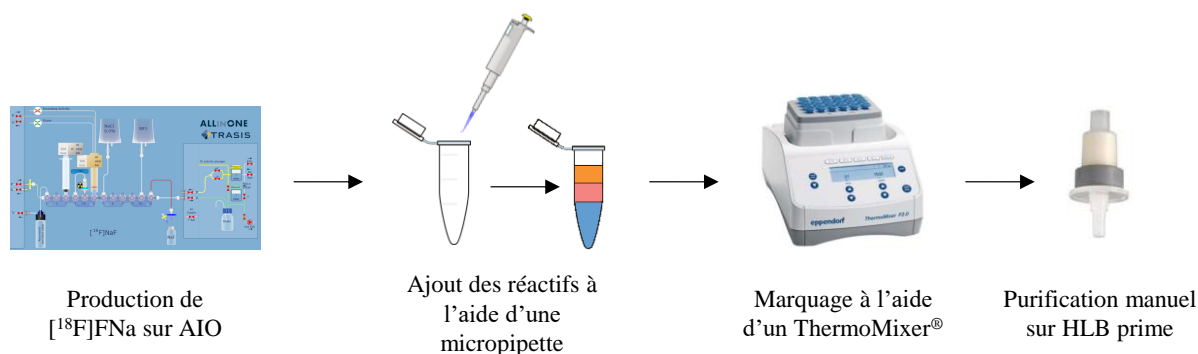


Figure 75 : Schématisation du procédé de radiosynthèse en mode manuel

Le mode automatique consiste, pour sa part, en l'utilisation d'un automate de synthèse radiochimique, en l'occurrence, le module AIO® de Trasis. Les deux grands avantages de l'automatisation sont i) de pouvoir travailler avec des activités beaucoup plus importantes, et ii) de permettre une bonne radioprotection de l'utilisateur puisque le temps de manipulation des sources radioactives est significativement réduit. De plus, l'automatisation permet un transfert des radiosynthèses pour des études précliniques et cliniques et assure une bonne reproductibilité et répétabilité des radiosynthèses. Afin de construire l'automatisation de la radiosynthèse, des essais préliminaires sont nécessaires afin d'évaluer les diverses contraintes techniques.

Une radiosynthèse est réalisée à l'aide d'une cassette composée de tous les éléments nécessaires à la radiosynthèse. Cette cassette, placée sur le module, est constituée de i) 3 manifolds à 6 voies chacun, placés sur les positions 1 à 18, qui possèdent des vannes 3 voies pouvant être ouvertes à l'aide de moteurs rotatifs, ii) 2 seringues permettant de prélever des solutions dans des flacons ou des poches à l'aide de pousses-seringues, iii) un réacteur placé dans un four pour la réalisation de l'étape de radiomarquage et iv) cartouches de SPE pour la réalisation de l'étape de purification.

1.5.1. Évaluation de l'étape de préparation du $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ de la QMA

La première étape consiste en **la préparation du fluor-18**. Dans la littérature, la majorité des auteurs réalisent une production de $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ comme espèce active pour la production de radiotraceurs marqués par la stratégie Al^{18}F .^[87,89,103–105,108,110,216,279,290] Cette étape permet d'éliminer l'eau enrichie, nécessaire à la production du fluor-18 par le cyclotron, ainsi que les

impuretés potentiellement formées au cours du bombardement de la cible. Elle consiste à i) accrocher l'ion $[^{18}\text{F}]\text{fluorure}$ sur une cartouche échangeuse d'anions QMA (ammonium quaternaire méthylé), 2) éliminer l'eau enrichie, puis 3) décrocher le $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ par du NaCl 0,9% (Entrées 1-2, Tableau 29) ou par un tampon NaOAc (Entrées 4-6, Tableau 29). Dans de plus rare cas, un éluant carbonate ou bicarbonate de potassium peut être utilisé pour produire du $[^{18}\text{F}]\text{KF}$ (Entrées 7-9, Tableau 29). Il est également à noter que les équipes de Allott *et al.* et Guo *et al.* n'ont pas réalisé d'étape préliminaire avant le radiomarquage et utilisent directement la solution de fluor-18 provenant du cyclotron.^[107,278]

Tableau 29 : Exemples de préparation du $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ (ou $[^{18}\text{F}]\text{KF}$) sur cartouche Sep-Pak[®] Accell Plus QMA Plus light

Entrée	Éluant	Réf.
1	NaCl 0,9 % (700 µL)	[105]
2	NaCl 0,9 % (500 µL)	[288]
3	EtOH/NaCl 0,9% (1/1, v/v, 500 µL)	[109]
4	NaOAc 0,5 M pH 4,5 (500 µL)	[104]
5	NaOAc 0,5 M pH 4,5 (500 µL)	[103]
6	NaOAc 0,5 M pH 4,5 (600 µL)	[279]
7	KHCO ₃ 0,4 M (200 µL)	[290]
8	K ₂ CO ₃ 0,4 M (400 µL)	[108]
9	KHCO ₃ 0,4 M (NC)	[89]

NC : Non communiqué

La première étape du radiomarquage à l' Al^{18}F est la production de $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ sur module AIO[®] (Trasis). Pour mettre en place cette étape, le protocole de radiosynthèse du $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ déjà publié par Nancyclotep est réutilisé.^[291] La représentation graphique de la radiosynthèse du $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ est présentée en annexe 21. Cependant, le protocole nécessite une adaptation afin d'avoir un volume de $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ inférieur au 3 mL décrit dans la publication. En effet, ce volume est trop important pour les conditions de radiomarquage ultérieures qui sont réalisés dans un réacteur de 10 mL. Des essais ont donc été réalisés afin de déterminer le volume d'élution minimum du fluor-18 par une solution de NaCl 0.9 %. Pour cela, des tests d'accrochage et d'élution sont réalisés en mode manuel afin de déterminer le volume d'élution minimal requis pour avoir une efficacité de relargage optimale.

Sur la Figure 76, nous observons une efficacité d'élution de 99% lors de l'utilisation de 500 µL de NaCl 0,9%. En dessous de ce volume, l'efficacité d'élution diminue. Il est primordial que la totalité du fluor-18 se décroche de la cartouche afin d'obtenir le moins de perte d'activité possible et donc d'atteindre un RRC maximal.

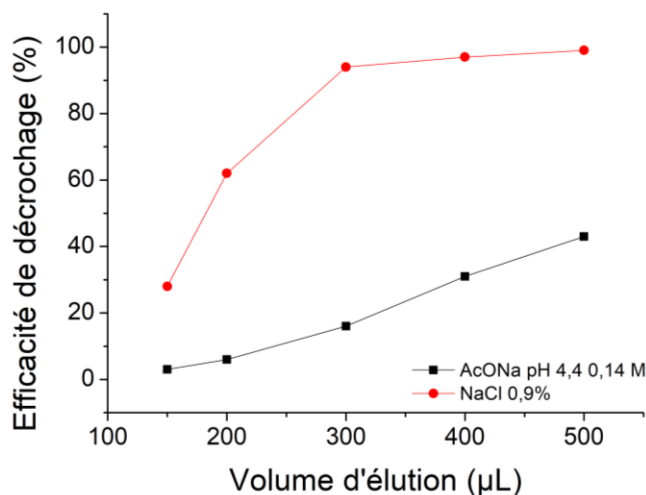


Figure 76 : Évaluation du volume de NaCl 0,9% utilisé pour l'élution de l'ion $[^{18}\text{F}]$ fluorure fixé sur la cartouche QMA

Afin de déterminer si l'ion $[^{18}\text{F}]$ fluorure accroché sur la QMA peut être élué avec du tampon NaOAc, des tests d'élution avec ce tampon ont également été réalisés (Figure 76). L'intérêt de ce test est de pouvoir déterminer si le tampon employé dans la radiosynthèse peut être ajouté au moment de la production du $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ pour le décrochage de la QMA ou s'il doit être ajouté via un flacon. Des efficacités d'élution plus faibles sont obtenues avec du tampon NaOAc comparé au NaCl 0,9% pour des mêmes volumes d'élution. Ainsi, un décrochage par 500 µL de tampon NaOAc permet une efficacité de décrochage de 30% contre 99% avec du NaCl 0,9%. Par conséquent, ce dernier est choisi pour la suite des tests.

Sur l'automate de radiosynthèse AIO[®], le RRC du $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ obtenu après élution avec 500 µL de NaCl 0,9% est de $81 \pm 3\%$ cd ($n = 12$).^[291]

La possibilité d'éluer le $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ de la QMA à l'aide d'une solution de NaCl 0,9% contenant l' AlCl_3 a également été déterminée. Afin de savoir si cette méthode est viable, des tests de rétention d'aluminium sont réalisés sur QMA. Trois solutions à différentes concentrations d' AlCl_3 dans du NaCl 0,9% sont passées au travers d'une QMA préalablement activée par 2 x 3 mL d'eau pour injection. Le dosage de l'aluminium est réalisé sur les solutions avant et après passage sur la QMA par ICP-OES (Spectroscopie d'émission de plasma à couplage inductif). Les résultats sont présentés dans le Tableau 30. Nous observons que pour les trois concentrations testées, le taux de rétention de l'aluminium par la cartouche est d'en moyenne 85%. Ainsi, il n'est pas possible d'utiliser cette stratégie pour mettre en contact l' AlCl_3 et le $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ et l'utilisation d'un flacon contenant une solution d' AlCl_3 est la méthode sélectionnée pour réaliser l'ensemble des tests de marquage du $[^{18}\text{F}]\text{AlF-PSMA-11}$.

Tableau 30 : Dosage de l'aluminium par ICP-OES pour les tests de rétention d'aluminium sur QMA (n = 8)

Concentration en Al ³⁺ initial théorique (mg/L)	Concentration en Al ³⁺ avant élution sur QMA mesurée par ICP-OES (mg/L)	Concentration en Al ³⁺ après élution sur QMA mesurée par ICP-OES (mg/L)	Taux d'Al ³⁺ retenu par la QMA (%)
1,08	1,27 ± 0,09	0,19 ± 0,11	85,30 ± 7,53
2,70	2,37 ± 0,31	0,34 ± 0,12	85,20 ± 6,09

1.5.2. Ordre d'ajout des réactifs

1.5.2.1. Analyse de la littérature

Selon l'analyse de la littérature, les 3 espèces, [¹⁸F]NaF, AlCl₃ et PSMA-11, peuvent être mises en contact successivement (Entrées 1, 3, 6, 8, 9 et 11, Tableau 31) mais plusieurs protocoles présentent une étape préalable de mise en contact du [¹⁸F]NaF avec de l'AlCl₃ afin de former un complexe {Al¹⁸F}²⁺ (Entrées 2, 7, 10 et 12, Tableau 31). Deux équipes proposent une autre stratégie consistant à mettre en contact l'AlCl₃ et le précurseur (Entrées 4, 5, Tableau 31).^[107,278]

Les conditions de radiomarquage décrivent dans la grande majorité l'utilisation d'un co-solvant, principalement de l'EtOH. L'équipe de Vogg a prouvé que la concentration en EtOH a un impact positif sur le RRC permettant de passer de 40% avec 0% d'EtOH à 75% avec 80% d'EtOH.^[230] Cependant, son mode d'action n'est actuellement pas décrit. L'EtOH a été retenu comme réactif, car la majorité des équipes de recherche l'utilisent et que sa concentration maximale autorisée dans une dose est largement supérieure (10%) comparée à celles du CH₃CN et du DMSO (410 ppm). Concernant le choix du tampon, l'utilisation du tampon NaOAc à différentes molarités et pH (compris entre 3,8 et 4,5) est récurrente. Cependant, Boschi *et al.* décrit l'utilisation du tampon ascorbate de sodium^[104] et radiomarquages courts (10 - 15 min) sont en moyenne réalisés. En fonction des ACB utilisés, les températures de radiomarquage ne sont pas les mêmes. Pour NOTA et NODAGA, les températures de radiomarquage sont comprises entre 90 et 105°C, tandis que pour HBEC-CC, elles sont comprises entre 30 et 65°C.

Tableau 31 : Comparaison des conditions de radiomarquage par la stratégie Al¹⁸F

Entrée	Précurseur	Mise en contact	Marquage	Ref.
		Solution	Solution	
1	NOTA-octreotide	/	[¹⁸ F]KF, AcOH. préc. (0,077-0,38 μmol), AlCl ₃ (0,015-0,078 équiv.), 15 min, 100°C	[290]
2	NOTA-octreotide	AlCl ₃ (0,2 équiv.), [¹⁸ F]NaF, NaCl 0,9%/EtOH (1/1, v/v), 2 min, TA	préc. (0,25 μmol), NaAsc dans NaOAc 0,1 M pH 4,1/EtOH (1/1, v/v) (EtOH 50% Vt), 10 min, 100°C	[109]
3	NOTA-RGD2	/	[¹⁸ F]KF, AcOH, préc. (0,2 μmol) dans DMSO, AlCl ₃ (0,3 équiv.), 15 min, 100°C	[108]
4	NOTA-RGD	préc. (0,036 μmol), AlCl ₃ (0,9 équiv.), NaOAc 0,5 M pH 4, CH ₃ CN, TA	[¹⁸ F]F ⁻ dans l'eau enrichie, CH ₃ CN (70% Vt), 10 min, 100°C	[107]
5	NOTA-RGD2	préc. (0,03-0,06 μmol), AlCl ₃ (0,28-1,8 équiv.), NaOAc 25 mM pH 4/ CH ₃ CN (1/1, v/v), TA	[¹⁸ F]F ⁻ dans l'eau enrichie, CH ₃ CN (17% Vt), 12 min, 105°C	[278]
6	NOTA-MPAA-pep	/	[¹⁸ F]NaF dans NaCl 0,9%, préc. (0,02 μmol), AlCl ₃ (0,5 équiv.), EtOH (50% Vt), 15 min, 105°C	[89]
7	NODAGA-RGD2	[¹⁸ F]NaF, AlCl ₃ (0,4-0,9 équiv.), NaCl 0,9%, TA	préc. (0,0625 μmol), NaOAc 0,5 M pH 4,1/ CH ₃ CN (20/80, v/v), 15 min, 100°C	[110]
8	PSMA-11	/	[¹⁸ F]NaF dans NaCl 0,9%, préc. (0,01-0,1 μmol), AlCl ₃ (0,3-3 équiv.), NaOAc 0,05 M pH 5, 1-30 min, 30-100°C	[105]
9	PSMA-11	/	[¹⁸ F]NaF dans NaOAc 0,5 M pH 4,5, préc. (20-90 nmol), AlCl ₃ (0,33-1,5 équiv.), NaOAc 0,05 M pH 4/EtOH (1/1, v/v) (EtOH 50% Vt), 5-20 min, 50°C	[104]
10	PSMA-11	AlCl ₃ (0,7 équiv.), [¹⁸ F]NaF, NaOAc 0,5 M pH 4,5, 5 min, TA	préc. (0,06 μmol), NaOAc 0,5 M pH 4,5/EtOH (60/40, v/v) (30% EtOH), 10 min, 50°C	[103]
11	PSMA-11	/	[¹⁸ F]NaF dans NaOAc 0,5 M pH 4,2, préc. (20 nmol), AlCl ₃ (1,5 équiv.), EtOH (50% Vt), 15 min, 50°C	[288]
12	PSMA-11	[¹⁸ F]NaF, NaOAc 0,5 M pH 4,5, AlCl ₃ (0,75 équiv.), 5 min, TA	préc. (0,2 μmol), EtOH (35% Vt), 10 min, TA	[279]

(Vt : volume total)

Nous retrouvons dans la littérature trois ordres d'ajout des réactifs (précurseur PSMA-11, aluminium et fluor-18) différents (Figure 77) :

- 1) Mise en contact de l'aluminium et du [¹⁸F]NaF, puis ajout du précurseur PSMA-11,
- 2) Ajout simultanée des trois réactifs,
- 3) Mise en contact de l'aluminium et du précurseur PSMA-11, puis ajout du [¹⁸F]NaF.

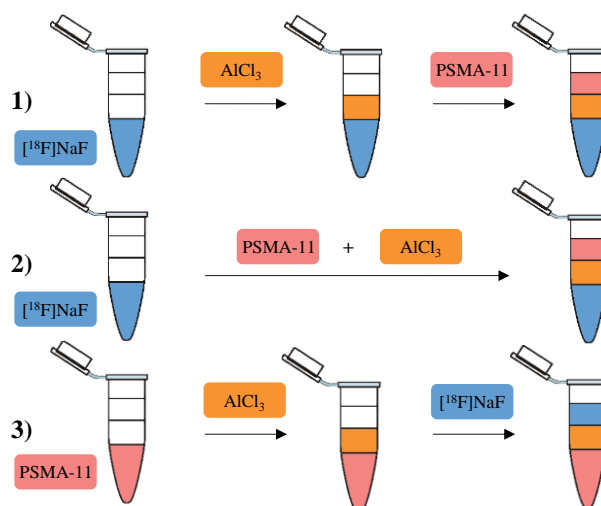


Figure 77 : Représentation schématique des trois ordres d'ajout (précurseur PSMA-11, aluminium et fluor-18)

Nous retrouvons cependant plus de protocoles de la littérature utilisant l'ordre d'ajout **1)**. Deux articles présentent le radiomarquage du PSMA-11 sur automate de synthèse avec l'ordre d'ajout **1)**. Kersemans *et al.* utilisent un module SynthraFCHOL modifié, et Giglio *et al.* un module TRACERLab™ FX-FN.^[103,279] L'ordre d'ajout **1)** a l'inconvénient majeur de présenter un temps de radiomarquage plus long dû au temps de mise en contact.

1.5.2.2. Évaluation de l'ordre d'ajout des réactifs sur le TCRC

Une étude de l'impact de l'ordre d'ajout des réactifs sur le TCRC en mode manuel est réalisée puisqu'aucune étude n'a été publiée dans la littérature. En fonction des résultats, le meilleur ordre d'ajout sera choisi et contraindra le développement du radiomarquage en mode automatique.

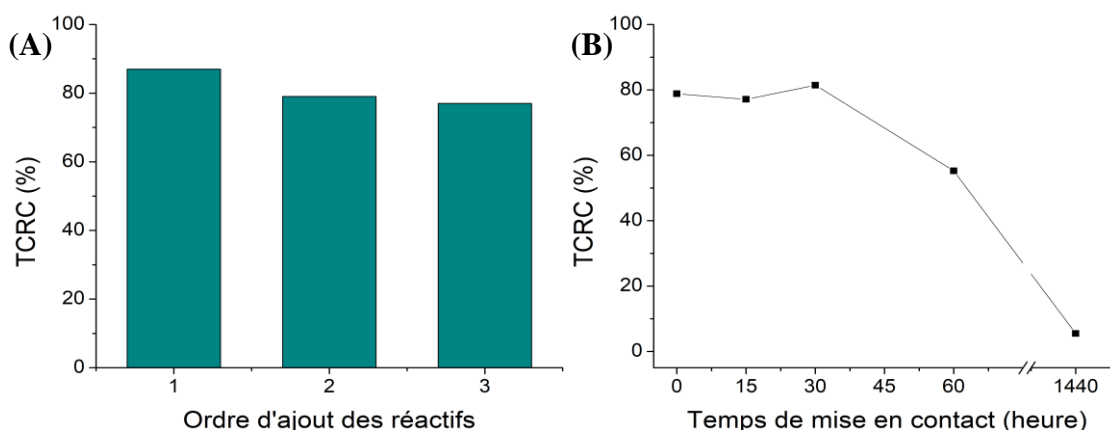


Figure 78 : (A) Étude de l'ordre d'ajout **1)**, **2)** et **3)**. (B) Impact du temps de mise pour l'ordre d'ajout **3)** sur le TCRC. Conditions de réactions : $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ (50 MBq), EtOH, NaOAc 0,14 M pH 4,4, Mise en contact à TA avec PSMA-11 (50 μg) ou AlCl_3 (2 mM, 25 μL), puis ajout de l'autre réactif, 15 min, 50°C (1 équiv. AlCl_3 , EtOH 50% Vt).

Pour une condition de radiomarquage donnée, les trois ordres d'ajout sont testés. Pour l'ordre **1)** et **3)**, le temps de mise en contact est de 5 min à TA (Figure 78A). Les résultats montrent de meilleurs taux de conversion pour l'ordre d'ajout **1)** (89%) par rapport à l'ordre d'ajout **2)** et **3)** (79 et 77%, respectivement). L'ordre d'ajout **1)** permet de former au préalable un adduit $\{AlF\}^{2+}$, ce qui semble plus favorable pour la radiochimie à $Al^{18}F$. Pour l'ordre d'ajout **3)**, des temps de mise en contact croissants entre le PSMA-11 et l' $AlCl_3$ sont testés afin de voir si une éventuelle complexation à TA de l'aluminium par HBED-CC est possible et si elle pourrait limiter la formation de la liaison $Al^{18}F$ (Figure 78B). Il est observé que la réaction doit se faire dans un délai de mise en contact inférieur à 30 min, dépassé ce délai, le TCRC diminue considérablement. Il est supposé que cet impact puisse varier en fonction de la cage chélatante présente sur le précurseur et de son aptitude à complexer l' Al^{3+} à TA.

Pour la suite des essais, l'ordre d'ajout **1)** est sélectionné. La stratégie de radiomarquage est présentée sur la Figure 79. Les paramètres influant sur la complexation du $\{Al^{18}F\}^{2+}$ sont maintenant à optimiser.

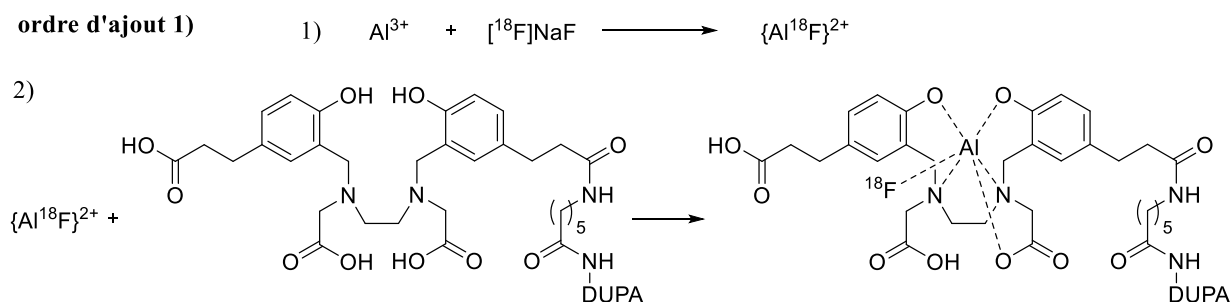


Figure 79 : Ordre d'ajout **1)** utilisé pour le radiomarquage du PSMA-11 par la stratégie $Al^{18}F$.
1) de mise en contact de 5 min à TA. 2) Radiomarquage du PSMA-11

1.5.2.3. Impact du co-solvant sur le radiomarquage

L'impact de la présence du tampon NaOAc et d'EtOH lors de l'étape de mise en contact, de radiomarquage, ou des deux étapes est évalué. Des conditions de radiomarquage identiques ont été réalisées pour tous les tests présentés dans le Tableau 32. Seule la composition de la solution des réactifs $AlCl_3$ et du PSMA-11 varie. Pour garder un volume total ainsi qu'un taux d'EtOH identique, du NaCl 0,9% a été utilisé lorsque les tests ne nécessitaient pas la présence de tampon.

Tableau 32 : Impact de l'ordre d'ajout du tampon et de l'EtOH sur le TCRC (radio-CCM) (μL)

Entrée	Solution AlCl_3			Solution PSMA-11			TCRC radio-CCM (%)
	NaCl 0,9%	NaOAc	EtOH	NaCl 0,9%	NaOAc	EtOH	
1	625	-	-	625	-	-	25
2	250	-	1000	-	-	-	82
3	-	-	-	25	-	1000	99
4	125	-	500	125	-	500	72
5	-	625	-	-	625	-	3
6	-	1250	-	-	-	-	4
7	-	-	-	-	1250	-	7
8	-	250	-	-	-	1000	28
9	-	-	1000	-	250	-	42
10	-	250	1000	-	-	-	79
11	-	250	500	-	-	500	90
12	-	-	-	-	250	1000	98
13	-	-	500	-	250	500	90
14	-	125	1000	-	125	-	87
15	-	125	-	-	125	1000	86
16	-	125	500	-	125	500	79

Conditions et réactifs : ^{18}F FaF (50 MBq, 500 μL), AlCl_3 (1 équiv.), 5 min, TA, puis PSMA-11 (40 μg), 15 min, 50°C. EtOH (55% Vt). Solution AlCl_3 : AlCl_3 2 mM dans NaCl 0,9% (20 μL) dilué avec les solutions présentées dans le Tableau. Solution PSMA-11 : PSMA-11 1 mg/mL dans H_2O (40 μL) dilué avec les solutions présentées dans le Tableau. Rouge : TCRC 0-25%, orange : TCRC 25-50%, jaune : TCRC 50-75%, vert : TCRC 75-100%

La présence d'EtOH est indispensable pour obtenir un bon TCRC (Entrées 2-4, 10-16, Tableau 32) alors que la présence de tampon acétate n'est pas indispensable pour les conditions testées (Entrées 2-4, Tableau 32). Les résultats obtenus pour les tests présentant à la fois de l'EtOH et du tampon présentent des résultats similaires (TCRC > 75%) pour les conditions des Entrées 10 à 16, laissant penser que l'ordre d'ajout du tampon et de l'EtOH n'est pas très important (Entrées 8-16, Tableau 32). De plus, cela signifie que ni le tampon et ni l'EtOH ne sont indispensables pour l'étape de mise en contact permettant la formation du complexe $\{\text{Al}^{18}\text{F}\}^{2+}$ (Entrées 3 et 11, Tableau 32). Nous avons donc la possibilité de répartir librement le tampon et l'EtOH entre les solutions d' AlCl_3 et de PSMA-11. Pour la suite des expériences, tous les tests seront réalisés avec des solutions d' AlCl_3 et de PSMA-11 ayant le même ratio tampon NaOAc/EtOH donnant un TCRC de 79% (Entrée 15, Tableau 32). En effet, bien que les conditions des Entrées 3 et 11 permettent l'obtention des meilleurs résultats, ces conditions ne peuvent pas être employées sur automate car le volume de la solution d' AlCl_3 est trop faible pour être mise dans un flacon. Les conditions des Entrées 10 et 12 donnent de très bons résultats,

mais il est préférable d'utiliser sur automate des solutions d'AlCl₃ et de PSMA-11 ayant le même volume afin que la proportion de volume mort dans le flacon après injection soit le même.

1.5.3. Développement de la séquence d'automatisation

Une radiosynthèse est réalisée à l'aide d'une cassette composée de tous les éléments nécessaires à la radiosynthèse selon la représentation graphique présentée en Figure 80.

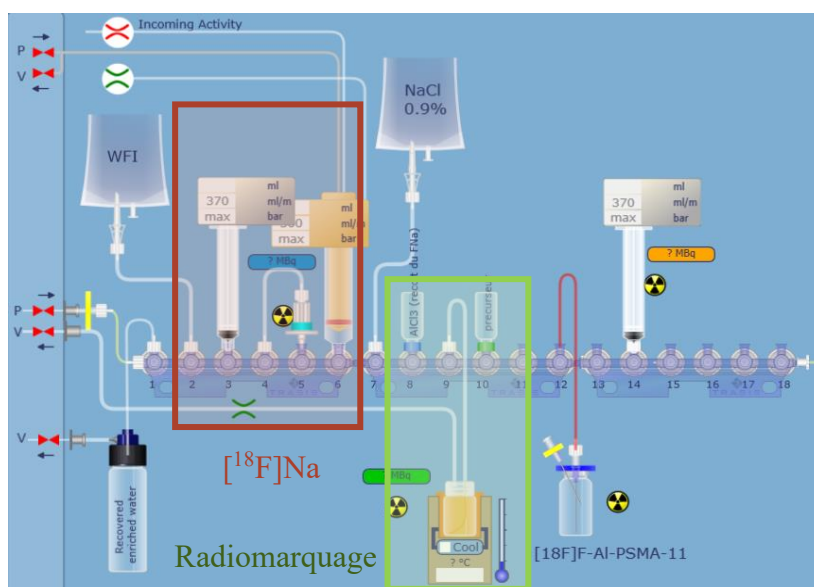


Figure 80 : Représentation graphique de la séquence de radiomarquage de [¹⁸F]AlF-PSMA-11 sur AIO[®] pour l'étude du brut réactionnel et la détermination du TCRC

La séquence peut se découper en trois parties :

- Les positions 1 à 7 permettent la production du [¹⁸F]NaF. Le *plunger* en position 6 permet l'arrivée de la solution de fluorure [¹⁸F]F⁻ contenue dans de l'eau enrichie. Après conditionnement de la cartouche QMA par de l'eau pour préparation injectable (EPPI) (2 x 3 mL) pour injection, la solution contenant l'ion [¹⁸F]fluorure est piégée sur la cartouche de QMA et l'eau enrichie est collectée en position 1 supérieure. Après rinçage de la QMA par de l'EPPI (2 x 3 mL), les ions [¹⁸F]fluorures sont décrochés de la QMA par NaCl 0,9% (0,5 mL) et transférés directement dans le réacteur en position 9.
- Les positions 8 à 10 concernent l'étape de radiomarquage. Un flacon contenant une solution d'AlCl₃ en position 8 et de PSMA-11 dans un mélange NaOAc 0,14 M pH 4,4 /EtOH de composition variable en position 10 sont présents. Une étape préalable au radiomarquage est nécessaire, et celle-ci consiste en la préparation de l'adduit {Al¹⁸F}²⁺ par la mise en contact du [¹⁸F]NaF et d'AlCl₃ à TA pendant 5 min. Puis, la solution de PSMA-11 est additionnée et le radiomarquage est effectué à 35-65°C pendant 15 min.

- La position 12 permet de collecter la solution de marquage présente dans le réacteur.

1.5.4. Optimisation du radiomarquage

1.5.4.1. Choix des paramètres étudiés

Comme présenté précédemment, dans la littérature, de très nombreux protocoles pour le radiomarquage à l' $Al^{18}F$ sont décrits et peuvent impacter le RRC. Nous avons donc décidé d'effectuer une optimisation des conditions de radiomarquage en évaluant l'impact de plusieurs facteurs sur le TCRC. Classiquement, les optimisations de conditions de radiomarquage évaluent systématiquement l'impact de la quantité de précurseur, du temps et température de radiomarquage. Pour le radiomarquage à l' $Al^{18}F$, il faut également évaluer l'impact du nombre d'équiv. d' $AlCl_3$ par rapport au précurseur de radiomarquage, ainsi que du taux d'EtOH et le pH et la molarité du tampon. En ce qui concerne le choix des réponses à étudier, nous décidons d'évaluer l'impact des facteurs précédemment choisis, sur le TCRC mesuré par radio-CCM et radio-UHPLC.

1.5.4.2. Évaluation préliminaire de l'impact des facteurs par la méthodologie OVAT

1.5.4.2.1. Emploi de la méthodologie OVAT

La méthodologie OVAT est utilisée pour évaluer l'impact de différents facteurs sur le TCRC mesuré par radio-CCM et radio-HPLC. Les choix des facteurs étudiés et des domaines d'étude sont présentés dans le Tableau 33 et sont choisis d'après une analyse de la littérature. Pour l'ensemble des essais effectués, les radiomarquages sont analysés par radio-HPLC et radio-CCM. Seuls les résultats obtenus par radio-HPLC sont présentés lorsque les résultats par radio-HPLC et radio-CCM sont très similaires.

Tableau 33 : Choix des facteurs et de leurs domaines d'étude

Facteurs					
Abréviation	Facteurs	Unité	Minimum	Maximum	Valeur fixée
u_1	Quantité de PSMA-11	μg	20	80	50
u_2	Équiv. d' $AlCl_3$	-	0,5	2,5	1
u_3	Température de radiomarquage	$^{\circ}C$	30	90	50
u_4	Taux d'EtOH	%	20	56	56
u_5	Temps de radiomarquage	min	5	15	15
u_6	pH du tampon NaOAc	-	4	5,5	4,4

Lorsque les facteurs ne sont pas étudiés, ils sont fixés à des valeurs arbitraires présentées dans le Tableau 33. Les essais sont conduits en mode manuel et automatique et les résultats sont présentés sous forme de graphique dans la Figure 81.

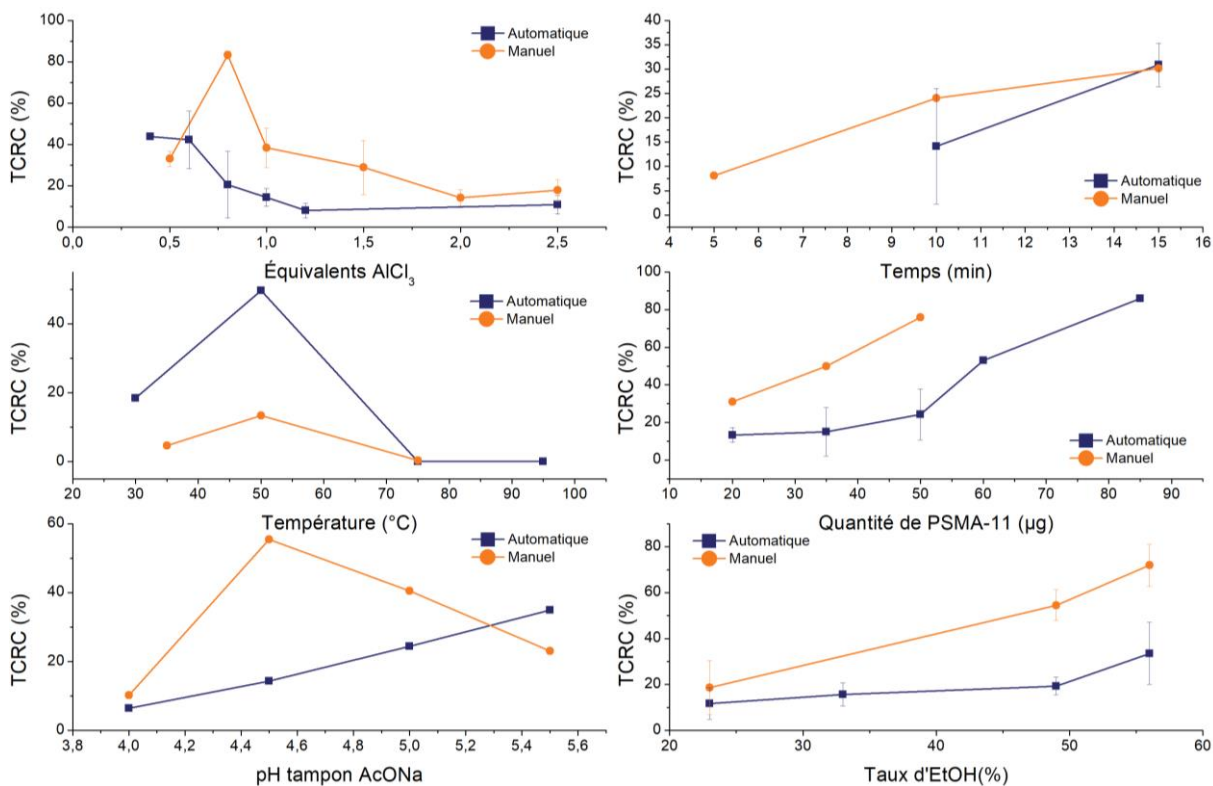


Figure 81 : Étude par la méthode OVAT des facteurs (nombre d'équiv. d' $AlCl_3$, temps et température de radiomarquage, quantité de PSMA-11, pH du tampon et taux d'EtOH) sur le TCRC

Cette étude permet dans un premier temps, de mettre en évidence le fait que les résultats obtenus en mode manuel et automatique sont différents et que les facteurs n'impactent pas le TCRC de la même manière selon le mode de radiosynthèse. Ainsi, une évaluation indépendante des résultats de radiomarquage en manuel et en automatique sera réalisée. Cependant, des tendances similaires sont observées pour les facteurs, temps et température de radiomarquage, quantité de PSMA-11 et d'EtOH. Les résultats montrent que plus le temps de radiomarquage, la quantité de PSMA-11 et le taux d'EtOH sont élevés, plus le TCRC obtenu sera élevé également (Figure 81). Par exemple, le TCRC passe de 4 à 52% lorsque le taux d'EtOH passe de 23 à 56%. Ces résultats sont en adéquation avec les résultats décrits par Vogt qui préconisent un taux d'EtOH de 60-80%.^[230] Des optimums à 50°C et 0,8 équiv. d' $AlCl_3$ sont observés. Concernant le pH du tampon, les conclusions sont complètement différentes en fonction du mode de radiosynthèse. En effet, nous observons un optimum à pH 4,5 pour des radiomarquages en mode manuel contre 5,5 pour ceux sur automate (Figure 81). Ces résultats sont en adéquation avec les résultats

décrits par De Vos qui démontrent qu'un pH du tampon autour de 4,5-5,0 permet d'obtenir un rendement de radiomarquage élevé.^[279]

1.5.4.2.2. Analyse statistique des résultats de l'étude de criblage

En parallèle de notre analyse, l'ensemble de ces résultats de TCRC mesurés par radio-HPLC et radio-CCM ont été analysés par la plateforme d'analyse statistique easyQBD[®] développée par de la start-up CYBERNANO.^[292]

Des graphiques en dispersion (nuages de points) montrent la répartition de l'ensemble des valeurs expérimentales du TCRC en fonction de chacun des quatre facteurs afin de dégager une tendance visuelle, à la manière des graphiques obtenus par la méthode OVAT (Figure 82). Cette première analyse visuelle montre que le taux d'EtOH semble avoir un impact positif sur la réponse, à l'inverse du nombre d'équiv. d'AlCl₃. Il est difficile de voir un effet sur les autres facteurs. Les résultats obtenus par radio-CCM sont très proches de ceux obtenus par radio-HPLC. Concernant la nature du tampon utilisée, les résultats sont présentés sous forme d'un diagramme boîte à moustaches qui permet de montrer qu'en faisant varier le pH et la molarité du tampon dans une gamme restreinte (pH 4 – 5,5, molarité 0,14 – 0,5 M), aucune variation significative du TCRC n'est observée.

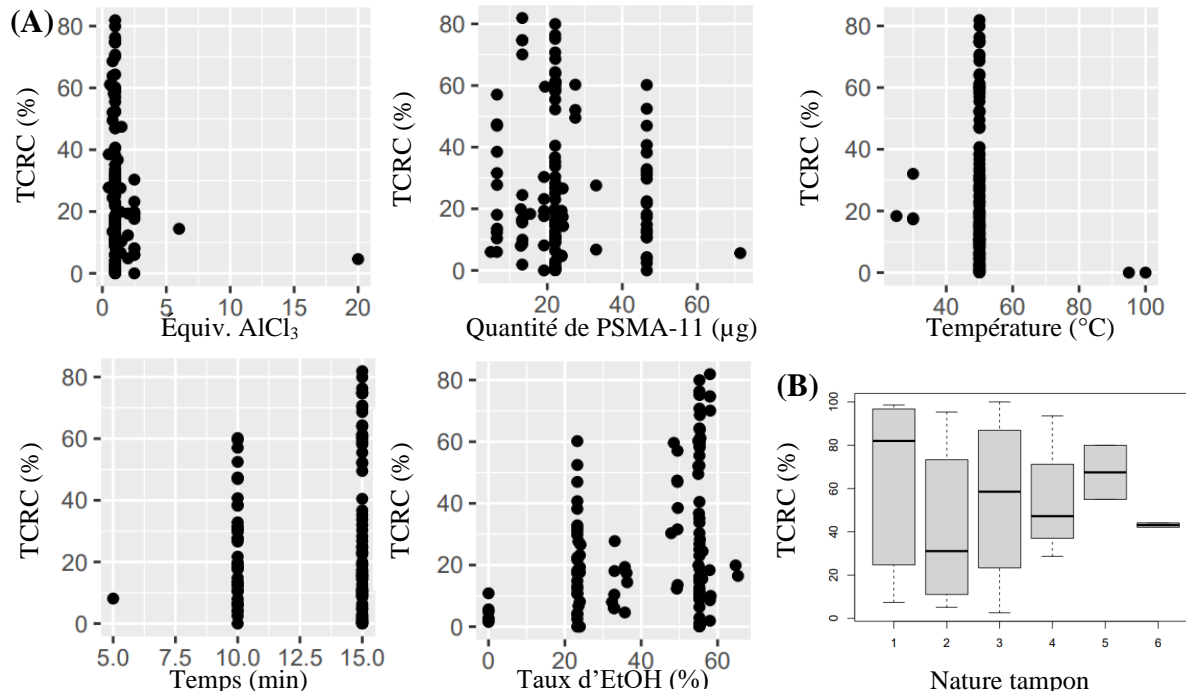


Figure 82 : (A) Graphiques en dispersion des valeurs de TCRC obtenus par radio-HPLC pour chacun des 5 facteurs à l'étude. (B) Diagrammes présentant l'impact de la nature du tampon sur le TCRC : tampon NaOAc : 1) 0,14 M pH 4,4, 2) 0,14 M pH 4, 3) 0,5 M pH 4, 4) 0,5 M pH 4,5, 5) 0,5 M ph 5, 6) 0,5 M pH 5,5

Afin de préciser les effets des différents facteurs, une méthode de régression utilisant un modèle d'équation linéaire (E13) du premier ordre est nécessaire. Elle est de type :

$$Y_1 = b_0 + b_1u_1 + b_2u_2 + b_3u_3 + b_4u_4 + b_5u_5 + E \quad (E13)$$

avec u_1 = équiv. d' $AlCl_3$, u_2 = quantité de PSMA-11, u_3 = température de radiomarquage, u_4 = temps de radiomarquage, u_5 = taux d'EtOH. E désigne une variable aléatoire de distribution gaussienne centrée pour représenter les erreurs de modélisation. Le facteur nature du tampon peut difficilement être incorporé dans l'équation, puisque c'est un facteur discret.

La résolution de l'équation (E13) conduit à l'obtention de valeurs pour les coefficients b_0 , b_1 , b_2 , b_3 , b_4 et b_5 , b_0 correspondant à la moyenne des valeurs obtenus. Cette équation est résolue pour les deux mesures de TCRC par radio-HPLC et radio-CCM. Les coefficients de la régression sont représentés sous forme de graphique (Figure 83). Les coefficients de régression élevés représentent les facteurs ayant un grand impact sur la réponse.

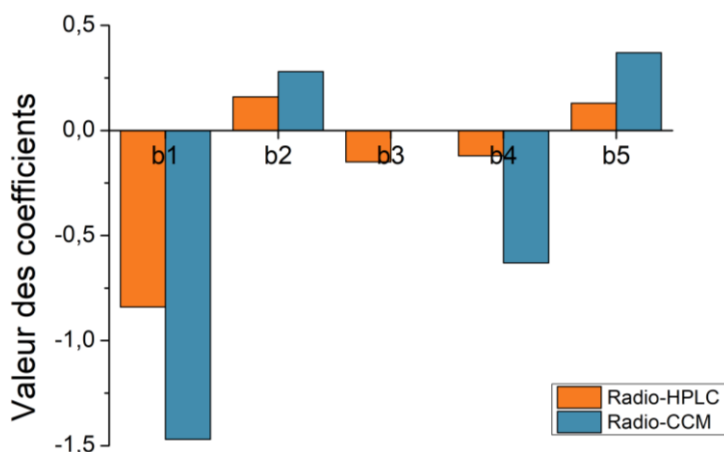


Figure 83 : Valeurs des coefficients de la régression linéaire

Plus la quantité de PSMA-11 et le taux d'EtOH sont élevés, et plus le TCRC est élevé car les coefficients b_2 et b_5 sont positifs. Plus le nombre d'équiv. en $AlCl_3$, et le temps et la température de radiomarquage sont faibles, et plus le TCRC est élevé car les coefficients b_1 , b_3 et b_4 sont négatifs. Le coefficient ayant la valeur absolue la plus élevée est b_1 , signifiant que le nombre d'équiv. en $AlCl_3$ est le facteur ayant le plus d'influence sur le TCRC. À l'inverse, la valeur absolue du coefficient b_3 est la plus faible, signifiant que la température de radiomarquage a un impact moins important sur le TCRC que les autres facteurs. Les mêmes conclusions, quant à l'impact des facteurs pour les deux méthodes de mesure (radio-CCM et radio-HPLC), sont obtenues car les coefficients de la régression du modèle étudiant Y_1 (radio-HPLC) et Y_2 (radio-CCM) sont similaires. Ces résultats nous permettent de construire un plan d'optimisation avec

les quatre facteurs qui ont le plus d'impact dans notre étude (quantité de PSMA-11, équiv. AlCl_3 , température de radiomarquage, taux d'EtOH) et d'évaluer l'impact de ces facteurs sur le TCRC mesuré par méthode radio-UHPLC et radio-CCM. Le temps de radiomarquage n'ayant pas un fort impact sur le TCRC, nous décidons de l'exclure du plan d'optimisation.

1.5.4.2.3. Plan d'optimisation pour l'étude du radiomarquage en mode manuel

1.5.4.2.3.1. Définition du domaine d'étude

Le plan d'optimisation choisi possède quatre facteurs conduisant à un modèle de régression qui n'est pas trop complexe à résoudre. L'objectif est de déterminer un domaine pour chacun des quatre facteurs, permettant d'obtenir un TCRC supérieur à 80%. Cette valeur de 80% correspond à la cible à atteindre. Le choix des bornes de domaines pour chaque variable est important puisque l'optimum prédit par le modèle ne pourra se trouver qu'à l'intérieur de celles-ci. Si les bornes ne sont pas préalablement définies correctement, il se peut que les conditions permettant d'atteindre la cible de la réponse ne se trouve pas dans le domaine d'étude. Nous décidons donc d'utiliser les résultats des études préliminaires afin de choisir ces bornes (Tableau 34).

Tableau 34 : Facteurs et réponses étudiés pour le plan d'optimisation

Facteurs					
Abréviation	Facteurs	Unité	Minimum	Maximum	
u_1	Quantité de PSMA-11	μg	20	80	
u_2	Équiv. d' AlCl_3	-	0,5	1,5	
u_3	Température de radiomarquage	$^\circ\text{C}$	35	65	
u_4	Taux d'EtOH	%	20	80	
Réponses					
Abréviation	Facteurs	Unité	Minimum	Maximum	Cible
Y_1	TCRC radio-UHPLC	%	0	100	80
Y_2	TCRC radio-CCM	%	0	100	80

La quantité maximale de PSMA-11 a été déterminée à 80 μg afin d'avoir un coût de radiosynthèse qui ne soit pas trop important et de telle sorte que la limite maximale de quantité de PSMA-11 pouvant être injectée respecte les normes de la pharmacopée européenne. Ainsi, 80 μg dans un volume final de 10 mL permet d'injecter un volume maximal de 3,75 mL (30 μg de PSMA-11 injecté).

Pour le nombre d'équiv. d' AlCl_3 , le domaine d'étude choisi est 0,5-1,5 équiv. En effet, l'étude préliminaire montre qu'au-delà de 1,5 équiv., le TCRC obtenu est très faible.

Concernant le taux d'EtOH, le domaine d'étude choisi est de 20-80%. L'étude préliminaire montre qu'en-dessous de 20%, les résultats sont très faibles. Le TCRC à atteindre de 80% est choisi comme valeur haute pour des raisons techniques. En effet, ayant à mélanger une solution de $^{18}\text{F}]\text{NaF}$, d' AlCl_3 , de précurseur PSMA-11, de tampon et d'EtOH, il est difficile de fixer la borne maximum au-dessus de 80%.

Le choix du plan d'optimisation s'est porté sur le plan de Hartley réalisé en duplicat. Ce choix permet de réaliser une évaluation de 4 facteurs en 34 tests en comparaison avec une méthode OVAT qui aurait conduit à la réalisation de 256 tests (4^4 tests).

1.5.4.2.3.2. Analyse de l'influence des paramètres

Les analyses de Y_1 et Y_2 donnant des résultats très similaires, seuls les résultats de Y_2 (*i.e.*, valeurs de TCRC par radio-CCM) sont présentés ici, puisqu'il semble que cette analyse soit plus en adéquation avec la réalité d'après les résultats présentés Partie 1.4. du Chapitre 5. Les résultats de Y_1 (*i.e.*, valeurs de TCRC par radio-UHPLC) sont disponibles en Annexe 22. Dans un premier temps, les résultats sont présentés sous forme d'un histogramme et de graphiques en dispersion (nuages de points) afin d'observer la répartition des valeurs expérimentales et de d'essayer de dégager visuellement une tendance (Figure 84).

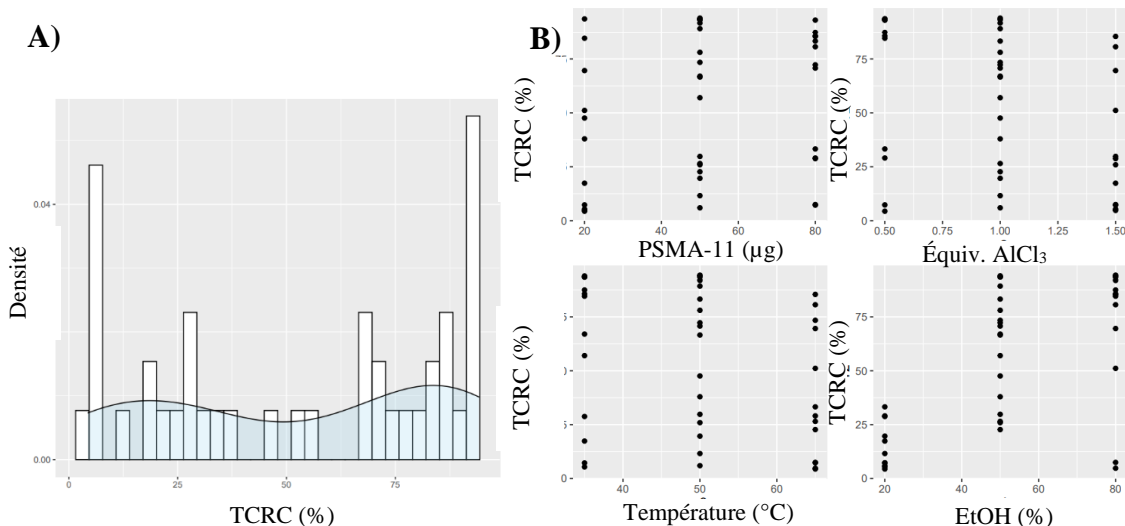


Figure 84 : A) Histogramme et densité de Y_2 (valeurs de TCRC obtenues par radio-CCM). B) Graphiques en dispersion de Y_2 en fonction des valeurs des quatre facteurs.

Ainsi, nous pouvons voir que plus le taux d'EtOH est élevé, et plus le TCRC est grand. Cependant, il est difficile de conclure sur les trois autres facteurs. Toutefois, des interactions potentielles entre ces facteurs, impossibles à détecter visuellement, peuvent exister.

L'équation du modèle de régression du second ordre (E14), utilisée pour reproduire les observations est la suivante :

$$Y_k = b_0 + \sum_{i=1}^{n_u} b_i u_{i,k} + \sum_{i=1}^{n_u} b_{ii} u_{i,k}^2 + \sum_{i=1}^{n_u-1} \sum_{j=i+1}^{n_u} b_{ij} u_{i,k} u_{j,k} + E_k \quad (E14)$$

avec :

- Y_k : $k = 1, \dots, n$: $k^{\text{ème}}$ réponse
- $u_{i,k}$: $i^{\text{ème}}$ facteur, $u_{j,k}$: $j^{\text{ème}}$ facteur,
- n_u : nombre de facteurs testés
- n : nombre total d'expériences
- Y_k : valeur de la réponse Y pour l'essai k
- b_0 : valeur moyenne de Y lorsque chaque $u_i = 0$
- b_i : effet additif du $i^{\text{ème}}$ facteur
- b_{ii} : effet quadratique du $i^{\text{ème}}$ facteur
- b_{ij} : effet d'interaction entre le $i^{\text{ème}}$ et le $j^{\text{ème}}$ facteur sur la réponse Y
- E_k : résidus du modèle décrit comme une variable aléatoire gaussienne centrée sur zéro

Comme certains coefficients possèdent une valeur de 0, l'équation (E14) peut être simplifiée pour donner l'équation (E15). Une valeur de coefficient égale à 0, signifie que le facteur correspondant n'a pas d'effet sur la réponse.

$$Y_2 = b_0 + b_1 u_1 + b_2 u_2 + b_3 u_3 + b_4 u_4 + b_{33} u_3^2 + b_{13} u_1 u_3 + b_{23} u_2 u_3 + b_{34} u_3 u_4 + E \quad (E15)$$

$$Y_2 = -4,1843 - 0,019u_1 + 2,3501u_2 + 0,1715u_3 + 0,0264u_4 - 0,0026u_3^2 - 0,0008u_1u_3 - 0,1197u_2u_3 + 0,0026u_3u_4 + E \quad (E16)$$

Les coefficients de chacun des facteurs sont présentés dans l'équation (E16). Les quatre facteurs à l'étude ont un impact sur le TCRC, ce qui confirme les résultats de l'étude de criblage. Un effet quadratique est observé pour la température de radiomarquage, signifiant qu'un optimum est observé. La température de radiomarquage (u_3) présente des effets d'interactions avec les trois autres facteurs (u_1u_3 , u_2u_3 et u_3u_4).

La résolution du plan d'optimisation a permis d'obtenir des valeurs de R^2 et R^2 ajusté de 0,7613 et 0,6942, respectivement. Cela signifie que le modèle explique 76,13% des variations du

TCRC mesuré par radio-CCM. Ces résultats sont satisfaisants et montrent ainsi que le modèle choisi a une qualité suffisante pour prédire correctement les conditions à employer pour atteindre la cible de 80% de TCRC.

1.5.4.2.3.3. Prédiction du modèle

Des graphiques permettent de visualiser les surfaces des réponses prédites à partir du modèle (E16). Ces graphiques sont réalisés avec une échelle de couleur, du vert au blanc en passant par le jaune, l'orange et le rouge. Le vert correspond aux valeurs théoriques du TCRC faibles, et le blanc aux valeurs théoriques du TCRC élevées (Figure 85).

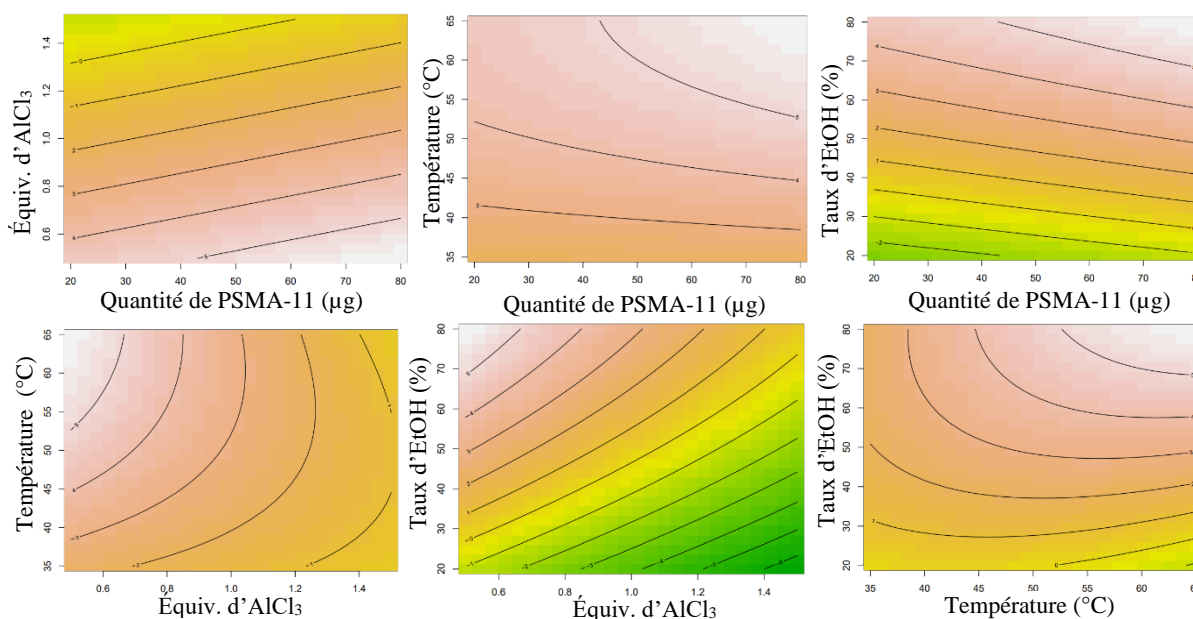


Figure 85 : Modèles de surface de réponse pour Y_2 . Ces graphiques sont présentés pour des valeurs fixées des facteurs (quantité de PSMA-11 (80 μg), équiv. d' AlCl_3 (0,5), température de radiomarquage (65°C) et taux d'EtOH (80%)) lorsque ceux-ci ne sont pas étudiés sur le graphique.

Ces graphiques permettent de visualiser très facilement l'impact des différents facteurs sur le TCRC du fait des couleurs employées. Ainsi, plus la quantité de PSMA-11, la température de radiomarquage et le taux d'EtOH sont élevés, et plus le TCRC est élevé, tandis que plus le nombre d'équiv. d' AlCl_3 est faible, et plus le TCRC est élevé.

Une autre façon de présenter les résultats est d'utiliser des *design space*. Ils correspondent à des cartes de probabilité d'atteindre et dépasser la cible du TCRC. Les *design space* obtenus sont présentés à la Figure 86. La zone en vert correspond aux conditions expérimentales permettant d'obtenir un TCRC > 80% avec une probabilité de 90%. La zone verte est étendue, signifiant qu'un large domaine permet d'atteindre la cible fixée à 80% de TCRC.

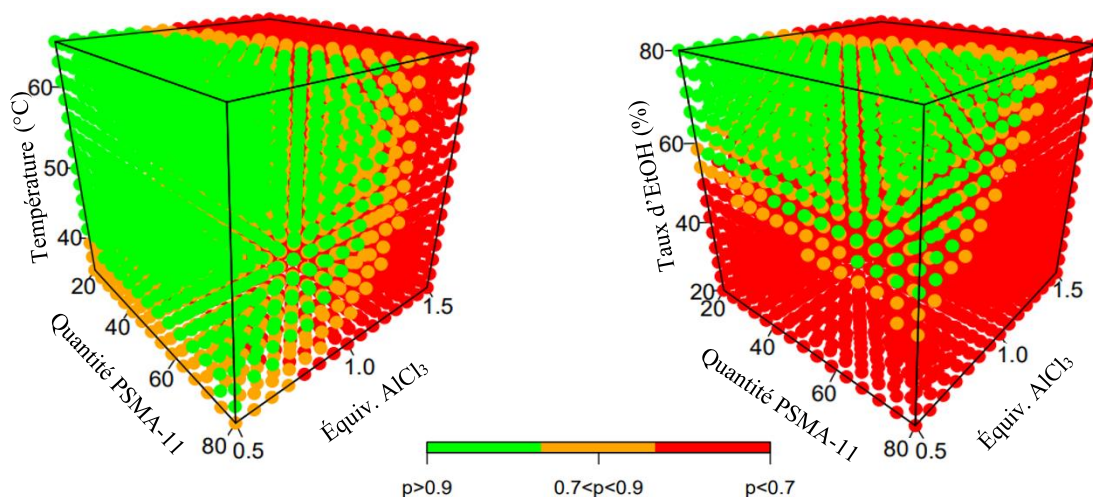


Figure 86 : *Design space* pour un TCRC mesuré par radio-CCM > 80%. La température de radiomarquage et le taux d'EtOH sont fixés à 65°C et 80%, respectivement, lorsqu'ils ne sont pas étudiés

Le modèle obtenu par l'analyse des résultats de TCRC mesuré par radio-UHPLC (Y_1) est aussi robuste que celui obtenu pour Y_2 . En effet, des R^2 et R^2 ajusté de 0,7914 et 0,7327, respectivement, sont obtenus. L'analyse du TCRC mesuré par radio-UHPLC présente des résultats similaires à celle par radio-CCM. En effet, les conclusions obtenues concernant l'impact des quatre facteurs sont identiques.

La résolution du plan d'optimisation permet ainsi de prédire des conditions expérimentales associées aux plus grandes valeurs possibles de TCRC. Ainsi, le modèle réalisé sur le TCRC mesuré par radio-CCM prédit un TCRC de 99,73% avec un intervalle de confiance à 95% de [94,30 – 99,99] % pour 80 μg de PSMA-11, 0,5 équiv. d' AlCl_3 , une température de radiomarquage de 65°C et un taux d'EtOH de 80%. Le modèle réalisé sur le TCRC mesuré par radio-UHPLC prédit, pour sa part, un TCRC de 83,34% avec un intervalle de confiance à 95% de [46,63 – 96,63] % pour 80 μg de PSMA-11, 0,5 équiv. d' AlCl_3 , une température de radiomarquage de 65°C et un taux d'EtOH de 67,14%.

1.5.4.2.3.4. Validation du modèle

La réalisation des essais utilisant les conditions prédites par les deux modèles permet de valider ou non ces modèles en comparant les valeurs des TCRC prédits (théoriques) et expérimentaux (Tableau 35).

Tableau 35 : Résultats de TCRC prédits (théoriques) et expérimentaux utilisant les conditions prédites par les deux modèles (n = 2)

	TCRC (%)		Conditions prédites			
	Radio-UHPLC	Radio-CCM	PSMA-11 (µg)	AlCl ₃ (Équiv.)	T (°C)	EtOH (%)
Théorique	83,34 ^a		80	0,5	65	67,14
Expérimental	86 ± 3	98 ± 1				
Théorique	99,73 ^b		80	0,5	65	80
Expérimental	86 ± 2	94 ± 1				

Intervalle de confiance à 95% : ^a 46,63 – 96,63% (modèle radio-UHPLC) ; ^b 94,30 – 99,99% (modèle radio-CCM)

Les valeurs expérimentales sont toutes supérieures à la cible fixée à 80% et sont toutes comprises dans les intervalles de confiance correspondants. Les résultats expérimentaux de TCRC mesurés par radio-UHPLC et radio-CCM sont très proches des TCRC théoriques des modèles (86 ± 3% et 84,34%, respectivement, pour la radio-UHPLC, et 94 ± 1% et 99,73%, respectivement, pour la radio-CCM). Ainsi, une différence de TCRC expérimentale et théorique de 2% et 5% est observée pour les mesures par radio-UHPLC et radio-CCM, respectivement. Comme les résultats théoriques et expérimentaux sont proches, les deux modèles sont validés et peuvent être utilisés pour prédire l'ensemble des valeurs TCRC pouvant être obtenues sur l'ensemble du domaine.

1.5.4.2.3.5. Validation du domaine

La validation d'un domaine du plan pour lequel nous avons 90% de chance d'atteindre la cible de 80% a également été étudié. Cela permet de s'assurer que même avec une légère variation des valeurs des facteurs, le TCRC obtenu est toujours maximal. Pour cela, un plan factoriel fractionnel nécessitant huit essais a été réalisé. L'ensemble des résultats obtenus, présentés dans le Tableau 36, montrent des valeurs de TCRC supérieures à 80%. Ainsi, la validation du plan et des conditions suivantes est réalisée avec succès.

Pour des mêmes essais, les résultats de TCRC mesurés par radio-UHPLC et radio-CCM ne sont pas les mêmes. En moyenne, les résultats obtenus par radio-UHPLC sont inférieurs de 15% à ceux obtenus par radio-CCM. Cela rejoint les résultats présentés dans la Partie 1.4. du Chapitre 5. Ainsi, les modèles prédits selon l'analyse des réponses Y_1 et Y_2 sont différents. Cette différence est donc uniquement due aux appareils de mesure et non pas à l'expérience en elle-même. Le fait que les meilleures conditions prédites par les deux modèles soient très proches, signifie que les deux méthodes d'analyse sont en corrélation. Cependant, la méthode d'analyse radio-UHPLC sous-estime les résultats comme décrit dans la Partie 1.4. du Chapitre 5.

Tableau 36 : Résultats de TCRC obtenus pour la validation du domaine du plan pour lequel nous avons 90% de chance d'atteindre la cible de 80%

Entrée	Conditions prédites				TCRC (%)	
	PSMA-11 (μg)	AlCl_3 (Équiv.)	T ($^{\circ}\text{C}$)	EtOH (%)	radio-UHPLC	radio-CCM
1	67	0,5	62	68	88	95
2	80	0,5	62	80	85	94
3	67	0,9	62	80	83	91
4	80	0,9	62	68	88	99
5	67	0,5	65	80	84	94
6	80	0,5	65	68	87	91
7	67	0,9	65	68	85	96
8	80	0,9	65	80	86	94

1.5.4.3. Optimisation du radiomarquage en mode automatique

Dans un premier temps, une étude préliminaire a été réalisée par la méthodologie OVAT. L'analyse de ces résultats selon une analyse OVAT a déjà été présentée Partie 1.5.4.2.1. du Chapitre 5. Ici, ces données sont analysées de manière statistique par la start-up CYBERNANO. Dans un second temps, les facteurs ayant le plus d'impact sur la réponse seront sélectionnés pour la réalisation d'un plan de surface de réponse à l'instar de l'optimisation du marquage en mode manuel. Enfin, les meilleures conditions prédites seront testées et le modèle sera validé.

1.5.4.3.1. Analyse statistique des résultats des essais préliminaires de radiomarquage en mode automatique (étude de criblage)

Comme présenté en Partie 1.5.4.2.1. du Chapitre 5, les résultats du radiomarquage en mode manuel et automatique sont différents, d'où la nécessité d'effectuer un plan d'optimisation en mode automatique. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les radiomarquages en manuel sont transposés sur automate de manière non identique. En effet, le AIO[®] est un module en fluide qui travaille avec des volumes de l'ordre du millilitre. Or, pour l'optimisation du radiomarquage en mode manuel, des volumes de l'ordre du microlitre étaient mis en jeu. Un *scale-up* doit être effectué. Ainsi, les volumes des solutions d' AlCl_3 et de PSMA-11 doivent être augmentés (volume dans les flacons sur automate de 1,5 mL vs. 500 μL en manuel) et le volume total dans le réacteur ne doit pas dépasser 10 mL. Les volumes morts dans les deux flacons en positions 8 et 10 sont de 100 et 75 μL , respectivement. Également, les prélèvements effectués par seringues sont moins précis que ceux réalisés par des micropipettes. Le *scale-up* ainsi que les volumes morts et les imprécisions des prélèvements peuvent induire une

modification du RRC en mode automatique, comparé aux radiomarquages en mode manuel. De même, un *scale-up* est réalisé par rapport à l'activité mise en jeu dans les radiosynthèses. Lors d'un radiomarquage en mode manuel, 50 MBq de [¹⁸F]NaF sont utilisés, tandis que 500 MBq sont utilisés en mode automatique. Concernant l'étape de radiomarquage, un bullage à l'azote est réalisé en mode automatique alors qu'en manuel, seule une agitation mécanique est possible. Ainsi, il est indispensable d'effectuer une optimisation du radiomarquage sur automate afin de comparer les deux modes de radiosynthèse et s'assurer de trouver les conditions nous permettant l'obtention des meilleurs résultats.

Les résultats de l'étude préliminaire par la méthode OVAT présentés Partie 1.5.4.2.1. du Chapitre 5 sont analysés statistiquement par la start-up CYBERNANO. Comme pour l'analyse du radiomarquage en mode manuel, les facteurs temps de radiomarquage, quantité de précurseur, équiv. d'AlCl₃ et taux d'EtOH sont évalués. De plus, le facteur volume total est évalué afin d'estimer si le *scale-up* du volume du brut réactionnel a un impact sur le TCRC. La réponse étudiée est le TCRC mesuré par radio-UHPLC. Les valeurs des bornes de chaque domaine sont déterminées d'après les conditions présentées dans la littérature et des études préliminaires en mode manuel. La température est fixée à 50°C (Tableau 37).

Tableau 37 : Facteurs étudiés pour le plan d'optimisation

Facteurs					
Abréviation	Facteurs	Unité	Minimum	Maximum	Valeur fixée
u ₁	Équiv. d'AlCl ₃	-	0,4	2,5	1
u ₂	Quantité de PSMA-11	µg	20	86	50
u ₃	Temps de radiomarquage	min	10	15	15
u ₄	Taux d'EtOH	%	20	56	56
u ₅	Volume total	mL	2	4,5	3

Les graphiques en nuage de points obtenus (Figure 87) montrent que plus la quantité de PSMA-11 et le taux d'EtOH sont élevés, et plus le TCRC est élevé. Ces conclusions sont en adéquation avec celles obtenues lors des études préliminaires du radiomarquage en mode manuel. De plus, plus le nombre d'équiv. d'AlCl₃ est faible, et plus le TCRC est élevé. Il est difficile de tirer des conclusions pour le volume total et le temps de radiomarquage.

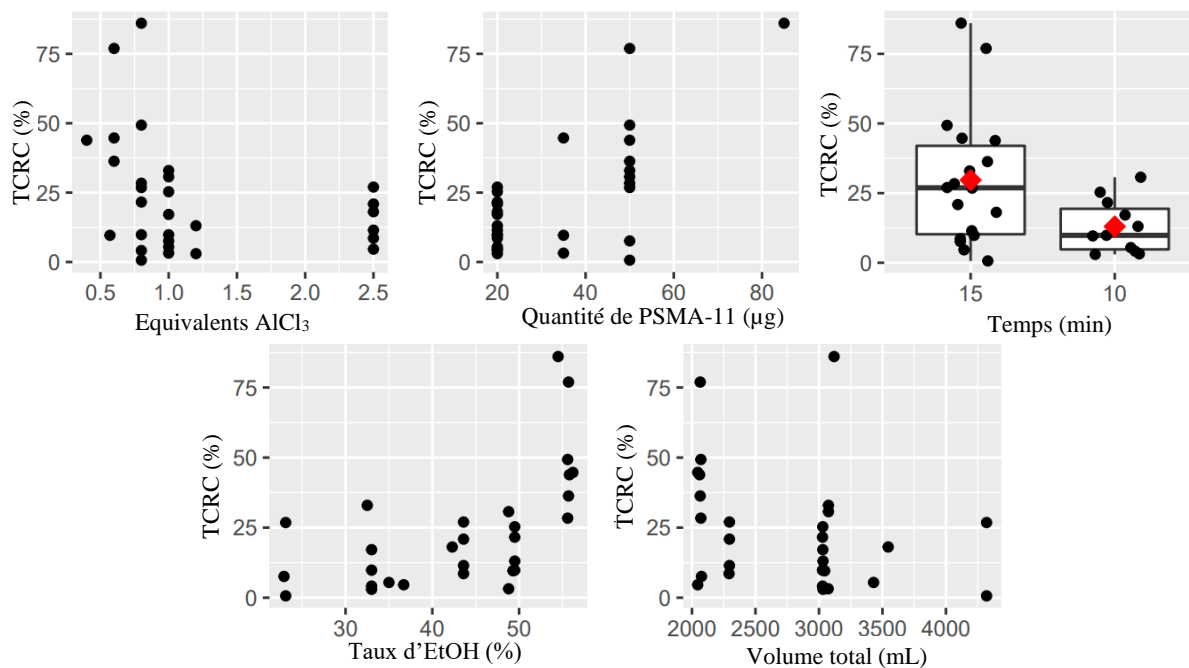


Figure 87 : Graphiques en dispersion des valeurs de TCRC en fonction des valeurs des facteurs équiv. AlCl₃, quantité de PSMA-11, temps de radiomarquage, taux d'EtOH et volume total

Vu qu'il s'agit d'une étude préliminaire, une équation linéaire du premier ordre (E17) est à résoudre. Elle est de type :

$$Y_1 = b_0 + b_1u_1 + b_2u_2 + b_3u_3 + b_4u_4 + b_5u_5 + E \quad (E17)$$

Après résolution de l'équation, des coefficients sont obtenus et sont présentés sous forme d'un graphique en forêt (Tableau 38).

Tableau 38 : Coefficients centrés de la régression calculée à partir des résultats préliminaires et présentés sous forme de graphiques en forêt

Facteur	N	Estimation	Coefficient	P value
Eq Al	29		b ₁ -9,96	0,053
Quantité de PSMA-11	29		b ₂ 30,65	0,049
Taux d'EtOH	29		b ₃ 9,26	0,004
Volume total	29		b ₄ -5,01	0,564
Temps	15		Référence	
	10		b ₅ -1,22	0,883

Concernant le temps de radiomarquage, celui-ci ne montre pas d'impact significatif sur le TCRC pour des valeurs testées de 10 et 15 min. Concernant les autres facteurs, le nombre d'équiv. en AlCl_3 , la quantité de PSMA-11 et le taux d'EtOH ont un impact significatif, respectivement, négatif, positif et positif sur le TCRC. En effet, pour qu'un facteur ait un impact significatif sur la réponse, il faut que la barre d'erreur soit uniquement d'un côté de la valeur 0 (ligne verticale en pointillés). Toutefois un effet avec une large barre qui croiserait la valeur 0 peut aussi signifier un facteur critique car il y a un risque non négligeable qu'il ait un effet important sur la réponse. Dans ce cas, des essais complémentaires doivent être réalisés pour améliorer la précision d'estimation du coefficient en question.

1.5.4.3.2. Plan d'optimisation pour l'étude du radiomarquage en mode automatique

Pour l'optimisation du radiomarquage en mode automatique sur AIO[®], nous décidons d'utiliser à nouveau le plan de Hartley comme pour l'optimisation du radiomarquage en mode manuel dont les caractéristiques sont présentées en Tableau 34. Pour des contraintes techniques et de temps, il a été décidé de ne pas réaliser un duplicat du plan mais simplement cinq réplicats du point central du domaine. Cela permet de réaliser le plan en 21 essais contre 34 essais pour un duplicat du plan et contre 256 tests pour la méthode factorielle complète.

Cette fois-ci, les résultats présentés ici seront ceux obtenus sur la réponse TCRC mesurée par radio-UHPLC. Les résultats obtenus pour la réponse TCRC mesurée par radio-CCM sont disponibles en Annexe 23 et sont comparés avec les résultats TCRC mesurés par radio-UHPLC en fin de cette partie.

Les graphiques de distribution et de dispersion montrent des conditions permettant d'atteindre les 80% de TCRC (Figure 88). Tout comme pour le plan d'optimisation du radiomarquage en mode manuel, le taux d'EtOH semble avoir un effet positif sur le TCRC. Cependant, il est difficile de conclure sur les trois autres facteurs.

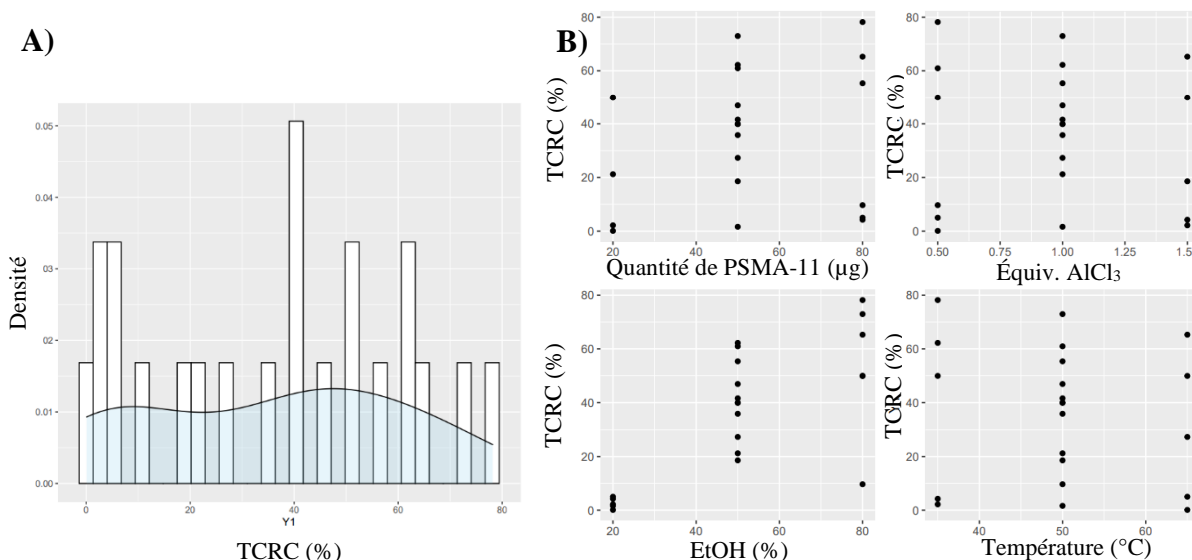


Figure 88 : A) Histogramme et densité de Y_1 (valeurs de TCRC obtenues par radio-HPLC).
 B) Graphiques en dispersion de Y_1 en fonction des valeurs des quatre facteurs

L'équation du modèle de régression du second ordre (E18) peut être résolue. Pour rappel, u_1 : quantité de PSMA-11, u_2 : équiv. $AlCl_3$, u_3 : température, u_4 : %EtOH.

$$Y_2 = b_0 + b_1u_1 + b_2u_2 + b_3u_3 + b_4u_4 + b_{33}u_3^2 + b_{12}u_1u_2 + b_{13}u_1u_3 + b_{14}u_1u_4 + b_{23}u_2u_3 + E \quad (E18)$$

$$Y_2 = -1,418 + 0,035u_1 - 2,7511u_2 - 0,1362u_3 + 0,1927u_4 - 0,0017u_4^2 - 0,02u_1u_2 + 0,0007u_1u_3 - 0,0006u_1u_4 + 0,0825u_2u_4 + E \quad (E19)$$

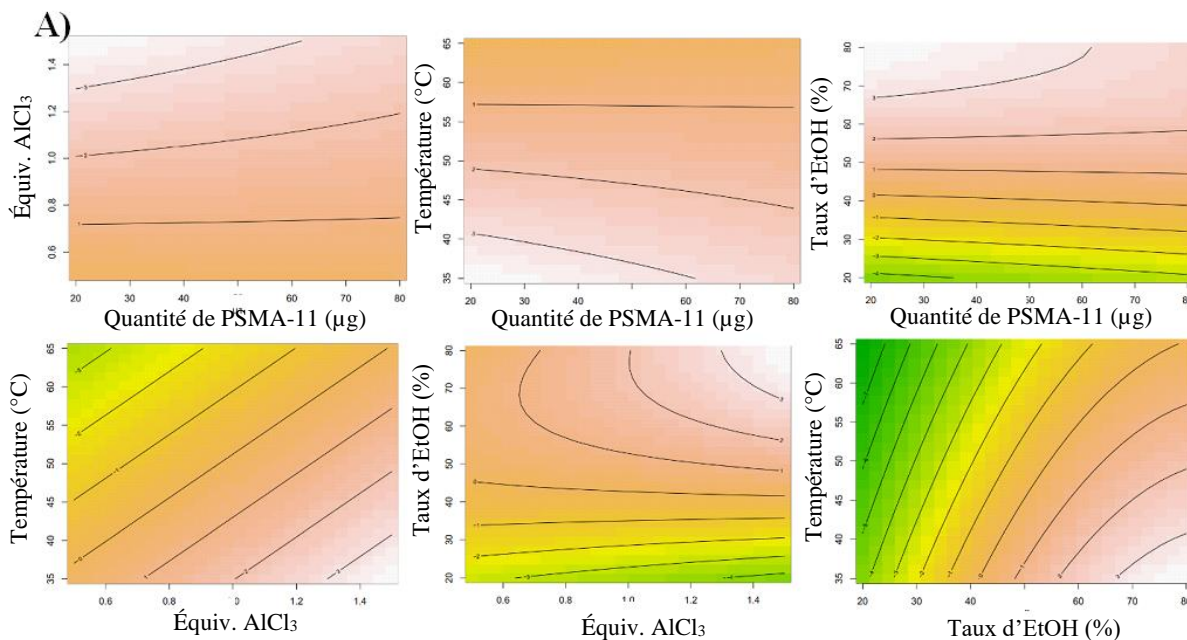
Les coefficients de chacun des facteurs sont présentés dans l'équation (E19). Les quatre facteurs de l'étude ont un impact sur le TCRC, ce qui confirme les résultats de l'étude préliminaire. Plus la quantité de PSMA-11 et le taux d'EtOH sont élevés et meilleur est le TCRC. À l'inverse, plus le nombre d'équiv. d' $AlCl_3$ et la température de radiomarquage sont faibles et meilleur est le TCRC. La principale différence avec les résultats obtenus pour l'étude du radiomarquage en mode manuel, est que l'effet de la température de radiomarquage n'est pas le même ici. En mode manuel, plus la température été élevée et meilleur était le TCRC alors qu'en automatique, c'est l'inverse. Un effet quadratique est observé pour la température de radiomarquage (u_3), signifiant la présence d'un optimum. La température présente des effets d'interactions avec les facteurs quantité de PSMA-11 et nombre d'équiv. d' $AlCl_3$. De plus, des effets d'interactions entre la quantité de PSMA-11 avec le nombre d'équiv. d' $AlCl_3$ et le taux d'EtOH sont observés alors que ces effets n'étaient pas observés pour le radiomarquage en mode manuel.

La résolution du plan a permis d'obtenir des valeurs de R^2 et R^2 ajusté de 0,9029 et 0,83, respectivement. Ces résultats sont très satisfaisants et montrent ainsi que le modèle choisi a une

qualité suffisante pour prédire correctement les conditions à employer pour atteindre la cible de 80%. Les valeurs de R^2 et R^2 ajusté obtenues pour le plan d'optimisation du radiomarquage en mode automatique sont meilleurs que ceux obtenus en mode manuel, ce qui laisse penser que ce modèle est encore plus robuste que celui réalisé précédemment.

1.5.4.3.3. Prédiction du modèle

Les cartes prédictives et les *design space* montrent que plus la quantité de PSMA-11 et la température de radiomarquage sont faibles, et plus le TCRC est élevé, tandis que plus le taux d'EtOH et le nombre d'équiv. d' $AlCl_3$ sont élevés, et plus le TCRC est grand (Figure 89A). Les *design space* mettent en évidence que la quantité de PSMA-11 utilisée n'a que peu d'impact sur le TCRC lorsque les trois autres facteurs sont correctement choisis (Figure 89B). Cela se concrétise par une bande verte dans les deux cubes présentés quelle que soit la quantité de PSMA-11 utilisée. Ces conclusions sont en dissonance avec les conclusions obtenues après l'optimisation du radiomarquage en mode manuel. Elles montraient que plus la quantité de PSMA-11 et d'EtOH et la température étaient élevées et meilleur était le TCRC et plus le nombre d'équiv. d' $AlCl_3$ était faible et meilleur est le TCRC (meilleures conditions prédites : 68-80 μ g de PSMA-11, 0,5 équiv. d' $AlCl_3$, 65°C, 80% d'EtOH).



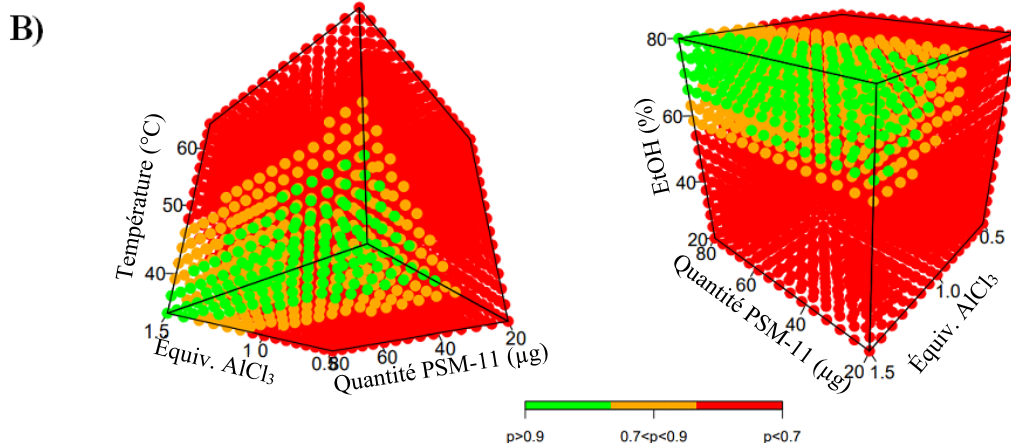


Figure 89 : A) Modèles de surface de réponse pour Y_1 . Ces graphiques sont présentés pour des valeurs fixées des facteurs (quantité de PSMA-11 (20 μg), équiv. d' AlCl_3 (1,5), température de radiomarquage (35°C) et taux d'EtOH (80%)) lorsque ceux-ci ne sont pas étudiés sur le graphique. B) *Design space* pour un TCRC mesuré par radio-UPHLC > 80%. La température de radiomarquage et le taux d'EtOH sont fixés à 35°C et 80%, respectivement, lorsqu'ils ne sont pas étudiés

Le modèle obtenu par l'analyse des résultats de TCRC mesuré par radio-CCM (Y_2) est aussi robuste que celui obtenu pour Y_1 . En effet, des R^2 et R^2 ajusté de 0,8993 et 0,8239, respectivement, sont obtenus. Concernant l'analyse du TCRC mesuré par radio-CCM, des résultats légèrement différents de ceux mesurés par radio-UHPLC sont observés. En effet, un effet quadratique est observé pour la quantité de PSMA-11 montrant un optimum autour de 60 μg . La résolution du plan d'optimisation permet ainsi de prédire des conditions expérimentales permettant d'atteindre la meilleure valeur possible de TCRC. Ainsi, le modèle réalisé sur le TCRC mesuré par radio-UHPLC prédit un TCRC de 90,29% avec un intervalle de confiance à 95% de [72,12 – 99,84] % pour 20 μg de PSMA-11, 1,5 équiv. d' AlCl_3 , une température de radiomarquage de 35°C et un taux d'EtOH de 80%. Le modèle réalisé sur le TCRC mesuré par radio-CCM prédit un TCRC de 89,93% avec un intervalle de confiance à 95% de [62,53 – 99,03] % pour 62,86 μg de PSMA-11, 0,5 équiv. d' AlCl_3 , une température de radiomarquage de 35°C et un taux d'EtOH de 45,71%. Ainsi, les deux meilleures conditions prédites par les deux modèles sont très différentes mais permettent toutes les deux d'atteindre, selon les prédictions, des valeurs de TCRC supérieures à la cible de 80%.

1.5.4.3.4. Validation du modèle

La réalisation des essais utilisant les conditions prédites par les deux modèles permet de valider ou non ces modèles en comparant les valeurs des TCRC prédites (théoriques) et expérimentaux (Tableau 39).

Tableau 39 : Résultats de TCRC prédits (théoriques) et expérimentaux utilisant les conditions prédites par les deux modèles (n = 2)

	TCRC (%)		PSMA-11 (μg)	Conditions prédites		
	Radio-UHPLC	Radio-CCM		AlCl ₃ (Équiv.)	T (°C)	EtOH (%)
Théorique	90,29 ^a		20	1,5	35	80
Expérimental	84 \pm 1	91 \pm 2				
Théorique	89,93 ^b		62,86	0,5	35	45,17
Expérimental	50 \pm 1	64 \pm 2				

Intervalle de confiance à 95% : ^a 72,12 – 99,84% (modèle radio-UHPLC) ; ^b 62,53 – 99,03% (modèle radio-CCM)

Les valeurs expérimentales sont toutes comprises dans les intervalles de confiance correspondants. Cependant, les conditions optimales déterminées par l'analyse de la réponse TCRC mesurée par radio-CCM ne permettent pas d'obtenir un résultat atteignant la cible de 80% (65%). Les résultats de TCRC mesuré par radio-UHPLC sont très proches du TCRC théorique (84 et 90,29%, respectivement). Une différence de TCRC expérimentale et théorique de 6% est observée. Les résultats du TCRC mesuré par radio-CCM sont éloignés du TCRC théorique (65% et 89,93%, respectivement). La valeur de TCRC expérimentale est inférieure à la valeur théorique de 15%. Les résultats théoriques et expérimentaux obtenus par radio-UHPLC étant très proches, le modèle correspondant est validé et il peut être utilisé pour prédire l'ensemble des valeurs pouvant être obtenues sur l'ensemble du domaine. Cependant, le modèle obtenu par des mesures en radio-CCM n'est pas validé. Les résultats obtenus doivent être réinjectés dans le modèle mathématique pour l'alimenter et le corriger.

1.5.5. Purification

1.5.5.1. État de l'art

Une fois l'étape de radiomarquage optimisée, l'étape suivante de la radiosynthèse, soit l'étape de **purification**, est étudiée. Cette étape consiste à séparer le fluor-18 libre du [¹⁸F]AlF-PSMA-11. Pour cela, des cartouches d'extraction en phase solide de différentes natures peuvent être utilisées. Les plus utilisées pour la purification des radiotraceurs marqués à l'Al¹⁸F sont des cartouches de phases C18 ou HLB. Le principe consiste à accrocher les composés organiques (radiotraceur et précurseur) sur la phase stationnaire afin d'éliminer le fluor-18 qui n'a pas réagi

à l'aide de rinçages successifs avec une solution aqueuse. Dans un second temps, l'élution des composés organiques est effectuée avec un solvant moins polaire que l'eau comme l'EtOH.

Liu *et al.* et Giglio *et al.* ont décrits l'utilisation de techniques de purification par HPLC mais cela a eu pour conséquence des temps de radiosynthèse plus longs (25 min de purification).^[103,108] La majorité des auteurs préfèrent l'utilisation de techniques de purification par SPE. Cette technique comporte quatre étapes :

- Diluer le milieu réactionnel dans le cas où il contient de l'EtOH,
- Accrocher le radiotraceur sur un support solide de phase inverse : HLB (Entrées 1, 4-7, 9 et 10 Tableau 40) ou C18 (Entrées 2, 3, 7 et 8, Tableau 40),
- Laver le composé afin d'éliminer le [¹⁸F]NaF qui n'aurait pas réagi,
- Éluer le radiotraceur par une solution d'EtOH pur (Entrées 2 et 7-9), ou un mélange EtOH/H₂O ou EtOH/tampon phosphate ou EtOH/HCl (Entrées 4-6, 10).

Tableau 40 : Exemples de purification de radiotraceur marqué à l'Al¹⁸F

Entrée	Colonne et conditionnement	Lavage	Élution	Formulation (volume)	Réf.
1	Oasis HLB	H ₂ O (3 mL)	EtOH/NaCl 0,9% (2 x 0,2 mL) 1/1 (v/v)	NaCl 0,9 % (NC)	^[290]
2	Sep-Pak [®] light C18 EtOH (5 mL), H ₂ O (10 mL)	NC	EtOH (1,6 mL)	(EtOH/NaAsc 0,59%)/NaCl 0,9% (17,4 mL), 1/12, (v/v)	^[109]
3	Varian Bond Elut C18	H ₂ O (10 mL)	1 mM HCl dans EtOH (0,3 mL)	PBS 1X (NC)	^[107]
4	HLB	H ₂ O (5 mL)	EtOH/H ₂ O (1/1, v/v) (0,3-0,5 mL)	PBS 1X (NC)	^[278]
5	HLB		EtOH/H ₂ O (1/1, v/v) (4 x 0,15 mL)	NC	^[89]
6	HLB	H ₂ O (3 mL)	EtOH/H ₂ O (0,5 mL)	Évaporation 0,5% BSA dans PBS 1X	^[110]
7	HLB ou Sep-Pak [®] C18 light, EtOH (10 mL), H ₂ O (10 mL)	H ₂ O (5 mL)	EtOH (1 mL)	PBS 1X (10 mL)	^[105]
8	Sep-Pak [®] C18 light	NaCl 0,9% (NC)	EtOH (0,5 mL)	NaOAc 0,2 M pH 6,8 (4,5 mL)	^[104]
9	HLB, EtOH (10 mL), H ₂ O (10 mL)	H ₂ O (3 mL)	EtOH (0,5 mL)	Évaporation EtOH, EtOH 1% dans NaCl 0,9%	^[288]

Dans le cas où de l'EtOH est présent dans le brut réactionnel, une dilution par du NaCl 0,9% ou un tampon est indispensable pour obtenir une efficacité d'accrochage optimale. En effet, vu que l'étape de radiomarquage est réalisée avec de l'EtOH, ce dernier peut diminuer l'efficacité d'accrochage si sa concentration est trop importante. Enfin, afin de fournir le radiotraceur dans une solution injectable, une dilution avec divers solutions (NaCl 0,9%, NaOAc, phosphate) est réalisée de sorte que la solution finale contienne moins de 10% d'EtOH.

1.5.5.2. Test des cartouches et des volumes de dilution

L'évaluation de deux cartouches, une Sep-Pak® Plus Short tC18 et une Oasis HLB a été réalisée afin de sélectionner celle qui offre la meilleure efficacité de purification en fonction du taux d'EtOH dans le milieu réactionnel. Un taux d'EtOH après dilution du brut réactionnel inférieur à 20% a été fixé. Afin d'évaluer le taux d'EtOH optimal, trois taux d'EtOH différents (2, 10 et 20%) sont testés pour chaque cartouche afin de connaître le pourcentage maximum requis pour une efficacité d'accrochage optimale (Tableau 41).

Tableau 41 : Évaluation de deux cartouches HLB et tC18 pour la purification du [¹⁸F]AlF-PSMA-11 (n = 2)

EtOH (%) ^a	Efficacité d'accrochage (%)		Efficacité d'élution (%)		Efficacité de purification (%)	
	HLB	tC18	HLB	tC18	HLB	tC18
2	96,2 ± 4,0	97,0 ± 2,0	90,0 ± 0,0	90,5 ± 2,3	85,5 ± 3,2	86,5 ± 2,5
10	98,1 ± 1,6	72,6 ± 1,0	80,5 ± 1,1	85,0 ± 1,4	82,0 ± 4,9	63,0 ± 1,4
20	67,1 ± 0,6	23,0 ± 0,8	74,0 ± 0,7	65,0 ± 4,2	50,5 ± 1,1	13,0 ± 0,0

^a : contenu dans la solution initiale

$$\text{Avec Efficacité d'accrochage} = \frac{A_{\text{accrochée sur cartouche}}}{A_{\text{initiale déposée sur cartouche}} \times TCRC} \times 100$$

$$\text{Avec Efficacité d'élution} = \frac{A_{\text{élulée}}}{A_{\text{accrochée sur cartouche}}} \times 100$$

$$\text{Avec Efficacité de purification} = \frac{A_{\text{élulée}}}{A_{\text{initiale déposée sur cartouche}} \times PRC} \times 100$$

Les résultats d'efficacité présentés dans le Tableau 41 confirment que plus le taux d'EtOH est faible et plus l'efficacité d'accrochage est importante. Sur cartouche HLB, l'efficacité d'accrochage est équivalente pour 2 et 10% d'EtOH avec 96 et 98%, respectivement. Lorsque le taux d'EtOH est de 20%, l'efficacité d'accrochage diminue à 67%. Sur cartouche tC18, l'efficacité d'accrochage est de 97% pour un taux d'EtOH de 2%. Elle diminue à 73 et 23% pour 10 et 20% d'EtOH, respectivement. L'efficacité d'élution est supérieure à 65% pour toutes les conditions testées. Ainsi, les meilleures efficacités de purification sont observées pour des

taux d'EtOH de 2% et 10% pour HLB, et seulement 2% pour tC18 (85,5, 82,0 et 86,5%, respectivement). Ainsi, pour la construction de la séquence automatisée de l'étape de purification, le choix s'est donc porté sur l'utilisation de la cartouche HLB avec une dilution du milieu réactionnel de sorte à être à 10% d'EtOH pour l'accrochage. En effet, 10% nous permet d'avoir une bonne efficacité d'accrochage tout en ayant un volume de solution diluée modéré, qui est adapté à l'échelle des volumes des solutions utilisées sur un module de radiomarquage.

1.5.5.3. Automatisation de l'étape de purification

L'étape de purification est l'étape réalisée après le radiomarquage. Ainsi, les éléments nécessaires à cette étape sont positionnés sur la partie droite du manifold. Cela permet de respecter la règle de « propreté » de la radiosynthèse qui est d'aller de gauche à droite sur le manifold en fonction que l'on se rapproche de la formulation finale. La construction de la séquence est réalisée de la manière suivante (Figure 90) :

- Les positions 13 à 16 présentent les éléments nécessaires à l'étape de purification. Le brut réactionnel, contenu dans le réacteur, est dilué avec 20 mL de NaCl 0,9% de sorte à avoir à un taux d'EtOH final de 10%. Cette solution diluée contenant le [¹⁸F]AIF-PSMA-11 est purifiée sur la cartouche HLB (position 15) sur laquelle il s'accroche. L'activité restante dans le réacteur est rincée avec 5 mL de NaCl 0,9% avant d'être transférée sur la cartouche HLB.
- Le [¹⁸F]AIF-PSMA-11 est ensuite élué par 1 mL d'EtOH dans le flacon final en position 12. Une dilution finale est effectuée avec 9 mL de NaCl 0,9% afin d'avoir un taux d'EtOH final de 10%.

1.5.6. Automatisation totale

Les trois étapes du radiomarquage à l'Al¹⁸F ont été optimisées séparément. À présent, la séquence d'automatisation totale est réalisée avec les trois étapes réalisées successivement. La représentation graphique de l'automatisation totale est présentée en Figure 90. La radiosynthèse est suivie en temps réel à l'aide de capteurs d'activité placés à des endroits stratégiques de la synthèse (cartouche QMA, réacteur, cartouche HLB). La courbe de radioactivité permettant le suivi de la radiosynthèse automatisée de [¹⁸F]AIF-PSMA-11 est présentée en Annexe 24.

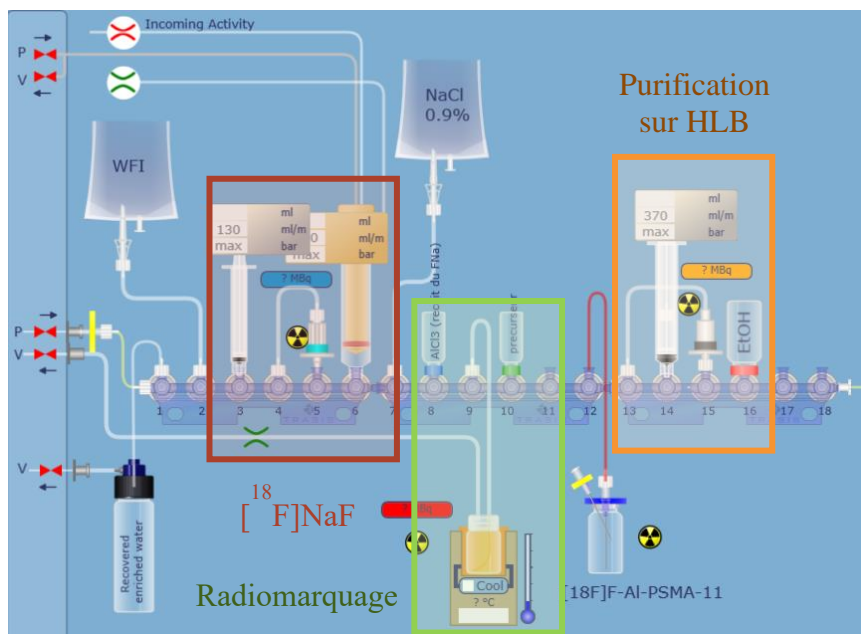


Figure 90 : Représentation graphique de la séquence de radiosynthèse de $[^{18}\text{F}]\text{AlF-PSMA-11}$ sur AIO[®]

Selon les données précédentes (Partie 1.5.1, Chapitre 5), l'étape de production du $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ fournit un RRC de $81 \pm 3\%$ ($n = 12$). L'étape de radiomarquage a été optimisée à l'aide des plans d'expériences et a conduit à l'obtention d'un TCRC de $91 \pm 2\%$ (Tableau 39). Pour des raisons pratiques, l'étape de purification n'a pas été évaluée seule sur automate, mais les essais en mode manuel (Tableau 41) laissent penser que l'on peut atteindre une efficacité de purification de 82%.

La séquence de radiomarquage totale conduit à l'obtention d'un RRC de $53\% \pm 1\%$ ($n = 3$) et une pureté radiochimique de 97%. Le temps de radiosynthèse, depuis la réception de l'activité jusqu'à la purification, est de 40 min. La littérature présente sept articles réalisant ce type de radiomarquage sur automate, dont deux concernant le PSMA-11 mais sans utilisation du module AIO[®] (Tableau 42).

Le RRC de $53 \pm 1\%$ obtenu pour le radiomarquage du PSMA-11 est plus de deux fois supérieur à ceux obtenus dans la littérature (18 et 21% ncd, Entrées 1 et 2, Tableau 42).^[103,279] Concernant l'ensemble des radiomarquages à l' Al^{18}F réalisés sur automate, seul le radiomarquage du $[^{18}\text{F}]\text{AlF-NOTA-octreotide}$ par Allott *et al.* présente un RRC similaire à celui que nous avons obtenus ($56,2 \pm 4,2\%$ cd) (Entrée 4, Tableau 42), les autres RRC étant tous inférieurs au nôtre.^[278] Concernant l'ensemble des radiosynthèses réalisées sur AIO[®] (Entrées 3, 4, 6, 8, 10-12, Tableau 42), les RRC obtenus varient de 15 à 56% cd. Ainsi, le RRC obtenu grâce à cette étude est élevé comparé à ceux obtenus par les autres équipes de recherche. Concernant le temps

de radiosynthèse obtenu avec notre méthode d'automatisation, il est dans la gamme des temps de radiomarquage présentée par les autres équipes (de 25 à 42 min). Une analyse par chromatographie gaz (GC) a permis de montrer qu'une concentration en EtOH ($8,9 \pm 1,1\%$, $n = 5$) dans la solution de reformulation est bien inférieure à 10%, respectant donc les spécifications.

Tableau 42 : Comparaison des résultats des radiomarquages à l' $Al^{18}F$ en mode automatique

Précurseur	Entrée	Module	RRC (%)	PRC (%)	Tps (min)	Ref.
PSMA-11	1	TracerLab™ FXFN (GE)	18 ± 3 ncd	95 ± 3	NC	[103]
	2	SynthraFCHOL (Synthra)	21 ± 3 ncd	>95	35	[279]
NOTA-octreotide	3	AIO® (Trasis)	$26,1 \pm 3,6$ cd	$96,3 \pm 0,2$	40 ± 3	[109]
	4	AIO® (Trasis)	$56,2 \pm 4,2$ cd	>98	26-35	[278]
	5	TracerLab™ FXFN (GE)	$29,4 \pm 4,6$ cd			
NOTA-RGDfK	6	AIO® (Trasis)	$15,3 \pm 6,5$ cd	>98	26-35	[278]
	7	TracerLab™ FXFN (GE)	$17,9 \pm 3,9$ cd			
NOTA-Tz	8	AIO® (Trasis)	$48,2 \pm 1,4$ cd	>98	26-35	[278]
	9	TracerLab™ FXFN (GE)	$27,5 \pm 6,8$ cd			
NOTA-FAPI-04	10	AIO® (Trasis)	$26,4 \pm 1,5$ cd	>99	25	[280]
P-FAPI	11	AIO® (Trasis)	32 ± 6 ncd	>95	42	[281]
FAPI-42	12	AIO® (Trasis)	28 ± 8 ncd	>95	42	[281]
FAPI-74	13	CFN-MPS200 (Sumitomo Heavy Industries)	$37,0 \pm 4,3$	>97	31	[282]

NC : non communiqué, cd : corrigé de la décroissance, ncd : non corrigé de la décroissance

Une étude de stabilité sur 3 heures a été effectuée pour le produit reformulé (10% EtOH dans NaCl 0,9%) (Figure 91).

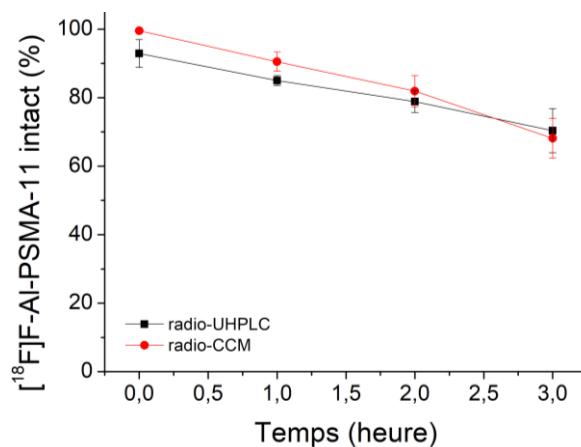


Figure 91 : Étude de stabilité sur 3 heures de $[^{18}F]AlF$ -PSMA-11 dans la solution de reformulation : 10% EtOH dans NaCl 0,9% ($n = 2$)

La PRC du [^{18}F]AlF-PSMA-11 en solution est analysée toutes les heures par radio-UHPLC et radio-CCM et l'aire du pic de [^{18}F]AlF-PSMA-11 est reportée sur le graphique. Une diminution de la proportion de [^{18}F]AlF-PSMA-11 par rapport au [^{18}F]NaF est observée avec une diminution moyenne de 25% pour la mesure radio-UHPLC (passage de la PRC de 93% à 71%) et de 31% en moyenne pour la mesure radio-CCM (passage de la PRC de 99% à 68%). Comme présenté plus haut, Lütje *et al.* ont montré que la stabilité du [^{18}F]AlF-PSMA-11 dépend du milieu.^[289] Après 3 heures dans l'eau, la PRC n'est que de 64,5%, tandis qu'elle est de 98,5% dans un tampon NH_4OAc . De même, Al-Momani *et al.* observent une décomplexation de [^{18}F]AlF-PSMA-11 après 1 heure dans du PBS. Cependant après 4 heures dans un milieu NaCl 0,9% contenant 1% d'EtOH, aucune décomplexation n'est observée.^[288] De ce fait, EtOH/NaCl 0,9% 1/9 (v,v) n'est probablement pas la meilleure solution de formulation pour permettre une bonne stabilité du [^{18}F]AlF-PSMA-11. En perspective de ce travail, une reformulation dans d'autres solutions comme du tampon NH_4OAc ou du PBS pourrait être testée afin de réaliser des tests de stabilité dans une autre solution finale.

1.5.7. Comparaison du radiomarquage manuel vs. automatique

Compte-tenu des conditions de radiomarquage différentes pour les radiomarquages en mode manuel et automatique, deux études ont été conduites pour optimiser le radiomarquage du PSMA-11 par la stratégie Al^{18}F . Les deux études montrent des conclusions identiques concernant l'impact de certains facteurs, comme utiliser un taux d'EtOH (> 65%) afin d'obtenir un bon TCRC. Cependant, elles montrent également des conclusions différentes quant à l'impact de la quantité de PSMA-11, du nombre d'équiv. d' AlCl_3 et de la température de radiomarquage. Pour le radiomarquage en mode manuel, plus la quantité de PSMA-11 et la température de radiomarquage sont élevées, et meilleur est le TCRC et aussi, plus le nombre d'équiv. d' AlCl_3 est faible et meilleur est le TCRC. Au contraire, le radiomarquage en mode automatique montre que ces conclusions sont inversées. Cela peut s'expliquer par les différences de procédés entre le radiomarquage en mode manuel et automatique. Ainsi, les imprécisions de prélèvements par pousse-seringue sur automate peuvent créer des disparités, tout comme les volumes morts des fioles après l'ajout des solutions dans le réacteur. De plus, le brut réactionnel est agité mécaniquement en mode manuel et à l'aide d'un bullage à l'azote en mode automatique, ce qui a probablement un grand impact sur le TCRC. De plus, en mode manuel, la solution est ajoutée sur le ThermoMixer[®] déjà à bonne température tandis que sur le module de radiosynthèse AIO[®], l'étape de chauffage démarre au moment de l'ajout des réactifs. Ainsi, le temps de chauffage n'est pas exactement celui fixé et la stabilisation de la température

du four peut prendre un certain temps pendant lequel, la valeur de la température peut avoir un impact sur le TCRC. Cependant, les meilleures conditions déterminées en mode automatique permettent l'utilisation de 20 µg de PSMA-11 contre 80 µg en manuel. Cela permet de diminuer le coût de la synthèse, d'économiser du précurseur et de ne pas dépasser la quantité maximale légale de PSMA-11 à injecter même avec un grand volume d'injection.

2. Radiomarquage de l'ACB NO2A-AHM

2.1. Radiomarquage à l' $Al^{18}F$ du NO2A-AHM

Maintenant que le radiomarquage par stratégie $Al^{18}F$ a été mis en place à Nancyclotep et que les impacts de divers facteurs sur le TCRC ont été évalués, il est possible de transposer les meilleures conditions de radiomarquage pour la radiosynthèse du $[^{18}F]AlF-NO2A-AHM$. Cependant, il sera nécessaire de rectifier le choix de la température de radiomarquage. En effet, d'après la littérature et les données présentées Tableau 31, la température optimale de radiomarquage dépend du type d'agent chélatant. D'après les études de complexation à l' $Al^{18}F$ présentées au Chapitre 3, la température permettant un taux de conversion >99% doit être supérieure à 70°C.

La preuve de concept du radiomarquage de **NO2A-AHM** a été réalisée. Pour cela, du $[^{18}F]NaF$ est mis en contact avec de l' $AlCl_3$ pendant 5 min à TA pour former un complexe $\{Al^{18}F\}^{2+}$. Ensuite, **NO2A-AHM** est radiomarqué avec $\{Al^{18}F\}^{2+}$ pendant 15 min à 90°C dans une solution de tampon NaOAc 0,5 M pH 4,5/EtOH (20/80, v/v). L'impact du nombre d'équiv. d' $AlCl_3$ sur le TCRC a également été étudié.

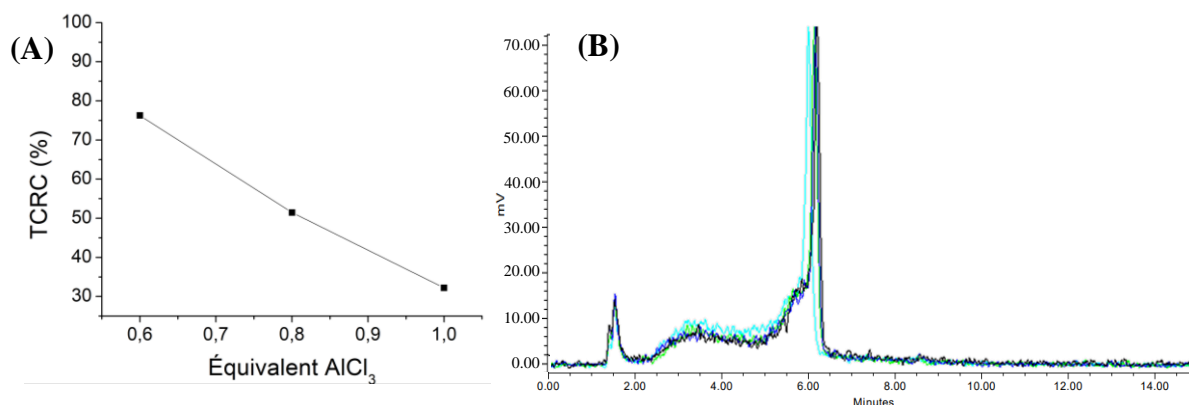


Figure 92 : (A) Évaluation du nombre d'équiv. d' $AlCl_3$ sur le TCRC de $[^{18}F]AlF-NO2A-AHM$ et (B) Chromatogramme à t = 0, 1, 2 et 3 heures après radiomarquage pour l'étude de la stabilité de $[^{18}F]AlF-NO2A-AHM$ dans la solution de radiomarquage (ACE C18 (150 x 3,0

mm, 3 μm), 5 à 50% de B en 10 min, 0,6 mL/min (A : H₂O, 0,1% TFA, B : CH₃CN, 0,1% TFA).

Les résultats présentés dans la Figure 92 montrent que 0,6 équiv. d'AlCl₃ a permis d'obtenir le meilleur TCRC de 76% \pm 8% (n = 4). Le pH final était de 5,1 \pm 0,1 (n = 4) et l'activité molaire moyenne était de 1,0 \pm 0,1 MBq/nmol calculée comme le rapport entre l'activité totale et la quantité molaire de NO₂A-AHM. L'évaluation de la stabilité de la complexation du radiotraceur avec {Al¹⁸F}²⁺ a été déterminée par analyse radio-HPLC pendant 3 heures et n'a montré aucune décomplexation ni dégradation.

2.2. Radiomarquage au gallium-68 du NO₂A-AHM

Le précurseur qui sera testé dans cette étude est le NO₂A-AHM-c(RGDfC). Ce composé a été choisi car il présente une polarité totalement différente du NO₂A-AHM, celle-ci étant dû à l'ajout de la partie de ciblage, et permettra donc une meilleure identification du composé marqué par HPLC.

Les radiosynthèses au gallium-68 sont réalisées sur miniAIO[®] (mAIO[®]) (Trasis). L'automatisation utilise une séquence « faite-maison » permettant de déterminer le TCRC de l'étape de radiomarquage et dont la représentation graphique est présentée Figure 93.

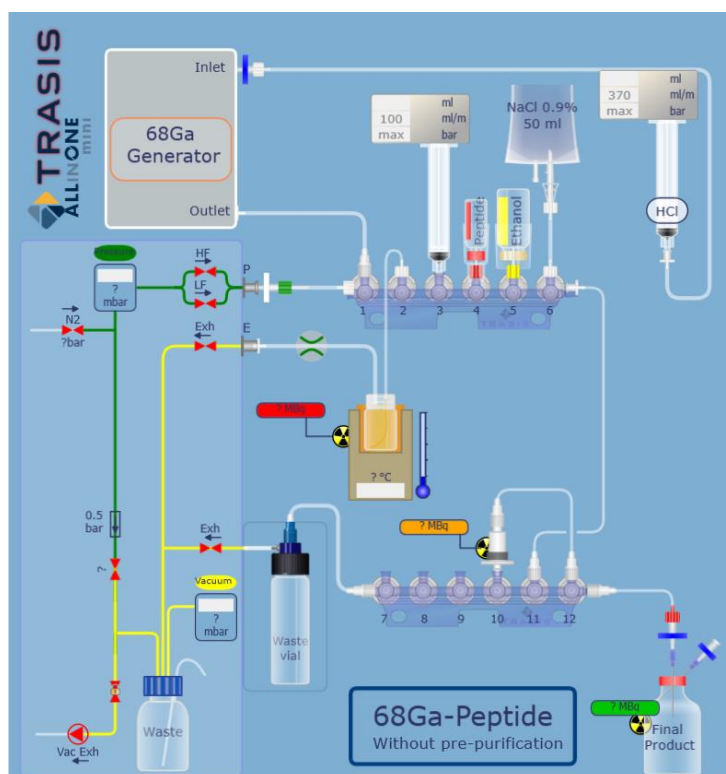
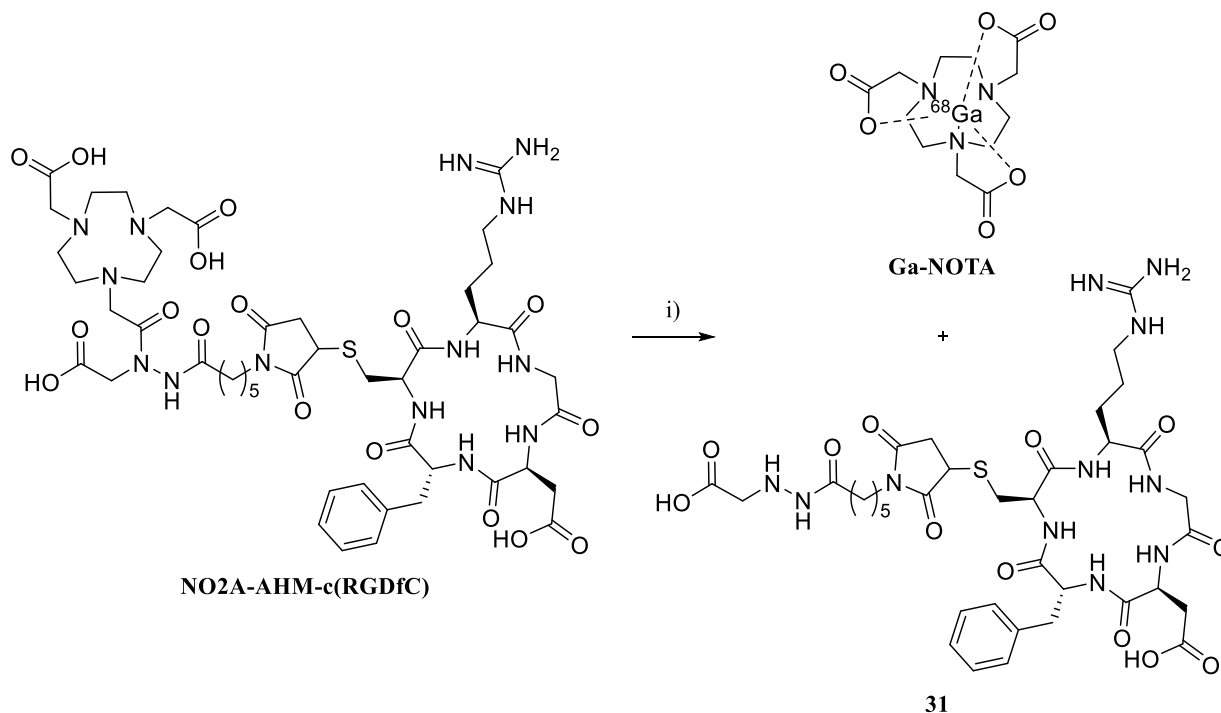


Figure 93 : Interface graphique de la synthèse automatisée de [⁶⁸Ga]Ga-NO₂A-AHM-c(RGDfC) sur mAIO[®] (Trasis)

La séquence d'automatisation comprend 2 étapes. Dans un premier temps, la solution de précurseur en position 4 (Figure 93), contenant un mélange de **NO2A-AHM-c(RGDfC)** (50 μL , 1 mg/mL), H_2O (100 μL), NaAsc fraîchement préparé (350 μL , 0,08 M) et NaOAc (450 μL , 1,5 M), est additionnée dans le réacteur. Dans un second temps, le générateur $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ est élué par de l' HCl (5 mL, 0,1 M) pour obtenir du $^{68}\text{Ga}^{3+}$ en solution qui est ensuite additionné dans le réacteur (position 2, Figure 93). La dernière étape correspond au radiomarquage qui s'effectue à 30°C pendant 10 min (Schéma 48).



Conditions et réactifs : élution gallium-68 par de l' HCl (5 mL, 0,1 M), composé **28** (50 μL , 1 mg/mL), H_2O (100 μL), NaAsc (350 μL , 0,08 M), NaOAc (450 μL , 1,5 M), 10 min, 30°C

Schéma 48 : Radiomarquage du composé **28** au gallium-68

Après radiomarquage, le brut réactionnel est analysé par HPLC et par radio-CCM, afin de déterminer le TCRC. L'analyse HPLC est réalisée dans les conditions développées par Nancyclotep pour l'analyse du composé NODAGA-RGD (5-60%B en 15 min, A : H_2O , 0,1% TFA, B : CH_3CN , 0,1% TFA).^[86] Le chromatogramme en détection radioactive obtenu présente un unique pic ayant un temps de rétention (t_R) de 1,75 min (Figure 94A). Cependant, dans ces mêmes conditions d'analyse, le composé **28** présente un t_R de 12,53 min (détection UV à 220 nm, Figure 94C). Cela indique donc que le composé $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-28}$ n'est pas présent.

Une analyse par radio-CCM est réalisée dans des conditions classiques d'analyse de radioconjugués marqués au gallium-68 (iTLC-SG, $\text{NH}_4\text{OAc}/\text{MeOH}$, 1/1, v/v).^[86,119,223] Le chromatogramme obtenu présente deux pics, un ayant un R_f de 0,015 avec une aire de $2 \pm 2\%$

(n = 3) et un second pic largement majoritaire ayant un Rf de 0,87 avec une aire de $98 \pm 2\%$ (n = 3) (Figure 94B). Le gallium-68 libre ne migrant pas dans ces conditions d'élution, le pic de Rf : 0,015 correspond à ce dernier. Le second pic de Rf : 0,87 correspond donc à un composé marqué au gallium-68 mais qui n'est pas du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-28}$ puisque son temps de rétention est trop éloigné de celui du précurseur **28**.

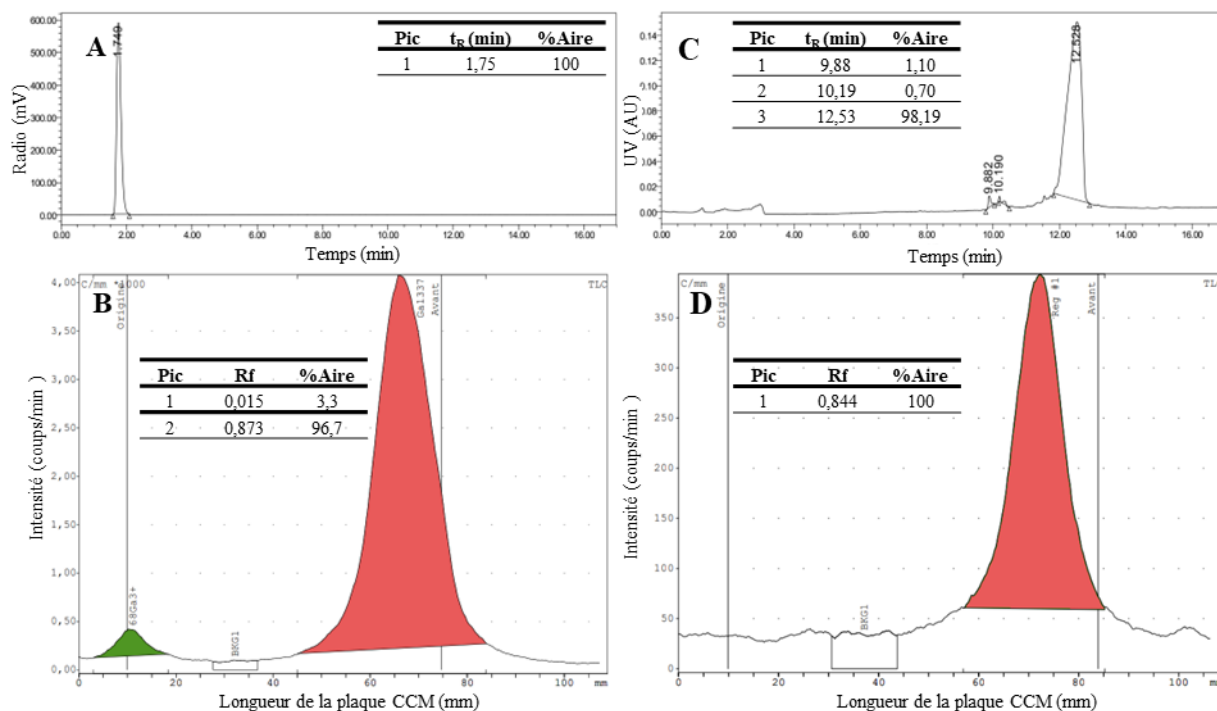
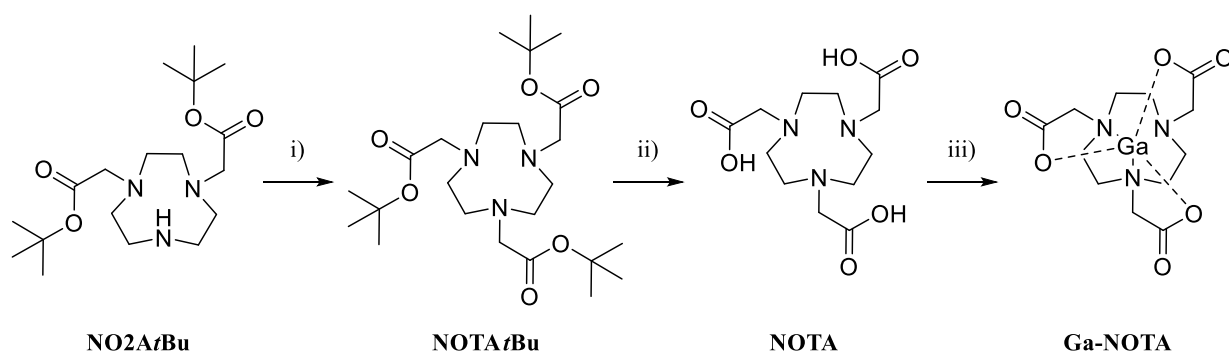


Figure 94 : **A)** Chromatogramme obtenu par radio-HPLC du brut réactionnel. **B)** Chromatogramme obtenu par radio-CCM du brut réactionnel. **C)** Chromatogramme à 220 nm obtenu par UV-HPLC du composé **28**, t_R : 12,53 min. **D)** Chromatogramme obtenu par radio-CCM du pic de t_R : 1,75 min du chromatogramme **A**). Conditions d'analyses **A)** et **C)** : HPLC RP-C18 Ace avantor, 5 – 60%B en 15 min (A : H₂O, 0,1% TFA, B : CH₃CN, 0,1% TFA). Débit : 0,8 mL/min. Conditions **B)** et **D)** : iTLC-SG, NH₄OAc 1 M/MeOH, (1/1, v/v).

Lors de l'analyse HPLC du brut réactionnel, le pic de t_R : 1,75 min est collecté et déposé sur une plaque CCM. Après élution, le chromatogramme obtenu présente un pic de Rf : 0,84 (Figure 94D). Ces résultats montrent qu'un composé organique est radiomarqué mais qu'il ne s'agit pas du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-28}$. Comme avec le gallium-69, ces analyses nous laisseraient penser que le gallium-68 se fait complexer par le précurseur **28** et induit la coupure du précurseur donnant ainsi le composé **NOTA** et le composé **31**. Le gallium-68 est alors capable de rester complexer dans le cycle **NOTA**. Celui-ci étant un composé de faible masse moléculaire et très polaire de par la présence de trois acides carboxyliques, il est tout à fait possible qu'en HPLC sur colonne RP-C18, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA}$ sorte dans le pic d'injection tandis qu'en radio-CCM sur plaque de silice, il migrerait dans les conditions employées.

Afin de valider cette hypothèse, la référence froide **Ga-NOTA** est synthétisée selon le Schéma 49. La synthèse du composé **NOTA** ou de ces dérivés, décrites dans la littérature, sont communément réalisées à partir du TACN (1,4,7-triazacyclononane).^[214] Cependant, la synthèse de ce composé a été réalisée à partir du **NO2A*t*Bu** que nous avons à disposition, puisqu'utilisé pour la synthèse de **NO2A-AHM**. Pour une analyse HPLC-MS avec les mêmes conditions d'analyse que la radiosynthèse, les chromatogrammes des composés **NOTA** et **Ga-NOTA** montrent que les produits sortent dans le pic d'injection (t_R : 2,01 et 2,18 min respectivement) confirmant notre hypothèse. Ces tests de radiomarquage confirment que **NO2A-AHM** ne peut être radiomarqué au gallium-68.

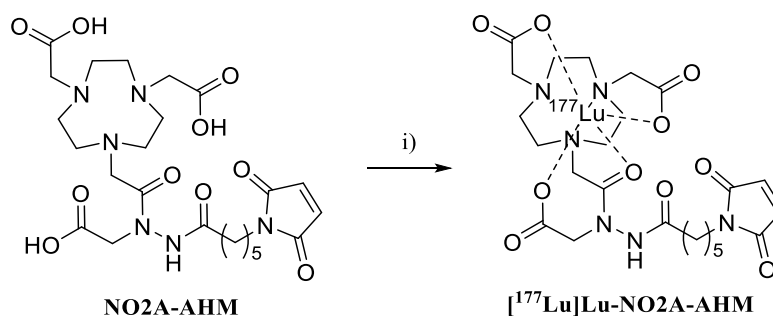


Conditions et réactifs : i) Br-CH₂-COO*t*Bu, K₂CO₃, DMF, 24 h, TA, composé non-isolé ; ii) TFA, DCM, 5 h, TA, 74%. iii) GaCl₃, tampon NaOAc (pH 4,5, 0,1 M), 30 min, 40°C, TC >99%, composé non-isolé.

Schéma 49 : Synthèse de la référence froide **Ga-NOTA**

2.3. Radiomarquage au lutécium-177 du **NO2A-AHM**

Des premiers essais de radiomarquage au lutécium-177 de l'ACB **NO2A-AHM** ont été conduits selon le Schéma 50.



Conditions et réactifs : i) Lutécium-177 dans HCl (0,4 mL, 0,1 M), **NO2A-AHM** (20 μ L, 1 mg/mL), NaAsc 0,56 M (2 mL) ou NaOAc 0,7 M pH 8 (2 mL), 30 min, 40 ou 90°C

Schéma 50 : Radiomarquage de l'ACB **NO2A-AHM** au lutécium-177

Les premières conditions de radiomarquage utilisées sont celles employées pour le radiomarquage au lutécium-177 du PSMA-I&T (DOTA-PSMA) sur EasyOne (Trasis®) dont le protocole a été validé pour la routine clinique. Une solution de **NO2A-AHM** dans du NaAsc (0,56 M, 2 mL) est mise en contact avec 380 MBq de [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ dans 0,4 mL d'HCl 0,1 M. Le radiomarquage est effectué pendant 30 min à 90°C. La détermination du TCRC a été réalisée en utilisant des techniques de radio-HPLC (RP-C18, 5-50% B en 10 min, A : H₂O, 0,1% TFA, B : CH₃CN, 0,1% TFA) et de radio-CCM (iTLC-SG, tampon citrate de sodium 0,5 M pH 5). Le chromatogramme obtenu en radio-HPLC présente un pic dédoublé au niveau du pic d'injection et seulement 0,24% d'un produit marqué au temps de rétention de 5,83 min (correspondant à la référence non-radioactif ^{nat}Lu-**NO2A-AHM**, de t_R (214 nm) : 5,69 min) ((Annexe 25A,B)). L'analyse radio-CCM montre un chromatogramme avec un produit ayant un R_f de 0,9 à 98% correspondant au cation [¹⁷⁷Lu]Lu³⁺ non complexé (Annexe 26A). Nous nous attendions à obtenir un composé qui possède un R_f de 0,0-0,2 comme l'équipe de Eryilmaz et Kilbas l'observe pour le [¹⁷⁷Lu]Lu-FAPI-04 et [¹⁷⁷Lu]Lu-FAPI-46.^[293] Ces résultats peuvent être expliqués soit par le fait que **NO2A-AHM** puisse se faire couper par le lutécium-177 comme le fait le gallium-68, soit que les conditions employés (*i.e.*, : température de 90°C) ne permettent pas de radiomarquer ce nouvel ACB.

Un second essai a été réalisé manuellement afin de modifier la température de radiomarquage, qui ne peut pas être modifiée sur la séquence de radiomarquage sur EasyOne. Des conditions identiques sont employées hormis le fait que la température soit fixée à 40°C. Cette température est choisie puisqu'au cours des études de complexation (Chapitre 3, Partie 2.3.) un radiomarquage à 40°C permettait d'obtenir un TCRC de 98% en 30 min contre 82% de TCRC à 80°C. Les résultats radio-HPLC et radio-CCM obtenus sont identiques au premier test ce qui montre que ce n'est pas la température qui impacte le radiomarquage dans ces conditions.

Un troisième essai a été effectué en essayant de mimer le plus possible les conditions de complexation avec le lutécium-175. Pour cela, le tampon de réaction NaAsc a été remplacé par une solution de NaOAc 0,7 M pH 8. Ainsi, 0,2 mL de la solution de NaOAc est utilisée afin de tamponner la solution de lutécium-177 dans 1 mL d'HCl 0,1 M afin d'ajuster le pH de radiomarquage à 4,5. Le radiomarquage est effectué à 40°C pendant 30 min. Cette fois-ci, le chromatogramme radio-HPLC (Annexe 25C) montre la présence de 2 composés. Le premier présente un t_R de 1,3 min correspondant au pic d'injection (76%). Il correspond donc au [¹⁷⁷Lu]Lu³⁺. Le second composé présente un t_R de 5,87 min (24%) correspondant à celui de la référence ^{nat}Lu-**NO2A-AHM**, ce qui permet de confirmer la formation de [¹⁷⁷Lu]Lu-**NO2A-**

AHM. Le chromatogramme radio-CCM (Annexe 26B) présente également deux composés, un de Rf 0,3 min (42%) qui correspondrait au [¹⁷⁷Lu]Lu-**NO2A-AHM** et un Rf de 0,9 (58%) qui correspond au [¹⁷⁷Lu]Lu³⁺. Ces résultats sont donc prometteurs car ils présentent des TCRC mesurés de 24% et 42% par radio-HPLC et radio-CCM respectivement. L'activité molaire moyenne était de 10,8 ± 2,3 MBq/nmol, calculée comme le rapport entre l'activité totale et la quantité molaire de **NO2A-AHM** utilisée pour la radiosynthèse.

Ces quelques essais ont permis de définir les conditions expérimentales à utiliser pour effectuer un radiomarquage de **NO2A-AHM**. La nature de tampon de radiomarquage semble dans le cas de notre composé avoir un effet sur la stabilité du produit et sur l'efficacité de radiomarquage. Des études d'optimisation et de stabilité du composé radiomarké pourront être conduites ultérieurement sur la plateforme Nancyclotep, afin de compléter ces résultats préliminaires.

3. Conclusion du chapitre

La stratégie de radiomarquage à l'Al¹⁸F a été mise en place à Nancyclotep pour le précurseur de marquage PSMA-11. Une synthèse automatisée sur AIO[®] (Trasis) a été mise en place, et celle-ci comporte une étape de radiosynthèse du [¹⁸F]NaF, précurseur, radiomarquage du PSMA-11 et purification sur cartouche HLB. Plusieurs facteurs ont été étudiés et les conditions de radiomarquage du PSMA-11 ont été optimisées à l'aide de la méthodologie des plans d'expériences et l'analyse statistique des résultats. Cette étude menée en collaboration avec la start-up CYBERNANO a permis de conclure que le nombre d'équiv. d'AlCl₃ a un impact significatif négatif sur le TCRC, tandis que la quantité de précurseur, la température de radiomarquage et le taux d'EtOH ont des impacts significatifs positifs sur le TCRC. Ces conclusions sont valables dans les domaines étudiés. Les meilleures conditions déterminées par le plan d'optimisation nous permettent d'obtenir un TCRC de 98 ± 1% (radio-CCM) pour le mode manuel et 93% en mode automatique. Un RRC de 53% est obtenu.

La transposition de ce travail a été effectuée pour le radiomarquage de **NO2A-AHM** par l'Al¹⁸F et a permis d'obtenir un TCRC de 76% ± 8%. Des essais de radiomarquage au gallium-68 ont permis de confirmer que cet ACB n'est pas approprié puisqu'un clivage de l'ACB est observé au cours du radiomarquage. Concernant le radiomarquage au lutécium-177, une étude préliminaire a été réalisée et a permis d'obtenir un premier résultat encourageant de 24% pour le TCRC.

CONCLUSIONS
GÉNÉRALES ET
PERSPECTIVES

Les progrès en biologie moléculaire et physiologie, associés aux développements i) d'outils diagnostics plus performants et plus fiables, et ii) de thérapies ciblées, ont favorisés une approche plus personnalisée de la médecine qui est encore en plein essor aujourd'hui. Ainsi, en cancérologie, l'approche théranostique, consistant à employer un même composé pharmaceutique pour le diagnostic et le traitement d'un même patient, est en plein essor. La médecine nucléaire est une discipline dans laquelle cette approche est de plus en plus utilisée, notamment grâce au développement de nouveaux radiopharmaceutiques utilisables en imagerie TEP et en RTIV. L'objectif de cette thèse consistait à développer un nouvel ACB pouvant être radiomarqué au fluor-18, gallium-68 et lutécium-177 afin de développer des précurseurs de radiomarquage identiques pour le diagnostic et le traitement. Ainsi, seule la nature du radionucléide devait changer en fonction de l'application. De plus, un objectif était de pouvoir facilement moduler la nature de l'agent de ciblage, en fonction de la nature du récepteur à cibler.

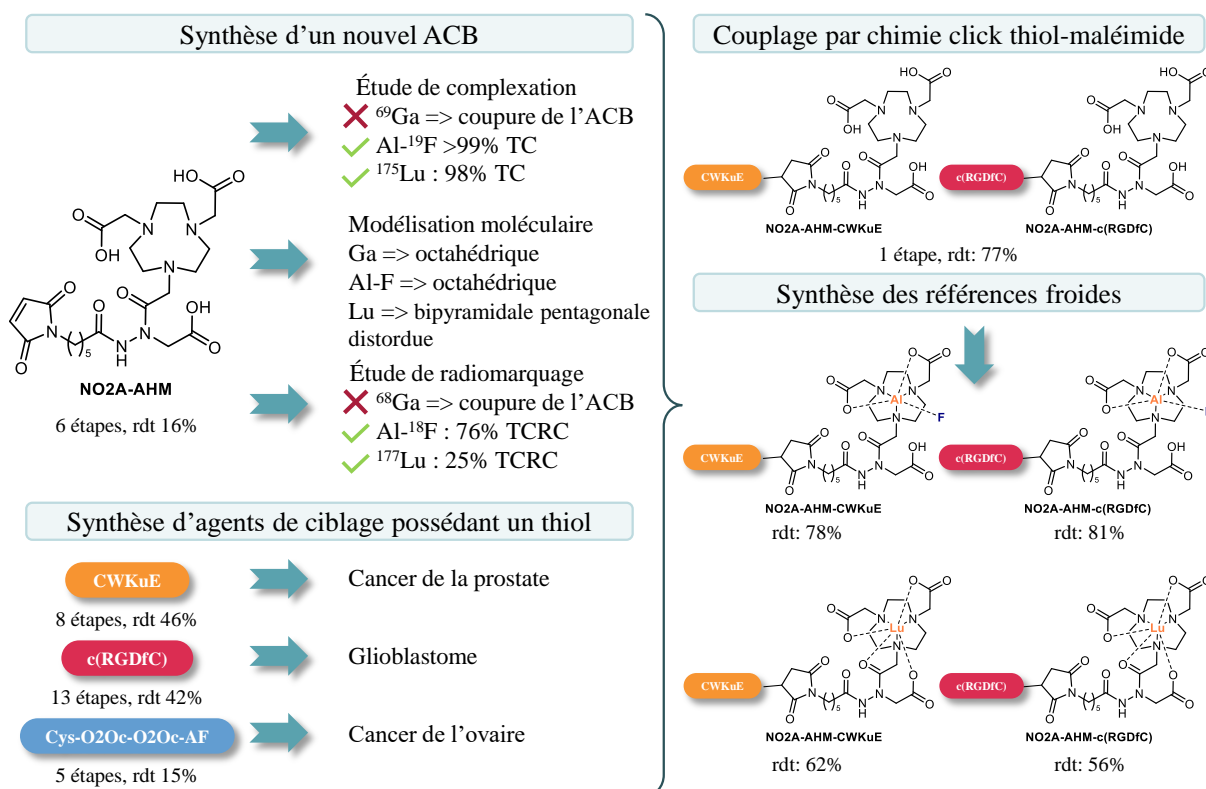


Figure 95 : Récapitulatif des principaux résultats

La combinaison d'un chélateur cyclique et d'un bras chélatant additionnel sur un motif hydrazine, permet la construction d'un chélateur hybride nommé **NO2A-AHM**, conçu au cours de cette thèse. Plusieurs voies de synthèse ont été explorées autour de la polyfonctionnalisation de l'hydrazine et le composé a été synthétisé à l'aide d'une stratégie comportant 6 étapes, avec un rendement global de 16%.

Des études de complexation avec les équiv. non radioactifs de l'aluminium-fluor, du gallium et du lutécium ont été menées. Concernant l'aluminium-fluor et le lutécium, ceux-ci peuvent être complexés par l'ACB développé avec des taux de conversion (TC) de >99% et 98%, respectivement. Le complexe **Al^{nat}F-NO₂A-AHM** possède une très grande stabilité tandis que le complexe **Lu-NO₂A-AHM** présente une stabilité modérée après 18 jours. Cependant avec le gallium, ces études ont mis en évidence le fait que **NO₂A-AHM** n'est pas stable pour un marquage au gallium puisque sa complexation induit une coupure du composé. Des tests d'investigation ont permis de mettre en évidence le fait que les métaux de transitions chargé 3+ (cations trivalents) auraient la capacité d'induire une coupure du composé. Les métaux de transitions chargé 2+ ou les adduits ayant une charge globale 2+ comme {AlF}²⁺ (cations divalents) n'induirait pas la coupure du composé.

En parallèle de ces travaux, des études de modélisation des complexes ont été menées en collaboration avec le Pr Antonio Monari. Les modèles obtenus permettent de mettre en évidence les atomes donneurs impliqués dans la complexation de l'aluminium-fluor, du gallium et du lutécium ainsi que la géométrie des complexes obtenus. Des géométries octaédriques sont observées pour les complexes **AlF-NO₂A-AHM** et **Ga-NO₂A-AHM** et bipyramidale pentagonale distordue pour **Lu-NO₂A-AHM**. Une étude de défluoration du complexe **AlF-NO₂A-AHM** a mis en évidence la très grande force de la liaison Al-F et qu'une compétition entre la complexation de l'aluminium par le bras chélatant et le fluor n'est pas possible.

La versatilité de l'ACB à être couplé à des agents de ciblage a été testée en couplant des agents de ciblage possédant des motifs de reconnaissance DUPA, RGD et AF, couramment utilisés pour le ciblage de récepteur PSMA du cancer de la prostate, des intégrines $\alpha\beta 3$ impliquées dans de nombreux cancers tels que les glioblastomes, et les récepteurs RF α dans le cancer de l'ovaire, respectivement. Le couplage a été réalisé par CCTM entre **NO₂A-AHM** et l'agent de ciblage modifié par l'ajout d'un résidu cystéine. Du fait de la difficulté de solubilisation de l'agent de ciblage à l'AF, seuls les agents de ciblage composés des motifs DUPA et RGD ont été couplés à l'ACB et les références froides à l'aluminium-fluor et au lutécium ont été synthétisées.

Des essais préliminaires de radiomarquage du nouvel ACB ont été entrepris dans ce travail de thèse. Pour ce faire, l'implémentation de la stratégie de radiomarquage Al¹⁸F a été réalisée à Nancyclotep. Le choix s'est porté sur le développement d'une stratégie de radiomarquage automatisée sur AIO[®] du composé PSMA-11. Des études d'optimisation par la méthode des plans d'expériences ont été menées en collaboration avec la start-up CYBERNANO (Pr Thierry

Bastogne) afin d'étudier l'influence de plusieurs facteurs sur le taux de conversion radiochimique. Ces études ont permis de significativement réduire le temps et le coût d'optimisation, tout en ayant des analyses robustes des résultats. Ainsi, un RRC globale de 53% en 40 min a été obtenu sur AIO® pour l'obtention de [¹⁸F]AIF-PSMA-11. Ces travaux préliminaires ont permis de réaliser le radiomarquage de l'ACB **NO2A-AHM** par la stratégie Al¹⁸F en utilisant les connaissances obtenues au cours de la phase d'optimisation du radiomarquage du PSMA-11. Ainsi, un taux de conversion radiochimique de 76% a été obtenu pour le composé [¹⁸F]AIF-**NO2A-AHM**.

Les perspectives de ces travaux à plus ou moins long terme sont multiples, comptes tenus du travail multidisciplinaire qui a été entrepris, à savoir :

- La conception d'un ACB hybride de 2^{ème} génération afin de proposer un composé plus stable pouvant complexer l'aluminium-fluor, le gallium et le lutécium. Une modification de la fonction amide, subissant la coupure au gallium, par un fonction amine pourrait être envisagée.
- La modification de la structure de l'ACB par l'ajout d'un 4^{ème} groupement sur le motif hydrazine. Une tétrafonctionnalisation du motif hydrazine pourrait être envisagée pour développer un agent bimodal, soit par l'ajout i) d'un fluorophore, pour réaliser de la chirurgie guidée par fluorescence,) ou ii) d'une entité, liant l'albumine, pour améliorer les propriétés de biodistribution des radiotraceurs.
- La modification de la structure de l'ACB, par remplacement de la fonction maléimide par une fonction isothiocyanate, pour les couplages des agents de ciblage à l'ACB. L'emploi de cette fonction est très utilisé pour la conjugaison d'anticorps par la formation d'un lien thiourée, et cela permettrait ainsi d'étendre encore plus le panel d'agents de ciblage pouvant être couplés au nouvel ACB.
- L'implémentation systématique d'une étude des complexations du cuivre pour les futurs composés développés. Cela permettrait d'augmenter le nombre de radionucléides pouvant être complexés par le nouvel ACB, d'autant plus que le couple apparié cuivre-64/67 est très étudié en ce moment pour l'approche théranostique. Des études de radiomarquage par ces radionucléides pourraient être envisagées à l'aide de collaboration avec l'IPHC de Strasbourg.
- Le développement d'une nouvelle génération de l'agent de ciblage à l'AF permettrait de pallier le problème de solubilité et donc de réactivité des composés synthétisés. Il pourrait également être envisagé de travailler sur un agent de ciblage des RFA possédant

une structure peptidique comme le peptide C7, ce qui permettrait de pallier ce problème.^[290]

- L'utilisation d'autres agents de ciblage tels que des anticorps ou des nanobodies pourront être envisagés par CCTM ou par formation d'un lien thiourée. Les anticorps, du fait de leur spécificité et les possibilités nouvelles d'ingénierie, sont d'excellents candidats pour cette approche radiothéragnostique avec le couple $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ ou $^{89}\text{Zr}/^{177}\text{Lu}$.
- Le développement des radiosynthèses des composés **NO2A-AHM-CWkuE** et **NO2A-AHM-c(RGDfC)** par la stratégie Al^{18}F et au lutécium-177 en se basant sur les résultats préliminaires obtenus sur l'ACB **NO2A-AHM**.
- La validation de ces nouveaux radiotraceurs *in vitro* par des tests d'affinités cellulaires, détermination des IC_{50} et de toxicité et *in vivo* sur des modèles précliniques de souris possédant des tumeurs surexprimants les récepteurs PSMA et intégrines $\alpha_v\beta_3$. Ces études permettraient de déterminer la biodistribution de ces nouveaux radiotraceurs et la dosimétrie prévisionnelle du traitement thérapeutique au lutécium-177.
- La réalisation d'études d'imagerie TEP et de biodistribution de **[^{18}F]AIF-NO2A-AHM-CWkuE**. Ces résultats pourraient être comparés à ceux d'autres radiotraceurs comme le **[^{68}Ga]Ga-PSMA-11**, connu de Nancyclotep et le **[^{18}F]AIF-PSMA-11**, étudié durant cette thèse. Le **[^{18}F]AIF-NO2A-AHM-c(RGDfC)** pourrait être comparé au **[^{68}Ga]Ga-NODAGA-RGD**, connu de Nancyclotep également.^[86]
- Le développement du radiotracteur **[^{18}F]AIF-PSMA-11** en utilisant des activités plus importantes et dans des conditions pharmaceutiques. Ces études pourront être prochainement entreprises avec un contrôle qualité complet incluant des études de stérilité et de dosage des endotoxines bactériennes. Cette transposition est intéressante car les essais précliniques d'imagerie TEP, présentés dans la littérature et impliquant le **[^{18}F]AIF-PSMA-11** comme radiotraceurs pour le diagnostic de lésions cancéreuses surexprimant les récepteurs PSMA, présentent de bons résultats. Ainsi, des essais cliniques utilisant ce radiotracteur pourraient être envisagés dans quelques années à Nancyclotep.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Reagents and general methods

Unless other stated, all chemicals were purchased at the highest purity commercially available and were used without further purification. Dry solvents were obtained by distillation over P₂O₅ under an argon atmosphere or dried with molecular sieves and other reagent-grade solvents were used as received. NO₂A*t*Bu was purchased from CheMatech (Dijon, France). 2-(1*H*-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU) was purchased from Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Germany). Hydrazine monohydrate, *tert*-butyl carbazate, *N*-methyilmorpholine (NMM), trifluoroacetic acid (TFA), and Lu(NO₃)₃ were purchased from Alfa Aesar (Haverhill, MA, USA). 6-maleimidohexanoic acid, *tert*-butyl bromoacetate, potassium carbonate, NaF and AlCl₃ were obtained from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Bromoacetyl bromide and pyridine were purchased from Acros Organics (Geel, Belgium). All products were used without further purification. Only Milli-Q water (18.2 MΩ/cm) was used for the aqueous solution preparation. All reactions were performed under nitrogen atmosphere.

Centrifugation was performed using Eppendorf 5810 R centrifuge. Product purifications were performed using Geduran 60 H Silica Gel (63-200 mesh) flash chromatography. Preparative HPLC experiments were conducted with a Varian setup equipped with 2 Prostar 210 pumps, a reversed phase Varian Pursuit5 column (5 μm, 21.2 x 150 mm), a Prostar 335 Varian PDA UV-visible detector and a Prostar 363 Varian fluorescence detector. Data acquisition was performed by Varian Star Chromatography software. The column was used at 10 mL/min flow rate and the injection volume was of 10 mL. Purification was performed at 308 nm. Mobile phase A was H₂O with 0.1% of TFA and the mobile phase B was CH₃CN with 0.1% TFA.

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra (¹H, ¹³C) were recorded on a Bruker Advance 300 spectrophotometer in CDCl₃, DMSO-*d*₆ or D₂O at 300 K expected for NMR spectra (¹H, ¹³C, ¹⁹F, ²⁷Al) of compounds **NO₂A-AHM**, **Al^{nat}F-NO₂A-AHM** and **^{nat}Lu-NO₂A-AHM** which were recorded on a Bruker Advance 400 spectrophotometer in D₂O at 300 or 330 K. Chemical shift (δ) were reported in parts per million (ppm) and were referenced to the signal of CDCl₃ (δ = 7.26 and 77.16 ppm for ¹H and ¹³C NMR, respectively) or DMSO-*d*₆ (δ = 2.50 and 39.52 ppm for ¹H and ¹³C NMR, respectively) or D₂O (δ = 4.79 ppm for ¹H). Coupling constants (*J*) are given in hertz (Hz) and the multiplicities are reported as s for singlet, d for doublet, t for triplet, m for multiplet, br for broad, H_{Ar} for aromatic protons or combinations thereof.

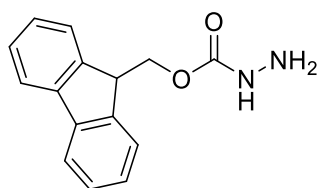
Analytical HPLC-MS analysis was performed on a Shimadzu LC-MS-2020, monitored by a Diode Array Detector SPD-M20A and Mass Spectroscopy Detector (Shimadzu, Marne-la-Vallée, France) using a Pursuit 5[®] C18 column (150 x 4.6 mm, 5 μ m, Varian) (Varian, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The mobile phase A was CH₃CN/H₂O 5/95 (v/v) with 0.1% of formic acid and the mobile phase B was CH₃CN with 0.1% formic acid. The column was used at 0.8 mL/min flow rate of a gradient from 5 to 100% of B for 15 min. The positive ions electrospray ionization (ESI) mode was applied.

High resolution mass spectrometry (HRMS) experiments were performed on a micrOTOF Bruker (electrospray ionization ESI+, 50 – 1000 in low and 50 – 2500 in width).

Melting points were measured with a Büchi M-560 melting-point apparatus.

Organic synthesis

(9H-fluoren-9-yl)methyl hydrazinecarboxylate (**1**)



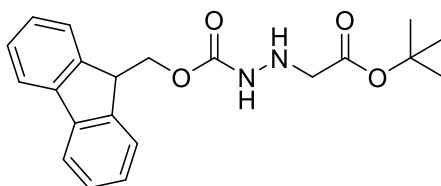
Formula: C₁₅H₁₄N₂O₂

MW: 254.11 g/mol

To a stirred and cooled (0°C) solution of hydrazine hydrate (19 g, 386 mmol, 10 equiv) in CH₃CN/H₂O (150 mL, 1/1, v/v) was added dropwise a solution of Fmoc-Cl (10 g, 38.6 mmol, 1 equiv) in CH₃CN (600 mL) during 2.5 hours. The reaction mixture was slowly raised to room temperature (RT) and stirred overnight. CH₃CN was removed under reduced pressure and compound **1** was precipitated in H₂O (200 mL). The powder was recovered by filtration (fritted glass of porosity 4) and washed successively with H₂O (100 mL) and 1 time with hexane (50 mL). Compound **1** was afforded as white powder (8.9 g, 91%) after drying under reduced pressure and no purification was achieved before the next step.

M: 170°C

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 3.76 (br s, 2H, NH₂), 4.23 (t, 1H, J = 6.9 Hz, CH), 4.45 (d, 2H, J = 6.6 Hz, CH₂), 5.99 (br s, 1H, NH), 7.32 (t, 2H, J = 7.5 Hz, 2 H_{Ar}), 7.41 (t, 2H, J = 7.5 Hz, 2 H_{Ar}), 7.57 (d, 2H, J = 7.2 Hz, 2 H_{Ar}), 7.76 (d, 2H, J = 7.2 Hz, 2 H_{Ar}).

(9H-fluoren-9-yl)methyl 2-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)hydrazine-1-carboxylate (2)Formula: C₂₁H₂₄N₂O₄

MW: 368.43 g/mol

To a stirred and cooled (0°C) solution of compound **1** (1.0 g, 3.9 mmol, 1 equiv) and K₂CO₃ (0.6 g, 3.9 mmol, 1 equiv) in anhydrous DMF (20 mL) under nitrogen atmosphere was added dropwise a solution BrCH₂CO₂-*t*Bu (0.6 mL, 3.9 mmol, 1 equiv) in anhydrous DCM (15 mL) during 15 min. The reaction mixture was stirred 10 min at 0°C and then slowly raised to RT and stirred overnight. H₂O (110 mL) was added to the reaction mixture to stop the reaction. Then, the reaction mixture was extracted with EtOAc (3 x 90 mL). The combined organic phases were washed successively with H₂O (100 mL) and brine (100 mL). The organic phase was dried over MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The crude was purified by silica gel flash column chromatography (petroleum ether/EtOAc, 90/10, v/v) to give compound **2** (478 mg, 33%) as a yellow oil.

Mp: 150°C

Analytical HPLC (5-100% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t: 15.60 min, purity: 56% at 214 nm.

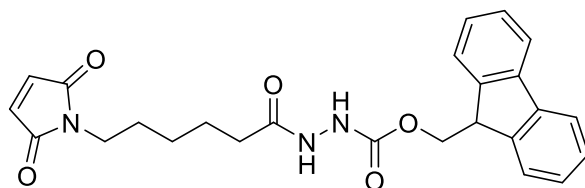
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.48 (s, 9H, (CH₃)₃), 3.54 (s, 2H, (NH-CH₂)), 4.23 (t, 1H, *J* = 6.6 Hz, CH), 4.45 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz, O-CH₂), 6.71 (br s, 1H, NH), 6.92 (br s, 1H, NH), 7.31 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, 2 H_{Ar}), 7.40 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, 2 H_{Ar}), 7.57 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, 2 H_{Ar}), 7.75 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, 2 H_{Ar}).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 28.8 (3 CH₃), 47.8 (CH), 54.1 (NH-CH₂), 67.8 (O-CH₂), 82.7 (C, *t*Bu), 120.7 (2 C_{Ar}), 125.7 (2 C_{Ar}), 127.8 (2 C_{Ar}), 128.4 (2 C_{Ar}), 142.0 (2 C_{Ar}), 144.2 (2 C_{Ar}), 157.4 (NH-C(O)O), 171.3 (C(O)O).

HPLC-MS (ESI) calculated for C₂₁H₂₄N₂O₄Na [M+Na]⁺ m/z 391.16, found 391.10

(9H-fluoren-9-yl)methyl
yl)hexanoyl)hydrazine-1-carboxylate (3)

2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-



Formula: C₂₅H₂₅N₃O₅

MW: 447.49 g/mol

To a stirred and cooled (0°C) solution of the compound **1** (1.0 g, 3.93 mmol, 1 equiv) and NMM (1.73 mL, 15.72 mmol, 4 equiv) in anhydrous DCM (10 mL) was added a solution of 6-maleimidohexanoic acid (831 mg, 3.93 mmol, 1 equiv) in anhydrous DCM (5 mL). HATU (1.5 g, 3.93 mmol, 1 equiv) was dissolved in a minimum amount of anhydrous DMF and added to the reaction mixture. The reaction mixture was slowly raised to RT and stirred for 5 hours. Then, the mixture was diluted in DCM (50 mL) and washed with H₂O (3 x 25 mL). The combined organic phases were washed successively with HCl 0.1 M (10 mL), NaHCO₃ (10 mL) and brine (2 x 20 mL). The organic phase was dried over MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The crude was purified by silica gel flash column chromatography (petroleum ether/EtOAc, 40/60, v/v) to give compound **3** (1.1 g, 68%) as a white powder.

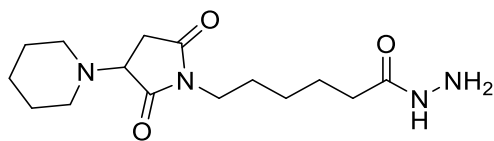
Mp: 132°C

Analytical HPLC (5-100% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t: 13.43 min, purity: 99% at 214 nm.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.18-1.43 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 1.51-1.85 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 2.21 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, CH₂-CONH), 3.45 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-N-(CO)₂), 4.23 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH), 4.42 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz, O-CH₂), 6.65 (s, 2H, HC=CH), 6.99 (br s, 1H, NH), 7.29 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, 2 H_{Ar}), 7.39 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, 2 H_{Ar}), 7.57 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz, 2 H_{Ar}), 7.73 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz, 2 H_{Ar}).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 25.2 (CH₂), 26.7 (CH₂), 28.8 (CH₂), 34.4 (CH₂), 38.2 (CH₂), 47.6 (CH), 68.7 (O-CH₂), 120.7 (2 C_{Ar}), 125.8 (2 C_{Ar}), 127.8 (2 C_{Ar}), 128.5 (2 C_{Ar}), 134.7 (HC=CH), 142.0 (2 CH-C), 144.2 (C-C), 157.1 (NH-COO), 171.6 (CO), 173.1 (NH-CO-CH₂).

HPLC-MS (ESI) calculated for C₂₅H₂₆N₃O₅ [M+H]⁺ m/z 448.18, found 448.20

6-(2,5-dioxo-3-(piperidin-1-yl)pyrrolidin-1-yl)hexanehydrazide (6)Formula: C₁₅H₂₆N₄O₃

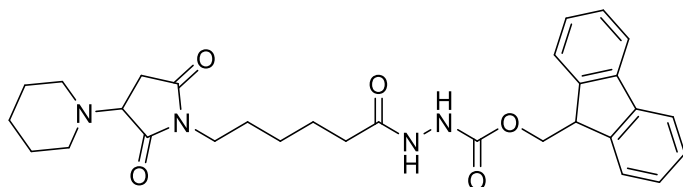
MW: 310.40 g/mol

A solution of compound **3** (60 mg, 0.134 mmol, 1 equiv) and piperidine (43.1 mg, 0.506 mmol, 3.8 equiv) in anhydrous DCM (15 mL) was stirred during 15 min at RT under nitrogen atmosphere. Then, the mixture was washed successively with HCl 1 M (10 mL), H₂O (3 x 15 mL) and brine (15 mL). The aqueous phase was freeze-dried to obtain a white powder containing compound **6**.

Analytical HPLC (5-100% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t: 8.02 min, purity: 85% at 214 nm.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.25-1.75 (m, 12H, CH₂-CH₂-CH₂-N-CH₂-CH₂, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 2.00 (t, 2H, J = 7.2 Hz, CH₂-N-(CO)₂), 2.70-2.81 (m, 2H, CO-CH₂-CH-CO), 1.82-1.96 (m, 7H, CH₂-CH₂-N-CH₂-CH₂, CO-CH₂-CH-CO, CH₂-CONH), 8.18 (br s, 2H, NH₂), 9.00 (br s, 1 H, NH)

HPLC-MS (ESI) calculated for C₁₅H₂₇N₄O₃ [M+H]⁺ m/z 311.20, found 311.15.

(9H-fluoren-9-yl)methyl 2-(6-(2,5-dioxo-3-(piperidin-1-yl)pyrrolidin-1-yl)hexanoyl)hydrazine-1-carboxylate (7)Formula: C₃₀H₃₆N₄O₅

MW: 532.64 g/mol

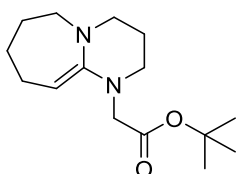
A solution of compound **3** (100 mg, 0.224 mmol, 1 equiv) and piperidine (18.9 mg, 0.223 mmol, 1 equiv) in anhydrous DCM (15 mL) was stirred during 2 hours at RT under nitrogen atmosphere. Then, the mixture was washed with successively HCl 1 M (10 mL), H₂O (3 x 15 mL) and brine (15 mL). The organic phase was dried over MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. Purification was achieved on RP-C18 phase (150 x 21 mm, 5 μm, Varian Pursuit 5[®]). The crude was purified by a gradient of 5% to 100% of B in 15 min. The flow rate was 8 mL/min and the injection volume was 10 mL. The peaks were detected by UV at 254 nm with a R_t of 16.08 min. Collected fraction was evaporated under reduced pressure and then freeze dried to furnish a white powder (11,5 mg, 10%).

Analytical HPLC (5-100% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t: 11.27 min, purity: 97% at 214 nm.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.15-1.45 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 1.52-1.78 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 1.82-1.96 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.17 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N-(CO)}_2$), 3.03-3.23 (m, 2H, $\text{CO-CH}_2\text{-CH-CO}$), 3.38-3.53 (m, 1H, $\text{CO-CH}_2\text{-CH-CO}$), 3.57 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CONH}$), 4.25 (t, 1H, $J = 7.0$ Hz, $\text{CH-CH}_2\text{-CO}_2$), 4.47 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz, $\text{CH-CH}_2\text{-CO}_2$), 6.91 (br s, 2H, 2 NH), 7.31 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, 2 H_{Ar}), 7.40 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, 2 H_{Ar}), 7.59 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz, 2 H_{Ar}), 7.77 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz, 2 H_{Ar}).

HPLC-MS (ESI) calculated for $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 533.27, found 533.25.

***tert*-butyl 2-(3,4,6,7,8,9-hexahydropyrimido[1,2-a]azepin-1(2H)-yl)acetate (8)**



Formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2$

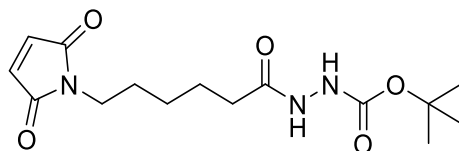
MW: 266.39 g/mol

A solution of compound **3** (50 mg, 0.11 mmol, 1 equiv) and DBU (17 mg, 0.11 mmol, 1 equiv) in anhydrous DCM (5 mL) was stirred during 15 min at RT under nitrogen atmosphere. Then, a solution of *tert*-butyl bromoacetate (32 μL , 0.23 mmol, 2 equiv) and DIPEA (19 μL , 0.11 mmol, 1 equiv) in anhydrous DCM (5 mL) was added to the reaction mixture and stirred for 5 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the crude mixture was purified using silica gel flash chromatography (Petroleum ether/EtOAc, 90/10, v/v) to afford compound **8** as a yellow oil (8 mg, 10%).

Analytical HPLC (5-100% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t : 9.73 min, purity: 68% at 214 nm

HPLC-MS (ESI) calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 267.20, found 267.20.

***tert*-butyl 2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl)hydrazine-1-carboxylate (9).**



Formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5$

MW: 325.36 g/mol

To a stirred solution of *tert*-butyl carbazate (500 mg, 3.78 mmol, 1 equiv) and NMM (1.65 mL, 15.1 mmol, 4 equiv) in anhydrous DCM (10 mL) was added at 0°C a solution of 6-maleimidohexanoic acid (780 mg, 3.78 mmol, 1 equiv) in anhydrous DCM (5 mL). A solution of HATU (1.435 g, 3.78 mmol, 1 equiv) dissolved in a minimum amount of DMF was added to the reaction mixture. The reaction mixture was slowly raised to RT and stirred for 5 hours.

The mixture was washed with H₂O, 0.1% TFA (3 x 20 mL) and the aqueous phase was extracted with DCM (2 x 20 mL). The organic phases were combined, dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The crude was purified by silica gel flash column chromatography (DCM/EtOH, 98/2, v/v) to give compound **9** (1,15 g, 91%) as a yellow oil.

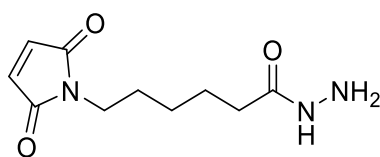
Analytical HPLC (5-100% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t: 10.44 min, purity: 98.7% at 214 nm.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.18-1.39 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 1.42 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.52-1.75 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 2.20 (t, 2H, J = 7.1 Hz, CH₂-CONH), 3.47 (t, 2H, J = 7.1 Hz, CH₂-N-(CO)₂), 6.66 (s, 2H, HC=CH), 6.96 (br s, 1H, NH), 8.13 (br s, 1H, NH).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 25.3 (CH₂), 26.8 (2 CH₂), 28.8 (3 CH₃), 34.4 (CH₂), 39.2 (CH₂), 82.3 (C, *t*Bu), 134.7 (HC=CH), 156.3 (CO₂NH), 171.5 (2 CO), 173.0 (NH-CO-CH₂).

HPLC-MS (ESI) calculated for C₁₅H₂₃N₃O₅Na [M+Na]⁺ m/z 348.15, found 348.15.

6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanehydrazide (**4**).



Formula: C₁₀H₁₅N₃O₃

MW: 225.24 g/mol

To a solution of compound **9** (1.08 g, 3.32 mmol, 1 equiv) in DCM (5 mL) was added TFA (5.12 mL, 66.4 mmol, 20 equiv) for Boc protecting group deprotection. The reaction mixture was stirred at RT for 5 hours. TFA was co-evaporated with DCM (4 x 125 mL). The residue was precipitated in cooled Et₂O (40 mL, -20°C). The solution was centrifugated 15 min at 5000 rpm and the supernatant was removed. Compound **9** was afforded as a white powder (746 mg, 99%) after drying under vacuum.

Mp: 102°C

Analytical HPLC (5-100% B in 15 min, 0.8 mL/min), (R_t: 6.31 min), purity: 90.1% at 214 nm

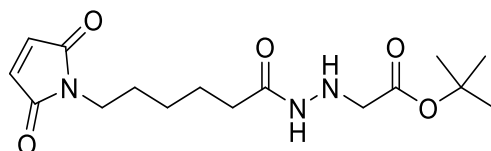
¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 1.12-1.34 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 1.39-1.61 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 2.16 (t, 2H, J = 7.3 Hz, CH₂-CO-NH), 3.38 (t, 2H, J = 6.9 Hz, CH₂-N-(CO)₂), 7.01 (s, 2H, HC=CH), 10.44 (s, 1H, NH).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ 24.1 (CH₂), 25.5 (CH₂), 27.6 (CH₂), 32.5 (CH₂-CO), 38.7 (CH₂-N), 134.4 (2 HC=CH), 171.0 (2 CO), 171.6 (CO).

HPLC-MS (ESI) calculated for C₁₀H₁₆N₃O₃ [M+H]⁺ m/z 226.11, found : 226.10.

***tert*-butyl (6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamido)glycinate (5) and di-*tert*-butyl 2,2'-(2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl)hydrazine-1,1-diyl)diacetate (10).**

Compound **4** (300 mg, 1.33 mmol, 1 equiv) and K₂CO₃ (202.5 mg, 1.46 mmol, 1.1 equiv) were dissolved in cooled DMF (15 mL, 0°C). *Tert*-butyl bromoacetate (196.8 μL, 1.33 mmol, 1 equiv) was dissolved in anhydrous DMF (5 mL) and added dropwise during 2 hours to the stirred solution. The reaction mixture was slowly raised to RT and stirred overnight. Then, the reaction mixture was diluted in H₂O (100 mL) and the resulted solution was extracted with EtOAc (2 x 30 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The crude was purified by silica gel flash column chromatography (EtOAc/*n*-hexane, 80/20, v/v) to afford the desired compound **5** (238 mg, 53%) as a yellow oil, and **10** (97 mg, 16.1%) as by-product.

***tert*-butyl (6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamido)glycinate (5).**Formula: C₁₆H₂₅N₃O₅

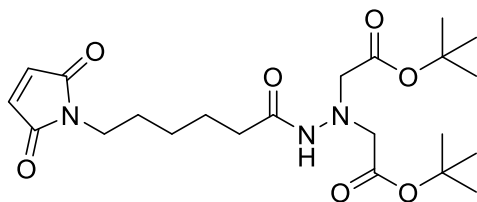
MW: 339.39 g/mol

Analytical HPLC (5-100% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t: 10.87 min, purity: 97.6% at 214 nm.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.12-1.37 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 1.45 (s, 9H, 3 CH₃), 1.52-1.78 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 2.10 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂-CO-NH), 3.44-3.57 (m, 4H, CH₂-N-(CO)₂, CH₂-CO₂*t*Bu), 6.66 (s, 2H, HC=CH), 7.17 (br s, 1H, NH), 7.49 (br s, 1H, NH).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 25.5 (CH₂), 26.9 (CH₂), 28.8 (3CH₃), 28.8 (CH₂), 35.0 (CH₂), 38.2 (N-CH₂), 53.9 (NH-CH₂) 82.4 (C, *t*Bu), 134.6 (2 HC=CH), 171.0 (2 CO), 171.5 (CO₂), 172.6 (CONH).

HPLC-MS (ESI) calculated for C₁₆H₂₆N₃O₅ [M+H]⁺ m/z 340.17, found 340.10.

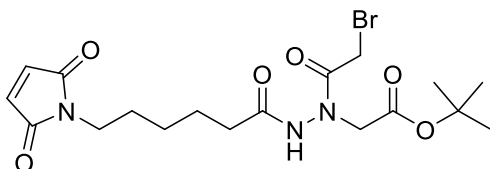
di-tert-butyl 2,2'-(2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl)hydrazine-1,1-diyl)diacetate (10).Formula: C₂₂H₃₅N₃O₇

MW: 453.54 g/mol

Analytical HPLC (5-100% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t: 13.94 min, purity: 83% at 214 nm.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.26-1.38 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 1.44 (s, 18H, 2 (CH₃)₃), 1.52-1.68 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 2.04 (t, 2H, J = 7.5 Hz, CH₂-CO-NH), 3.50 (t, 2H, J = 6.9 Hz, CH₂-N-(CO)₂), 3.57 (s, 1H, CH₂-CO₂*t*Bu), 3.63 (s, 1H, CH₂-CO₂*t*Bu), 3.69 (s, 2H, CH₂-CO₂*t*Bu), 6.65 (s, 2H, HC=CH), 7.32 (br s, 1H, NH), 7.68 (br s, 1H, NH).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 24.7 (CH₂), 25.6 (CH₂), 27.3 (CH₂), 28.7 (6 CH₃), 35.3 (CH₂), 38.4 (N-CH₂), 58.2 (N-CH₂), 59.5 (N-CH₂), 82.5 (C, *t*Bu), 82.8 (C, *t*Bu), 134.7 (HC=CH), 169.3 (CO₂), 169.8 (CO₂), 171.5 (2 CO), 177.7 (CONH).

HPLC-MS (ESI) calculated for C₂₂H₃₅N₃O₇Na [M+Na]⁺ m/z 576.24, found 576.15.**tert-butyl N-(2-bromoacetyl)-N-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamido)glycinate (14).**Formula: C₁₈H₂₆BrN₃O₆

MW: 460.32 g/mol

To a solution of compound **5** (238 mg, 0.702 mmol, 1 equiv) and pyridine (84.8 μL, 1.05 mmol, 1.5 equiv) in anhydrous DCM (2 mL) was added dropwise a solution of bromoacetyl bromide (47 μL, 0.56 mmol, 0.8 equiv) in anhydrous DCM (3 mL) for 10 min at RT. The reaction solution was stirred for 10 min more before evaporation of the solvent to dryness. The residue was precipitated in cooled Et₂O (40 mL, -20°C). The solution was centrifugated 15 min at 5000 rpm and the supernatant was removed to furnish compound **14** (287 mg, 89%) as a white powder after drying under vacuum. Compound **14** was used in the next step without further purification.

Analytical HPLC (5-100% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t: 12.42 min purity: 95.94% at 214 nm.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.27-1.38 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 1.47 (s, 9H, 3 CH₃), 1.54-1.78 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 2.25 (t, 2H, J = 7.1 Hz, CH₂-CONH), 2.80 (s,

2H, CH₂-CO₂ *t*Bu), 3.52 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂-N-(CO)₂), 3.84 (s, 2H, CO-CH₂-Br), 6.69 (s, 2H, HC=CH), 8.07 (br s, 1H, NH).

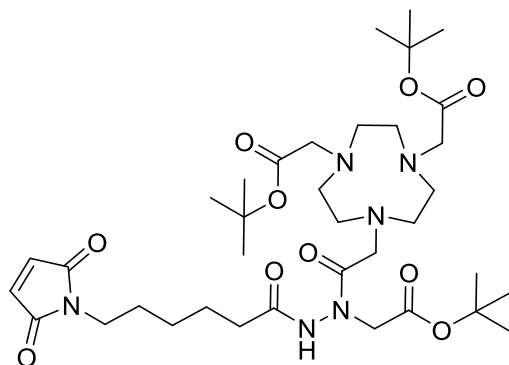
¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 25.7 (CH₂), 26.9 (CH₂), 27.2 (CH₂-Br), 28.7 (3CH₃), 28.8 (CH₂), 34.5 (CH₂), 38.1 (N-CH₂), 50.0 (NH-CH₂) 83.6 (C, *t*Bu), 134.7 (2 HC=CH), 168.8 (CO-NH), 169.2 (2 CO), 171.5 (CO₂), 172.3 (CONH).

HPLC-MS (ESI) calculated for C₁₈H₂₆BrN₃O₆Na [M+Na]⁺ *m/z* 482.09, found 482.00.

di-*tert*-butyl 2,2'-(7-(2-(1-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl)hydrazinyl)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetate (15) and di-*tert*-butyl 2,2'-(7-(1-(6-(2-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-2-(2-(4-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-7-(2-(*tert*-butyl(methyl)-1,3-oxidanyl)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazonan-1-yl)acetyl)hydrazinyl)-6-oxohexyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetate (16)

To a solution of compound **14** (94 mg, 0.20 mmol, 1 equiv) in anhydrous CH₃CN (10 mL) was added dropwise at RT for 2 hours a solution of NO₂*t*Bu (72.9 mg, 0.18 mmol, 0.9 equiv) and DIPEA (70.7 μL, 0.40 mmol, 2 equiv) in anhydrous CH₃CN (5 mL). The reaction mixture was stirred at RT for 12 hours and then diluted with H₂O containing 0.1% TFA (50 mL). The aqueous phase was extracted with DCM (3 x 30 mL). The organic phases were combined and washed with brine (30 mL), dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. HPLC purification was achieved using an isocratic at 50% of B during 20 min followed by gradient of 50% to 100% of B in 15 min. Compound **15** was detected by UV at 220 nm (*R*_t: 14.5 min). The collected fraction was evaporated under reduced pressure and then freeze dried to afford compound **15** (49.1 mg, 37%) as a white powder. The by-product **16** was also collected (43 mg, 21.6%).

di-tert-butyl 2,2'-(7-(2-(1-(2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl)hydrazinyl)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetate (15)



Formula: C₃₆H₆₀N₆O₁₀

MW: 736.90 g/mol

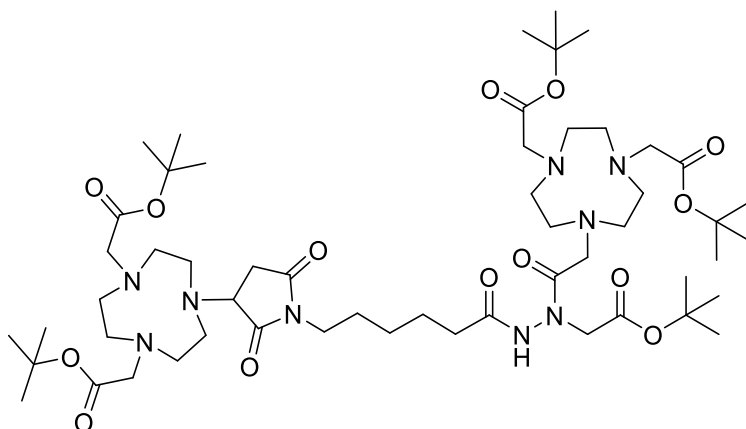
Analytical HPLC (5-100% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t: 13.50 min, purity: 91.85% at 214 nm.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.17-1.36 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 1.45 (s, 27H, 9 CH₃), 1.54-1.73 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 2.29 (t, 2H, J = 6.9 Hz, CH₂-CO-NH), 2.84-3.37 (m, 14H, N-CH₂-CH₂-N-CH₂-CH₂-N-CH₂-CH₂, N-CH₂-CO₂tBu), 3.45-3.58 (m, 8H, N-CH₂-CON, 2 N-CH₂-CO₂tBu, CH₂-N-(CO)₂), 6.67 (s, 2H, HC=CH), 10.18 (br s, 1H, NH).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 25.0 (CH₂), 26.8 (2 CH₂), 28.8 (9 CH₃), 34.0 (CH₂), 38.2 (CH₂-N-(CO)₂), 48.5 (2 N-CH₂), 50.7 (2 N-CH₂) 51.33 (CH₂-CON), 53.0 (2 N-CH₂), 55.4 (CO-N-CH₂-CO₂), 56.4 (2 N-CH₂-CO₂), 83.0 (2 C, tBu), 83.5 (C, tBu), 134.7 (2 HC=CH), 167.4 (NH-N-CO), 169.1 (2 CO₂), 170.3 (2 CO), 171.6 (CO₂), 173.7 (CONH).

HPLC-MS (ESI) calculated from C₃₆H₆₁N₆O₁₀ [M+H]⁺ m/z 737.44, found 737.40.

di-tert-butyl 2,2'-(7-(1-(6-(2-(2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)-2-(2-(4-(2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)-7-(2-(tert-butyl(methyl)-13-oxidanyl)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazonan-1-yl)acetyl)hydrazinyl)-6-oxohexyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetate (16)



Formula: C₅₄H₉₅N₉O₁₄

MW: 1094.4 g/mol

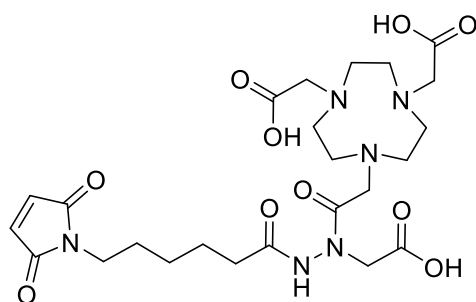
Analytical HPLC (5-100% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t: 13.50 min, purity: 86% at 214 nm.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.13-1.33 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 1.43 (s, 45H, 15 CH_3), 1.51-1.73 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 2.28 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CO-NH}$), 2.40 (dd, 2H, $J = 18.7$ and 5.3 Hz, $\text{CO-CH}_2\text{-CH-N}$), 2.84-3.30 (m, 26H, 2 ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2$), $\text{N-CH}_2\text{-CO}_2t\text{Bu}$), 3.41-3.62 (m, 12H, 4 $\text{CH}_2\text{-CO}_2t\text{Bu}$, $\text{N-CH}_2\text{-CON}$, $\text{CH}_2\text{-NCO}$), 4.16 (t, 1H, $J = 6.9$ Hz, CH), 10.57 (br s, 1H, NH).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ 24.3 (CH_2), 26.1 (CH_2), 27.1 (CH_2), 27.9 (15 CH_3), 32.8 (CH-CH_2), 33.1 ($\text{CH}_2\text{-CON}$), 40.5 ($\text{NCO-CH}_2\text{-N}$), 47.9 (4 N-CH_2), 49.6 (4 N-CH_2), 50.8 ($\text{CH}_2\text{-N-(CO)}_2$), 52.1 (4 N-CH_2), 55.3 ($\text{CO-N-CH}_2\text{-CO}_2$), 55.6 (4 $\text{N-CH}_2\text{-CO}_2$), 59.7 (CH), 82.1 (4 C, $t\text{Bu}$), 82.4 (C, $t\text{Bu}$), 166.5 (NH-N-CO), 168.6 (CO_2), 169.5 (2 CO), 172.8 (CO-N-N-H), 174.7 (2 CO_2), 176.9 (2 CO_2).

HPLC-MS (ESI) calculated from $\text{C}_{54}\text{H}_{97}\text{N}_9\text{O}_{14}$ [$\text{M} + 2\text{H}$] $^{2+}$ m/z 548.36, found 548.30.

2,2'-(7-(2-(1-(carboxymethyl)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl)hydrazinyl)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetic acid (NO2A-AHM).



Formula: $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_{10}$

MW: 568,58 g/mol

To a solution of compound **15** (45.2 mg, 0.061 mmol, 1 equiv) in DCM (2 mL) was added TFA (1.2 mL, 15.86 mmol, 260 equiv) for $t\text{Bu}$ esters deprotection. The reaction mixture was stirred at RT for 5 hours and TFA was removed under reduced pressure. The residue was precipitated in cooled Et_2O (40 mL, -20°C). The solution was centrifuged 15 min at 5000 rpm and the supernatant was removed. The resulted white powder was dried under vacuum. HPLC purification was achieved using a gradient of 5% to 70% of B in 40 min and **NO2A-AHM** was detected by UV at 308 nm (R_t : 20.9 min). The collected fraction was evaporated under reduced pressure and then freeze dried to furnish **NO2A-AHM** (36.5 mg, quantitative) as a white powder.

Analytical HPLC (5-100% B in 15 min, 0.8 mL/min) R_t : 7.23 min, purity: 98.33% at 214 nm.

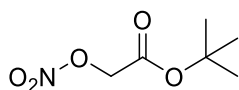
^1H NMR (D_2O , 400 MHz, 330 K) δ 1.19-1.30 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 1.49-1.66 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 2.13 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CO-NH}$), 3.18 (dt, 8H, $J = 31$

5.4 Hz, 4 CH₂), 3.38 (s, 4H, 2 CH₂), 3.46 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz, CH₂-N-(CO)₂), 3.85 (m, 8H, 3 CH₂-CO₂H, N-CH₂-CO-N), 6.79 (s, 2H, HC=CH).

¹³C NMR (D₂O, 100 MHz) δ 24.0 (CH₂), 25.7 (CH₂), 27.6 (CH₂), 32.5 (CH₂), 36.9 (CH₂-N-(CO)₂), 48.9 (2 N-CH₂), 49.1 (2 N-CH₂), 49.4 (2 N-CH₂), 53.52 (CH₂-CO-N), 54.4 (3 N-CH₂-CO₂), 134.4 (HC=CH), 169.5 (NH-N-CO), 170.9 (2 CO), 171.1 (3 CO₂H), 171.7 (CO-NH).

HRMS (ESI) calculated from C₂₄H₃₇N₆O₁₀ [M+H]⁺ m/z 569.2571, found 569.2549.

***tert*-butyl 2-(nitrooxy)acetate (13)**



Formula: C₆H₁₁NO₅

MW: 177.16 g/mol

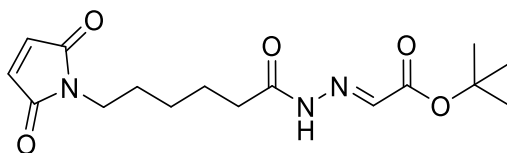
To a stirred solution of silver nitrate (1265 mg, 7.45 mmol, 2.2 equiv) in anhydrous CH₃CN (10 mL) was added a solution of *tert*-butyl bromoacetate (600 mg, 3.38 mmol, 1 equiv) in anhydrous CH₃CN (5 mL). The reaction mixture was stirred in the dark for 3 days under nitrogen atmosphere. The green precipitate of silver bromide was filtrated under cellulose filter and the solvent was removed under reduced pressure. The crude mixture was diluted in Et₂O (50 mL) to remove the excess of silver nitrate as a white precipitate that was filtrated under cellulose filter. The organic phase was washed with H₂O (2 x 20 mL) and brine (20 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The compound **13** (353 mg, 65%) was obtained as a colorless liquid.

Purity (¹H NMR): >95%

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 1.47 (s, 9H, 3 CH₃), 4.75 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ 28.5 (3 CH₃), 68.2 (CH₂), 84.4 (C, *t*Bu), 165.4 (CO).

***tert*-butyl (*E*)-2-(2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl)hydrazono)acetate (12)**



Formula: C₁₆H₂₃N₃O₅

MW: 337.38 g/mol

A solution of compound **13** (180 mg, 1.0 mmol, 1 equiv) and NaOAc (83.8 mg, 1.0 mmol, 1 equiv) in anhydrous DMSO (15 mL) was stirred under a nitrogen atmosphere at RT during 20 min. Then, a solution of compound **4** (225 mg, 1.0 mmol, 1 equiv) in anhydrous DMSO (5 mL) was added to the reaction mixture and continued to stir overnight. The reaction mixture was

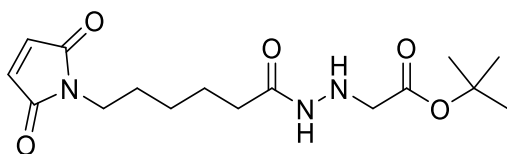
diluted in brine (20 mL) and extracted successively with Et₂O (2 x 20 mL) and EtOAc (2 x 20 mL). The organic phases were combined and washed with H₂O (20 mL) and brine (20 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under reduced pressure to give compound **12** (191 mg, 56%) as a reddish oil.

Analytical HPLC (5-100% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t: 12.08 min, purity: 85% at 254 nm.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.28-1.43 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 1.52 (s, 9H, 3 CH₃), 1.57-1.85 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 2.33 (t, 2H, J = 7.2 Hz, CH₂-CONH), 3.52 (t, 2H, J = 7.2 Hz, CH₂-N(CO)₂), 6.59 (s, 1H, N=CH), 6.68 (s, 2H, HC=CH), 7.09 (s, 1H, NH).

HPLC-MS (ESI) calculated from C₁₆H₂₃N₃O₅Na [M + Na]⁺ m/z 360.15, found 360.05.

tert-butyl (6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamido)glycinate (5)



Formula: C₁₆H₂₅N₃O₅

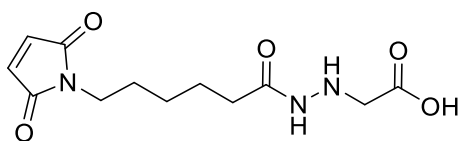
MW: 339.39 g/mol

A solution of compound **12** (111 mg, 0.33 mmol, 1 equiv) and NaBH₃CN (31 mg, 0.50 mmol, 1.5 equiv) in EtOH (10 mL) was acidified to pH 4-5 with 1 N HCl. The reaction mixture was stirred for 8 hours at RT. The reaction was stopped by addition of NaHCO₃ 0.1 M (5 mL) and EtOH was removed under reduced pressure. The crude mixture was extracted successively with DCM (3 x 20 mL) and EtOAc (3 x 20 mL). The organic phases were combined and washed with H₂O (20 mL) and brine (20 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The crude mixture was purified by silica gel flash column chromatography (EtOAc/*n*-hexane, 80/20, v/v) to give compound **5** (42.6 mg, 36%) as a yellow oil.

Analytical HPLC (5-100% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t: 10.86 min, purity: 95% at 214 nm.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.18-1.46 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 1.47 (s, 9H, 3 CH₃), 1.44-1.78 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 2.11 (t, 2H, J = 7.5 Hz, CH₂-CONH), 3.50 (t, 2H, J = 7.5 Hz, CH₂-N-(CO)₂), 3.53 (s, 2H, NH-CH₂-CO₂), 6.68 (s, 2H, HC=CH), 7.14 (br s, 1H, NH), 7.37 (br s, 1H, NH).

HPLC-MS (ESI) calculated for C₁₆H₂₆N₃O₅ [M+H]⁺ m/z 340.17, found 340.10.

Synthesis of (6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamido)glycine (17).Formula: C₁₂H₁₇N₃O₅

MW: 283.28 g/mol

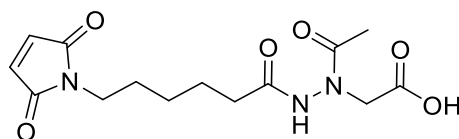
Compound **5** (50 mg, 0.15 mmol, 1 equiv) was diluted in TFA (226 μ L, 2.95 mmol, 20 equiv) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 8 hours. TFA was co-evaporated with DCM (3 x 50 mL). The crude was precipitated in cooled Et₂O (45 mL, -20°C). The solution was centrifugated 15 min at 5000 rpm and the supernatant was removed. The crude was purified by HPLC using a gradient of 5% to 50% of B in 30 min. Compound **17** was detected by UV at 308 nm (R_t : 15.9 min). The collected fraction was evaporated under reduced pressure and then freeze dried to afford compound **17** (34 mg, 81.4%) as a white powder.

Analytical HPLC (5-100% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t : 7.50 min, purity: 96% at 214 nm.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 0.921-1.778 (m, 6H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 2.01-2.37 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 3.36 (t, 2H, J = 6.7 Hz, (CO)₂N-CH₂), 3.97 (s, 2H, NH-CH₂-COOH), 6.90 (s, 2H, HC=CH), 7.19 (s, 1H, NH), 7.94 (s, 1H, CO-NH)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ 24.5 (CH₂), 25.6 (CH₂), 27.6 (CH₂), 30.8 (NH-CO-CH₂), 36.9 ((CO)₂N-CH₂), 52.5 (NH-CH₂-COOH), 136.6 (2 HC=CH), 171.0 (2 CO, CONH), 172.3 (CO₂).

HPLC-MS (ESI) calculated for C₁₂H₁₈N₃O₅ [M+H]⁺ m/z 284.12, found 284.05

Synthesis of N-acetyl-N-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamido)glycine (18).Formula: C₁₄H₁₉N₃O₆

MW: 325,32 g/mol

A solution of compound **5** (46 mg, 0.14 mmol, 1 equiv) and acetyl chloride (9.7 μ L, 0.14 mmol, 1 equiv) in anhydrous DCM (3 mL) was stirred during 35 min at RT under nitrogen atmosphere. The solvent was removed under reduced pressure. The crude mixture was purified by HPLC with a gradient of 10% to 85% of B in 30 min. Compound **18** was detected by UV at 220 nm (R_t : 15.55 min). The collected fraction was evaporated under reduced pressure and then freeze dried to afford compound **18** (23.4 mg, 53%) as a white powder.

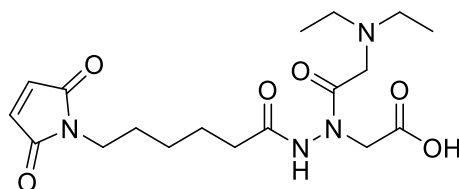
Analytical HPLC (5-100% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t : 11.24 min, purity: 98% at 214 nm.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 1.11-1.28 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 1.41 (s, 3H, CH₃), 1.45-1.61 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 2.13 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 3.28 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz, (CO)₂N-CH₂), 3.43 (s, 2H, N-CH₂-COOH), 6.99 (s, 2H, HC=CH), 10.49 (s, 1H, COOH)

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ 24.2 (CH₂), 25.6 (CH₂), 27.5 (CH₂), 27.6 (CH₃), 32.5 (NH-CO-CH₂), 36.9 ((CO)₂N-CH₂), 49.6 (NH-CH₂-COOH), 81.1 (CO-CH₃), 134.4 (2 HC=CH), 171.0 (2 CO), 171.2 (CONH), 171.7 (CO₂).

HPLC-MS (ESI) calculated for C₁₄H₂₀N₃O₆ [M+H]⁺ m/z 326.13, found 326.05.

Synthesis of *N*-(diethylglycyl)-*N*-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamido)glycine (19**).**



Formula: C₁₈H₂₈N₄O₆

MW: 396,44 g/mol

A solution of compound **5** (18.6 mg, 0.055 mmol, 1 equiv) and diethylamine (23.01 μL , 0.14 mmol, 2.5 equiv) in anhydrous DCM (5 mL) was stirred at room temperature during 15 min under nitrogen atmosphere. Bromoacetyl bromide (4.8 μL , 0.055 mmol, 1 equiv) was diluted in anhydrous DCM (3 mL) and added dropwise to the reaction mixture during 10 min at RT. The resulted crude mixture was subjected to the *t*Bu deprotection using TFA (0.4 mL, 2.37 mmol, 43 equiv) for 5 hours at RT. TFA was co-evaporated with DCM (2 x 50 mL). The crude was precipitated in Et₂O (45 mL, -20°C). The solution was centrifugated 10 min at 5000 rpm and the supernatant was removed. The crude was purified by HPLC using a gradient of 5% to 55% of B in 30 min. Compound **19** was detected by UV at 220 nm (R_t : 17.80 min). The collected fraction was evaporated under reduced pressure and then freeze dried to afford **19** (13.9 mg, 64%) as a white powder.

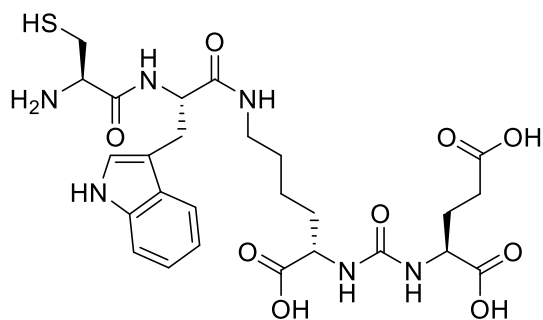
Analytical HPLC (5-100% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t : 7.59 min, purity: 99.32% at 214 nm.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 1.03-1.36 (m, 8H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH, 2 CH₃), 1.38-1.66 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 2.19 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 3.04-3.31 (m, 4H, 2 CH₂-CH₃), 3.38 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz, (CO)₂N-CH₂), 4.04 (s, 2H, N-CH₂-COOH), 4.27 (s, 2H, N-CH₂-CON), 6.97 (s, 2H, HC=CH), 9.43 (s, 1H, COOH)

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ 8.8 (2 CH_3), 24.0 (CH_2), 25.8 (CH_2), 27.8 (CH_2), 32.8 (NH-CO-CH_2), 37.0 ($(\text{CO}_2)\text{N-CH}_2$), 49.1 (2 $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 50.0, ($\text{NH-CH}_2\text{-COOH}$), 51.3 ($\text{N-CH}_2\text{-CON}$), 134.5 (2 HC=CH), 171.1 (2 CO), 172.0 (CONH , CON-NH), 172.1 (CO_2).

HPLC-MS (ESI) calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 397.20, found 397.15.

Synthesis of (((S)-5-((S)-2-((R)-2-amino-3-mercaptopropanamido)-3-(1H-indol-3-yl)propanamido)-1-carboxypentyl)carbamoyl)-L-glutamic acid (CWKuE, 20)



Formula: $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}$

MW: 608.66 g/mol

H-Lys(Fmoc)-OtBu.HCl (400 mg, 0.864 mmol, 1 equiv) and NMM (473 μL , 4.32 mmol, 5 equiv) was dissolved in anhydrous DCM (20 mL) and stirred 30 min under reflux (40°C). 4-NC (210 mg, 1.04 mmol, 1.2 equiv) was added to the reaction mixture and stirred at 40°C for another 30 min. DCM was removed under reduced pressure and replaced by DMF (3 mL) to afford a solution of the crude mixture of the activated lysine (4-NC-Lys(Fmoc)-OtBu). In parallel, the Fmoc group of Fmoc-Glu(*t*Bu)-Wang-resin (100 μmol scale) was removed using piperidine/DMF (3 mL, 1/5, v/v, 4 times during 15 min, RT). Then, a coupling reaction of 2 hours was performed at RT by adding the crude mixture of the activated lysine to the unprotected $\text{NH}_2\text{-Glu}(\textit{t}\text{Bu})\text{-Wang-resin}$. The following steps of Fmoc-C(Trt)-W(Boc)- $\epsilon\text{K}(\textit{t}\text{Bu})\text{-urea-E}(\textit{t}\text{Bu})\text{-Wang resin}$ synthesis (i.e., successive coupling reactions of the residues tryptophane and cysteine) was performed on a multichannel peptide ResPep XL synthesizer (Intavis AG, Köln, Germany), according to a classical Fmoc/*t*Bu solid phase methodology. Double coupling was performed using a threefold excess of Fmoc-Trp(Boc)-OH or Fmoc-Cys(Trt)-OH, HBTU (3 equiv), NMP (3 equiv) and NMM (9 equiv) in DMF (3 mL). Finally, Fmoc protection was removed using piperidine/DMF (3 mL, 1/5, v/v, 4 times during 15 min, RT) and, after drying of the resin under vacuum, the pseudopeptide peptide **20** was cleaved from the resin and at the same time the side chain protecting groups were removed using TFA/TIPS/ H_2O (4 mL, 92.5/2.5/5, v/v/v) for 2 hours. The acidic resin was filtered and washed with TFA (2 mL) and DCM (25 mL). TFA was co-evaporated under vacuum thanks to DCM. The pseudopeptide was precipitated in cooled diethyl ether (-20°C) and centrifuged 15 min at 5000 rpm. The supernatant was eliminated, and the pseudopeptide was freeze dried in H_2O (30

mL, 0.1% acetic acid). HPLC purification was achieved using a gradient of 5% to 40% of B in 20 min at a flow rate of 12 mL/min. **20** was detected by UV at 280 nm (R_{t1} : 15.22, R_{t2} : 17.09 and R_{t3} : 18.29 min) and the collected fraction was evaporated under reduced pressure and then freeze dried. Compound **20** was obtained as a white powder (28 mg, 46%).

Analytical HPLC (5-100% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_{t1} : 7.44 min, purity: 93.4%, R_{t2} : 7.89 min, purity: 94.6%, R_{t3} : 7.97 min, purity: 85.6% at 280 nm.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ

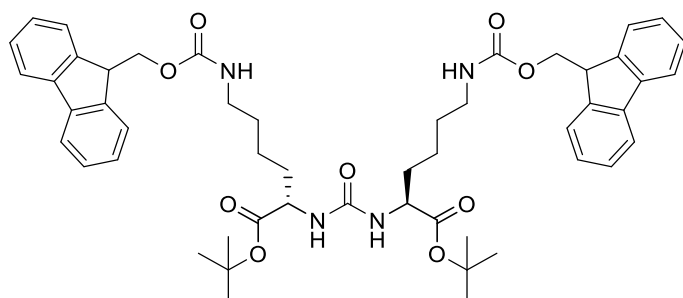
	NH	α -H	β -H	γ -H	Others
Glu	6.34	4.11	1.72 1.93	2.24	-
Lys	6.32	4.09	1.60 1.46	1.28	δ -CH ₂ = 1.24, ϵ -CH ₂ = 3.10, ϵ -NH = 3.98
Trp	10.82	4.03	2.94	-	2H: 7.14, N (1)H: 8.12, 6H = 6.98, 5H = 7.06, 4H = 7.32, 7H = 7.61
Cys	8.85	4.55	3.16	-	-

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ

	CO	α -C	β -C	γ -C	Others
Glu	127.2	51.7	28.5	31.8	COOH = 157.3, CO (urea) = 170.5
Lys	127.1	51.7	27.5	22.6	δ -CH ₂ = 27.5, ϵ -CH ₂ = 29.9
Trp	109.4	52.3	29.9	136.1	4C = 111.3, 5C _A = 118.2, 6C = 118.4, 7C = 120.9, 2C = 123.8, 8C = 166.8, 9C _r = 170.7
Cys	109.6	54.1	29.9	-	-

HPLC-MS (ESI) calculated for C₂₆H₃₇N₆O₉S [M+H]⁺ m/z 609.23, found 609.20

Synthesis of the by-product *tert*-butyl N6-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-N2-(((*S*)-6-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-1-(*tert*-butoxy)-1-oxohexan-2-yl)carbamoyl)-L-lysinate (bi-lysine urée, **25)**



Formula: C₅₁H₆₂N₄O₉

MW: 875.08 g/mol

H-Lys(Fmoc)-OtBu.HCl (163 mg, 0.353 mmol, 1 equiv) and NMM (193 μ L, 1.78 mmol, 5 equiv) was dissolved in anhydrous DCM (15 mL) and stirred 30 min under reflux (40°C). 4-NC (85.5 mg, 0.42 mmol, 1.2 eq) was added to the reaction mixture and stirred at 40°C during 90 min. The crude mixture was purified on silica gel with EtOAc/petroleum ether (30/70, v/v). Compound **25** was obtained as a white solid (110 mg, 71%).

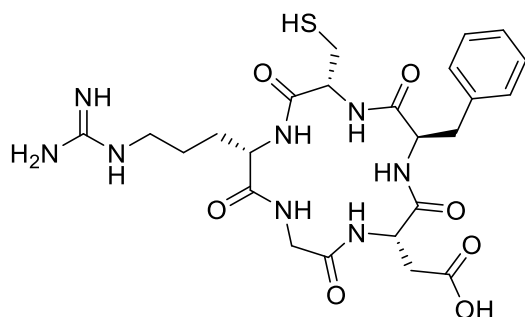
Analytical HPLC (5-100% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t : 18.82 min, purity: 91.4% at 254 nm.

Mp: 168°C

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 0.68-0.98 (m, 4H, 2 γCH_2), 1.16-1.29 (m, 4H, 2 δCH_2), 1.43 (s, 18H, 2 $(\text{CH}_3)_3$), 1.68-1.95 (m, 4H, 2 βCH_2), 3.05-3.25 (m, 4H, 2 εCH_2), 4.20 (t, 2H, $J = 6.9$ Hz, 2 $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}$), 3.26-4.50 (m, 6H, 2 $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}$, 2 $\text{CO}-\text{CH}-\text{NH}$), 5.11 (s, 2H, $\text{NH}-\text{COO}$), 5.21 (s, 2H, $\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}$), 7.29 (t, 4H, $J = 7.2$ Hz, CH_{Ar}), 7.32 (t, 4H, $J = 7.2$ Hz, CH_{Ar}), 7.59 (d, 4H, $J = 7.5$ Hz, CH_{Ar}), 7.38 (d, 4H, $J = 7.5$ Hz, CH_{Ar})

HPLC-MS (ESI) calculated for $\text{C}_{51}\text{H}_{62}\text{N}_4\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 875.45, found 875.25

Synthesis of 2-((2S,5R,8R,11S)-5-benzyl-11-(3-guanidinopropyl)-8-(mercaptomethyl)-3,6,9,12,15-pentaoxo-1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadecan-2-yl)acetic acid (c(RGDfC), 21)



Formula: $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_8\text{O}_7\text{S}$

MW: 578.65 g/mol

The following steps of c(RGDfC)-Wang resin synthesis was performed on a multichannel peptide ResPep XL synthesizer (Intavis AG, Köln, Germany), according to a classical Fmoc/*t*Bu solid phase methodology at a 200 μ mol synthesis scale. N- α -Fmoc-Asp(OAll) (2 equiv) was coupled to Wang resin (4-benzyloxybenzyl alcohol group linked to polystyrene resin, 1.0-2.0 mmol/g loading) with DIPEA (5 equiv) in DCM (2 mL) during 3 hours followed by 0.5 hour in MeOH at RT. Double coupling was performed using a twofold excess of Fmoc-AA-OH (with AA: Gly, Arg, Cys and Phe) respectively, HBTU (3 equiv), NMP (3 equiv) and NMM (9 equiv) in DMF (2 mL) during 15 min at RT. Fmoc deprotection was realized using a solution of piperidine in DMF (1/5, v/v) during 15 min and the unreacted AAs were capped with acetic anhydride at the end of each coupling phase. Fmoc protection of α -amine of

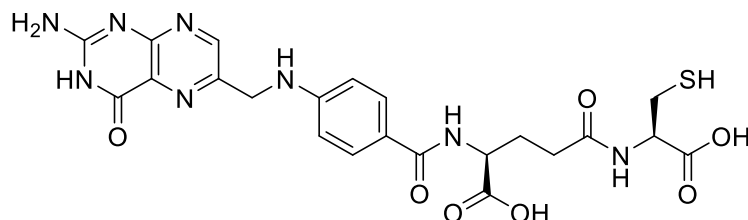
phenylalanine residue was removed using a solution of piperidine in DMF 1/5 (v/v) in 15 min and the allyl protecting group was removed using Pd(PPh₃)₄ in a solution of CHCl₃/AcOH/NMM (92.5/5/2.5, v/v/v) for 2 hours at RT. Intramolecular cyclization was conducted with HBTU (3 equiv), NMM (9 equiv), NMP (3 equiv), 1 time during 1 hour and 1 time during 16 hours. The resin was dried under vacuum. The peptide was cleaved from the resin with removal of side chain protecting group using TFA/TIPS/H₂O (92.5/2.5/5 v/v/v) (4 mL) for 2 hours at RT. The acidic resin was filtered and washed with TFA (2 mL) and DCM (25 mL). TFA was co-evaporated under vacuum thanks to DCM. The peptide was precipitated in -20°C diethyl ether and centrifuged 15 min at 5000 rpm and the supernatant was eliminated. HPLC purification was achieved at 10% of B during 15 min followed by a gradient of 10% to 100% of B in 5 min. **21** was detected by UV at 280 nm (R_t: 19.05 min) and the collected fraction was evaporated under reduced pressure and then freeze dried. **21** was obtained as a white powder (49 mg, 42%).

Analytical HPLC (5-100% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t: 6.84 min, purity: 98% at 214 nm.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12, 25 (br s, 1H, CO₂H, Asp), 8.29-8.24 (m, 1H, NH), 8.13 (dd, 2H, *J* = 7.5 and 2.5 Hz, NH), 7.91 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, NH), 7.46 (t, 1H, *J* = 5.7 Hz, NH), 7.28-7.18 (m, 5H, H_{Ar}, Phe), 7.07 (br s, 2H, NH), 4.66-4.60 (m, 1H, α-CH), 4.53-4.47 (m, 1H, α-CH), 4.24-4.03 (m, 3H, α-CH), 3.36-2.95 (m, 4H, α-CH, Gly, β-CH₂, Cys and δ-CH, Arg), 2.84-2.16 (m, 5H, δ-CH, Arg, β-CH₂, Asp and β-CH₂, Phe), 1.76-1.84 (m, 1H, β-CH, Arg), 1.60-1.40 (m, 3H, β-CH and γ-CH₂, Arg, β-CH, Asp).

HRMS (ESI) calculated for C₂₆H₃₆N₆O₉S [M+H]⁺ m/z 578.2349, found 578.2337

Synthesis of N2-(4-(((2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridin-6-yl)methyl)amino)benzoyl)-N5-((R)-1-carboxy-2-mercaptoethyl)-L-glutamine (AF-Cys-OH, **22)**



Formula: C₂₂H₂₄N₈O₇S

MW: 544.54 g/mol

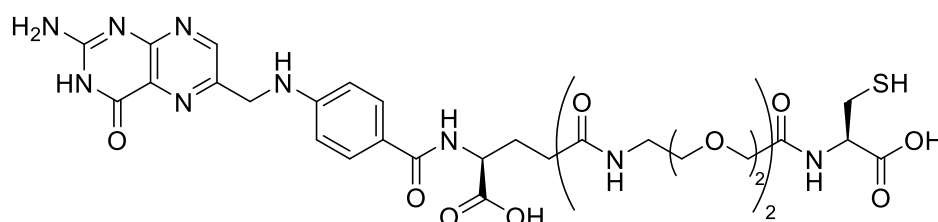
The following steps of AF-Cys-Wang resin synthesis according to a classical Fmoc/*t*Bu solid phase methodology at a 100 μmol synthesis scale. Double coupling was performed using a 1.5 excess of FA with HBTU (1.5 equiv), NMP (3 equiv) and NMM (3 equiv) in DMF (2 mL) during 8 hours at RT at 470 rpm on Fmoc-Cys(Trt)-Wang. Fmoc deprotection was realized using a solution of piperidine in DMF (1/5, v/v) during 15 min. The peptide was cleaved from

the resin with removal of side chain protecting group using TFA/TIPS/H₂O (92.5/2.5/5 v/v/v) (2 mL) for 2 hours at RT. The acidic resin was filtered and washed with TFA (2 mL) and DCM (25 mL). TFA was co-evaporated under vacuum thanks to DCM. The peptide was precipitated in -20°C diethyl ether and centrifuged 15 min at 5000 rpm and the supernatant was eliminated. No purification was performed due to solubility issues.

Analytical HPLC (5-100% B, 15 min, 0.8 mL/min) R_t: 10,54 and 10,63 min at 290 nm.

HPLC-MS (ESI) calculated for C₂₂H₂₄N₈O₇S [M+H]⁺ m/z 545.16, found 545.20

Synthesis of (2R,25S)-25-(4-(((2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridin-6-yl)methyl)amino)benzamido)-2-(mercaptomethyl)-4,13,22-trioxo-6,9,15,18-tetraoxa-3,12,21-triazahexacosanedioic acid (AF-O2Oc-O2Oc-Cys-OH, **23)**



Formula:
C₃₄H₄₆N₁₀O₁₃S
MW: 834.86
g/mol

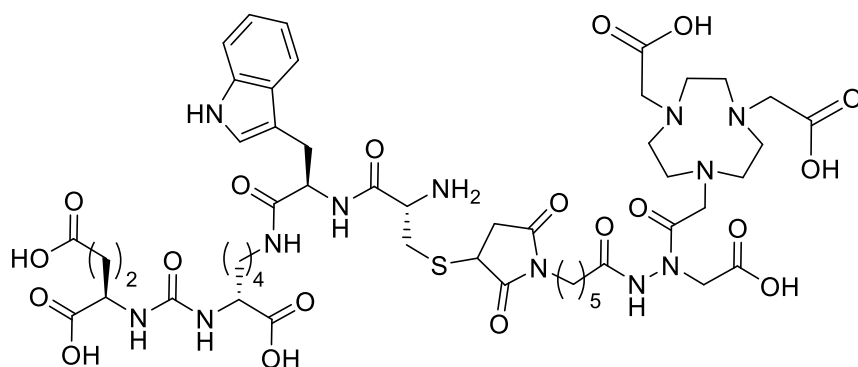
The following steps of AF-O2Oc-O2Oc-Cys-Wang resin synthesis according to a classical Fmoc/*t*Bu solid phase methodology at a 100 μmol synthesis scale. Double coupling was performed using a twofold excess of Fmoc-O2Oc-O2Oc-OH and FA with HBTU (2 equiv), NMP (3 equiv) and NMM (4 equiv) in DMF (2 mL) during 5 hours at RT at 470 rpm on Fmoc-Cys(Trt)-Wang. Fmoc deprotection was realized using a solution of piperidine in DMF (1/5, v/v) during 15 min. The peptide was cleaved from the resin with removal of side chain protecting group using TFA/TIPS/H₂O (92.5/2.5/5 v/v/v) (2 mL) for 2 hours at RT. The acidic resin was filtered and washed with TFA (2 mL) and DCM (25 mL). TFA was co-evaporated under vacuum thanks to DCM. The peptide was precipitated in -20°C diethyl ether and centrifuged 15 min at 5000 rpm and the supernatant was eliminated. HPLC purification was achieved at 10% of B during 15 min followed by a gradient of 5% to 35% of B in 35 min (A: H₂O, B: CH₃CN). **23** was detected by UV at 290 nm (R_t: 23.15 min) and the collected fraction was evaporated under reduced pressure and then freeze dried. **23** was obtained as an orange powder (12.5 mg, 15%).

Analytical HPLC (5-100% B, 15 min, 0.8 mL/min) R_t: 7.30 and 7.49 min, purity: 89% at 290 nm.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 1.74-1.91 (m, 2H, COOH-CH $_2$), 1.91-2.08 (m, 2H, CH $_2$ -CH $_2$ -CONH), 2.89-4.18 (m, 20H, ((CH $_2$ -CH $_2$ -O) $_2$ -CH $_2$ -CONH) $_2$), 4.32-4.38 (m, 1H, NH-CH-CH $_2$), 4.48 (br s, 2H, C $_6$ H $_4$ -NH-CH $_2$), 4.52-4.61 (t, 1H, J = 7.3 Hz, CH-CH $_2$ -SH), 6.62 (d, 2H, 2 H $_{Ar}$), 6.92 (s, 1H, CH-N-C-C-N-C), 7.63 (d, 2H, 2 H $_{Ar}$), 7.88 (s, 1H, NH), 8.01 (s, 1H, NH), 8.18 (s, 1H, NH), 8.64 (br s, 2H, NH $_2$), 9.96 (s, 1H, COOH), 11.45 (br s, 1H, COOH)

HPLC-MS (ESI) calculated for C $_{34}$ H $_{46}$ N $_{10}$ O $_{13}$ S [M+H] $^+$ m/z 835.30, found 835.20

Synthesis of (((1S)-5-((2S)-2-((2R)-2-amino-3-((1-(6-(2-(2-(4,7-bis(carboxymethyl)-1,4,7-triazonan-1-yl)acetyl)-2-(carboxymethyl)hydrazinyl)-6-oxohexyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)thio)propanamido)-3-(1H-indol-3-yl)propanamido)-1-carboxypentyl)carbamoyl)-L-glutamic acid (NO2A-AHM-CWKuE, 27)



Formula:
C $_{50}$ H $_{72}$ N $_{12}$ O $_{19}$ S
MW: 1177.25 g/mol

NO2A-AHM (5.0 mg, 9.3 nmol, 1 equiv) and **20** (8.6 mg, 15.2 nmol, 1.1 equiv) were dissolved in PBS (2 mL, 0.1 M, pH 7.4) and stirred at 40°C for 90 min. HPLC purification was achieved using a gradient of 5% to 45% of B in 30 min. **27** was detected by UV at 280 nm (R_t : 19.05 min) and the collected fraction was evaporated under reduced pressure and then freeze dried. Compound **27** was obtained as a white powder (8.4 mg, 77%).

Analytical HPLC (5-50% B, 15 min, 0.8 mL/min) R_t : 9.85 min, purity: 95.3% at 214 nm.

Partie Expérimentale

^1H NMR (D_2O , 400 MHz) δ

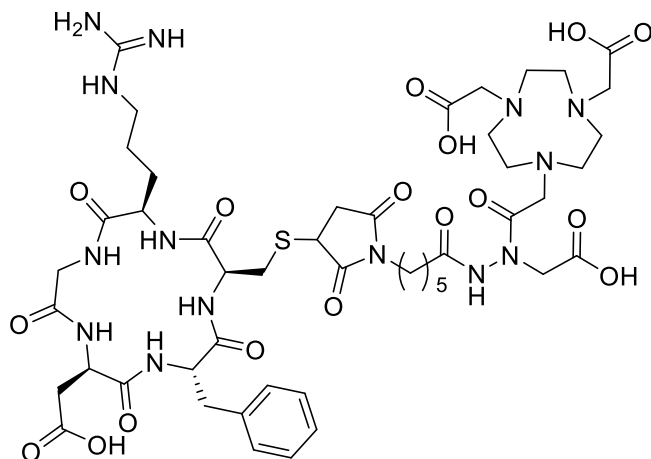
	$\alpha\text{-H}$	$\beta\text{-H}$	$\gamma\text{-H}$	Others
NO2A-AHM	-	-	-	1.26-1.39 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 1.53-1.73 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 2.35 (t, 2H, $J = 6.9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CO-NH}$), 2.65 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH-S}$), 3.05-3.24 (m, 8H, 4 CH_2 (NOTA)), 3.35-3.41 (m, 6H, 2 CH_2 (NOTA), N- $\text{CH}_2\text{-CO-N}$), 3.46-3.54 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{CO})_2$), 3.83 (m, 6H, 3 $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 3.99-4.08 (m, 1H, CH-S),
Glu	4.26	1.96 2.15	2.49	-
Lys	4.03	1.47 1.57	0.87 0.96	$\delta\text{-CH}_2 = 1.06$, $\epsilon\text{-CH}_2 = 2.87$, 3.02
Trp	4.38	3.29	-	6H = 7.15, 5H = 7.24, 2H: 7.28, 4H = 7.48, 7H = 7.63
Cys	4.59	3.26	-	-

^{13}C NMR (D_2O , 100 MHz) δ

	CO	$\alpha\text{-C}$	$\beta\text{-C}$	$\gamma\text{-C}$	Autres
NO2A-AHM	-	-	-	-	24.3 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 25.6 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 26.1 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 33.0 ($\text{CH}_2\text{-CO-NH}$), 33.2 ($\text{CH}_2\text{-CO-N}$), 39.1 ($\text{CH}_2\text{-N}(\text{CO})_2$), 35.6 ($\text{CH}_2\text{-CH}$), 40.5 (CH), 49.0 (2 N- CH_2), 50.1 (2 N- CH_2), 51.2 (2 N- CH_2), 57.4 (3 N- $\text{CH}_2\text{-COO}$), 172.1 (CO-N), 172.2 (3 COOH), 175.9 (N-NH-CO), 178.0 (2 CO)
Glu	176.5	52.7	26.4	30.1	COOH = 177.4, CO (urea) = 179.6
Lys	177.3	53.2	30.6	22.1	$\delta\text{-CH}_2 = 27.4$, $\epsilon\text{-CH}_2 = 39.0$
Trp	167.7	52.4	27.1	108.6	4C = 112.0, 5C = 118.4, 6C = 119.4, 7C = 122.1, 2C: 124.6, 8C = 126.9, 9C = 136.2
Cys	172.2	55.6	32.6	-	-

HPLC-MS (ESI) calculated for $\text{C}_{50}\text{H}_{73}\text{N}_{12}\text{O}_{19}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 1177.48, found 1177.55

Synthesis of 2,2'-(7-(2-(2-(6-(3-(((2R,5S,11S,14R)-14-benzyl-11-(carboxymethyl)-5-(3-guanidinopropyl)-3,6,9,12,15-pentaoxo-1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadecan-2-yl)methyl)thio)-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl)-1-(carboxymethyl)hydrazinyl)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetic acid (NO2A-AHM-c(RGDfC), **28)**

Formula: C₄₈H₇₀N₁₄O₁₇S

MW: 1147.23 g/mol

NO2A-AHM (15.3 mg, 27.0 nmol, 1 equiv) and **21** (15.6 mg, 27.0 nmol, 1 equiv) were dissolved in PBS (2 mL, 0.1 M, pH 7.4) and stirred at 40°C for 90 min. HPLC purification was achieved using a gradient of 5% to 40% of B in 30 min. **28** was detected by UV at 280 nm (*R*_t: 24.3 min) and the collected fraction was evaporated under reduced pressure and then freeze dried. **28** was obtained as a white powder (19,35 mg, 77%).

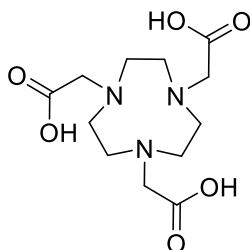
Analytical HPLC (5-65%B, 15 min, 0.8 mL/min) *R*_t: 9.33 min, purity: 99.6% at 214 nm.

¹H NMR (D₂O, 300 MHz) δ

	α-H	β-H	γ-H	Others
NO2A-AHM	-	-	-	1.26-1.38 (m, 2H, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CONH), 1.49-1.79 (m, 4H, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CONH), 2.36 (t, 2H, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH ₂ -CO-NH), 2.45-2.61 (m, 2H, CH ₂ -CH-S), 3.11-3.32 (m, 8H, 4 CH ₂), 3.42 (s, 6H, 2 CH ₂ , N-CH ₂ -CO-N), 3.83-3.92 (m, 6H, 3 CH ₂ -COOH), 3.49-3.57 (m, 2H, CH ₂ -N-(CO) ₂), 3.76 (dd, 1H, <i>J</i> = 9.0, 3.9 Hz, CH-S)
Arg	4.36	1.73 1.89	1.61	δ-CH ₂ = 3.32
Gly	4.20 4.24	-	-	-
Asp	4.76	2.74 2.90	-	-
Phe	4.67	3.06	-	5 CH _{Ar} = 7.24 – 7.39
Cys	4.42	2.98 3.22	-	-

^{13}C NMR (D_2O , 100 MHz) δ

	CO	α -C	β -C	γ -C	Others
NO2A-AHM	-	-	-	-	24.3 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 25.6 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 26.5 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 32.8 ($\text{CH}_2\text{-CO-N}$), 33.0 ($\text{CH}_2\text{-CO-NH}$), 39.0 ($\text{CH}_2\text{-N-(CO)}_2$), 35.9 ($\text{CH}_2\text{-CH}$), 40.6 (CH), 49.2 (2 N-CH_2), 50.1 (2 N-CH_2), 51.1 (2 N-CH_2), 57.2 (3 $\text{N-CH}_2\text{-COO}$), 178.1 (CO-N), 172.1 (3 COOH), 175.9 (N-NH-CO), 179.2 (2 CO)
Arg	171.4	54.5	27.1	24.6	$\delta\text{-CH}_2 = 40.7$, $\text{NH-C(=NH)(NH}_2) = 156.75$
Gly	171.8	43.5	-	-	-
Asp	171.6	49.7	34.6	174.3	
Phe	172.7	55.1	36.6	136.2	$\text{C}_{\text{Ar}} = 127.2$, $\text{C}_{\text{Ar}} = 128.8$, $\text{C}_{\text{Ar}} = 128.9$, $\text{C}_{\text{Ar}} = 129.3$, $\text{C}_{\text{Ar}} = 130.0$
Cys	172.0	39.7	32.0	-	-

HPLC-MS (ESI) calculated for $\text{C}_{48}\text{H}_{71}\text{N}_{14}\text{O}_{17}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 1147.48, found 1147.55**Synthesis of NOTA**Formula: $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_6$

MW: 303.32 g/mol

Compound **NO2AtBu** (15 mg, 0.042 mmol, 1 equiv) and K_2CO_3 (11.6 mg, 0.084 mmol, 2 equiv) was dissolved in cooled DMF (15 mL, 0°C). Tert-butyl bromoacetate (6.83 μL , 0.046 mmol, 1.1 equiv) was dissolved in anhydrous DMF (3 mL) and added dropwise during 2 hours to the stirred solution. The reaction mixture was slowly raised to RT and stirred overnight. Then, the reaction mixture was filtered to remove K_2CO_3 salt. TFA was added (500 μL , 2.94 mmol, 70 equiv) and the reaction mixture was stirred at RT during 5 hours. **NOTA** was precipitated in cooled diethyl ether (15 mL, -20°C). The supernatant was removed after centrifugation at 5000 rpm during 10 min. **NOTA** was obtained as a white powder (9.4 mg, 74%).

Analytical HPLC (5-40% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t : 3.27 min, purity: 99% at 214 nm.

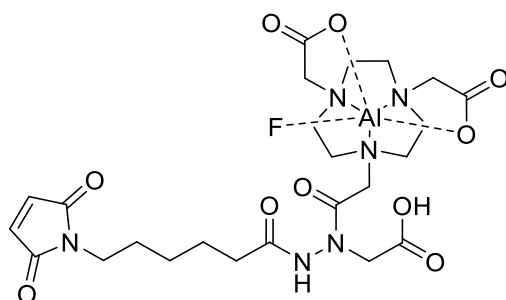
^1H NMR (D_2O , 300 MHz) δ 3.51 (t, 12H, $J = 6.9$ Hz, N-**CH₂-CH₂-N**), 4.06 (s, 6H, NH-**CH₂-COO**)

^{13}C NMR (D_2O , 75 MHz) δ 51.6 (3 N-**CH₂-CH₂-N**), 57.4 (3 **CH₂-COO**), 172.0 (3 **COO**)

HPLC-MS (ESI) calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 304.14, found 304.15.

Complexations

Synthesis of $\text{Al}^{\text{nat}}\text{F-NO2A-AHM}$



Formula:

$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{AlFN}_6\text{O}_{10}$

MW: 612.55 g/mol

AlCl_3 solution in sodium acetate buffer 0.1 M pH 4.5 (2.5 mL, 10.55 mM, 1.5 equiv) and NaF solution in sodium acetate buffer 0.1 M pH 4.5 (2.5 mL, 31.65 mM, 4.5 equiv) were put in contact for 5 min at RT. **NO2A-AHM** solution (1 mL, 17.58 mM, 1 equiv) in sodium acetate buffer 0.1 M pH 4.5 and EtOH (6 mL) were added to the $\{\text{AlF}\}^{2+}$ solution to reach a 50% of EtOH rate into final solution. The resulted mixture solution was heated for 30 min at 90 °C. HPLC purification was achieved using a gradient of 5% to 45% of B in 30 min. $\text{Al}^{\text{nat}}\text{F-NO2A-AHM}$ was detected by UV at 220 nm (R_t : 15.2 min). The collected fraction was evaporated under reduced pressure and then freeze dried to afford $\text{Al}^{\text{nat}}\text{F-NO2A-AHM}$ (8.1 mg, 75%) as a white powder.

Analytical HPLC (5-40% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t : 8.43 min, purity: 96% at 214 nm.

^1H NMR (D_2O , 400 MHz, 300 K) δ 1.49-1.66 (m, 2H, **CH₂-CH₂-CH₂-CONH**), 1.74-2.01 (m, 4H, **CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH**), 2.63 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, **CH₂-CO-NH**), 2.96-4.59 (m, 22H, 11 **CH₂**), 6.87 (s, 2H, **HC=CH**).

^{13}C NMR (D_2O , 100 MHz, 300 K) δ 24.3 (**CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH**), 25.5 (**CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH**), 27.3 (**CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH**), 33.1 (**CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH**), 37.4 (**CH₂-N-(CO)₂**), 49.1 (N-**CH₂**), 49.8 (N-**CH₂**), 51.7 (N-**CH₂**), 52.8 (N-**CH₂**), 52.9 (N-**CH₂**), 53.5 (N-**CH₂**), 54.0 (**CH₂-CO-N**), 55.4 (N-**CH₂-COO**), 62.9 (N-**CH₂-COO**), 63.0 (N-**CH₂-COO**),

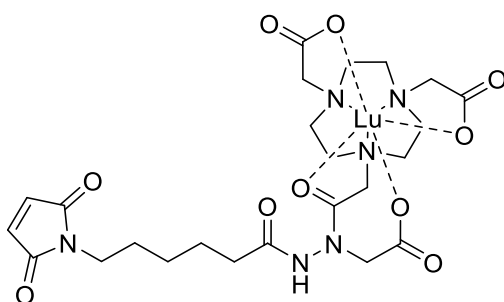
134.3 (2 HC=CH), 170.9 (NH-N-CO), 171.5 (2 CO), 173.4 (CO-NH), 176.1 (COO), 176.4 (2 CO₂).

¹⁹F NMR (D₂O, 376 MHz) δ -176.31 ppm.

²⁷Al NMR (D₂O, 104 MHz) δ 69.72 ppm.

HPLC-MS (ESI) calculated from C₂₄H₃₅AlFN₆O₁₀ [M+H]⁺ m/z 613.21, found 613.15.

Synthesis of ^{nat}Lu-NO2A-AHM



Formula: C₂₄H₃₄LuN₆O₁₀

MW: 740.53 g/mol

To a solution of **NO2A-AHM** in sodium acetate buffer 0.1 M pH 4.5 (2 mL, 10.63 mM, 1 equiv) was added a solution of Lu(NO₃)₃ in sodium acetate buffer 0.1 M pH 4.5 (2.5 mL, 11.42 mM, 1.5 equiv) at RT. The resulted mixture was heated for 30 min at 40°C. HPLC purification was achieved using a gradient of 5% to 35% of B in 35 min. ^{nat}Lu-NO2A-AHM was detected by UV at 214 nm (R_t: 19.4 min). The collected fraction was evaporated under reduced pressure and then freeze dried to afford ^{nat}Lu-NO2A-AHM (11.2 mg, 66%) as a white powder.

Analytical HPLC (5-50% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t: 7.08 min, purity: 99% at 214 nm.

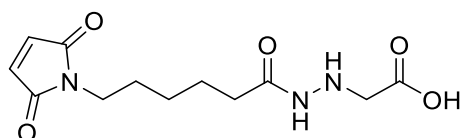
¹H NMR (D₂O, 400 MHz, 300 K) δ 1.22-1.40 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 1.49-1.77 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 2.25-2.46 (m, 2H, CH₂-CO-NH), 2.86-3.40 (m, 12H, 6 CH₂ (NOTA)), 3.39-3.91 (m, 10 H, 3 N-CH₂-COO, CO-CH₂-N, CH₂-N-(CO)₂), 6.83 (s, 2H, HC=CH).

¹³C NMR (D₂O, 100 MHz, 300 K) δ 24.2 (CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 25.6 (CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 27.4 (CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 33.1 (CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH), 37.5 (CH₂-N-(CO)₂), 49.0 (N-CH₂), 50.3 (N-CH₂), 51.0 (N-CH₂), 51.8 (N-CH₂), 52.8 (N-CH₂), 54.5 (N-CH₂), 54.8 (CH₂-CO-N), 58.2 (N-CH₂-COO), 61.7 (N-CH₂-COO), 64.9 (N-CH₂-COO), 134.4 (2 HC=CH), 172.3 (NH-N-CO), 173.5 (2 CO), 175.6 (CO-NH), 179.4 (COO), 180.1 (2 CO₂).

HPLC-MS (ESI) calculated from $C_{24}H_{34}LuN_6O_{10}$ $[M+H]^+$ m/z 741.17, found 741.15.

Study of the complexation of Ga^{3+} on NO2A-AHM

Synthesis of (6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamido)glycine (**17**)



Formula: $C_{12}H_{17}N_3O_5$

MW: 283.28 g/mol

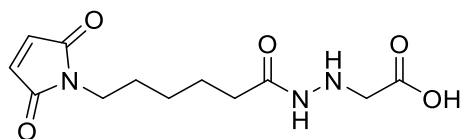
To a solution of **NO2A-AHM** in sodium acetate buffer 0.1 M, pH 4.5 (1 mL, 5 mg/mL, 1 equiv) was added a solution of $Ga(NO_3)_3$ in sodium acetate buffer 0.1 M, pH 4.5 (1 mL, 3.38 mg/mL, 1.5 equiv). The resulted mixture was stirred for 3 min at RT and compound **17** was purified by HPLC using a gradient of 5% to 50% of B in 30 min. Compound **17** was detected by UV at 308 nm (R_t : 15.9 min). The collected fraction was evaporated under reduced pressure and then freeze dried to afford compound **17** (4.1 mg, 83%) as a white powder.

Analytical HPLC (5-50% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t : 8.43 min, 96% at 214 nm.

1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 1.06-1.35 (m, 2H, $CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CONH$), 1.38-1.60 (m, 4H, $CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CONH$), 2.21-2.2.39 (m, 2H, $CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CONH$), 3.36-3.50 (m, 2H, $(CO)_2N-CH_2$), 3.70 (s, 2H, $NH-CH_2-COOH$), 6.98 (s, 2H, $HC=CH$), 7.25 (s, 1H, NH), 7.98 (s, 1H, CO-NH)

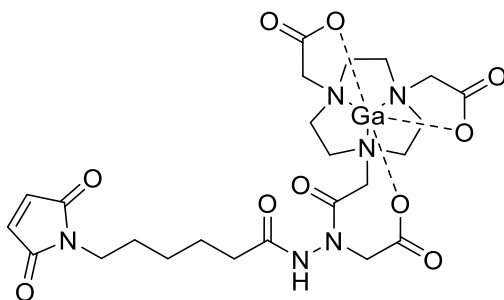
HPLC-MS (ESI) calculated from $C_{12}H_{18}N_3O_5$ $[M+H]^+$ m/z 284.12, found 284.05

Kinetic study of cleavage of NO2A-AHM by $GaCl_3$.



Formula: $C_{12}H_{17}N_3O_5$

MW: 283.28 g/mol

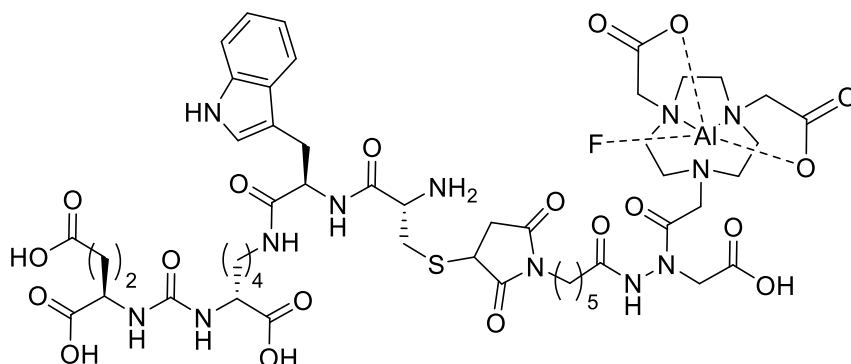


Formula: $C_{24}H_{33}GaN_6O_{10}$

MW: 629.11 g/mol

To a solution of **NO2A-AHM** in sodium acetate buffer 0.1 M, pH 4.5) (0.1 mL, 10.63 mM, 1 equiv) at 0°C was added a solution of $GaCl_3$ (6.13 μ L, 28.68 mM, 1 equiv) in sodium acetate

Synthesis of Al^{nat}F-(((1*S*)-5-((2*S*)-2-((2*R*)-2-amino-3-((1-(6-(2-(2-(4,7-bis(carboxymethyl)-1,4,7-triazonan-1-yl)acetyl)-2-(carboxymethyl)hydrazinyl)-6-oxohexyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)thio)propanamido)-3-(1*H*-indol-3-yl)propanamido)-1-carboxypentyl)carbamoyl)-L-glutamic acid (Al^{nat}F-27)



Formula:

C₅₀H₇₀AlFN₁₂O₁₉S

MW: 1221.21 g/mol

A solution of AlCl₃ (1.9 mg, 14.0 nmol, 1.5 equiv) at 2 mg/mL in NaOAc buffer 0.1 M pH 4.5 (0.94 mL) and a solution of NaF (2 mg, 46. nmol, 4.5 equiv) at 2 mg/mL in NaOAc buffer 0.1 M pH 4.5 (1 mL) were mixed together. The resulted mixture was stirred at RT for 20 min. A solution of **27** (11.0 mg, 9.5 nmol, 1 equiv) at 6.28 mg/mL in NaOAc buffer 0.1 M pH 4.5 (1.75 mL) and absolute EtOH (3.7 mL, 50% of total volume) were added to the reaction mixture and stirred at 70°C for 30 min. EtOH was removed under reduced pressure. HPLC purification was achieved using a gradient of 5% to 35% of B in 35 min. Al^{nat}F-**27** was detected by UV at 280 nm (R_t: 22.75 min) and the collected fraction was evaporated under reduced pressure and then freeze dried. Al^{nat}F-**27** was obtained as a white powder (8.8 mg, 78%).

Analytical HPLC (5-40% B, 15 min, 0.8 mL/min) R_t: 10.49 min, purity: 95% at 214 nm.

¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ

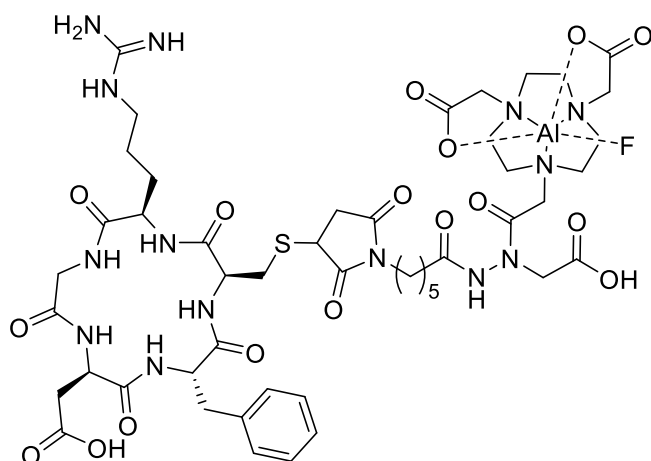
	α-H	β-H	γ-H	Others
NO ₂ A- AHM	-	-	-	1.26-1.40 (m, 2H, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CONH), 1.53-1.74 (m, 4H, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CONH), 2.37 (br s, 2H, CH ₂ -CO-NH), 2.61-2.74 (m, 2H, CH ₂ -CH-S), 2.97-3.79 (m, 22H, 6 CH ₂ (NOTA), N-CH ₂ -CO-N, CH ₂ -N-(CO) ₂ , 3 CH ₂ -COOH), 3.98-4.10 (m, 1H, CH-S),
Glu	4.24	1.95 2.13	2.49	-
Lys	4.03	1.48 1.57	0.88 0.96	δ-CH ₂ = 1.08, ε-CH ₂ = 2.87, 3.05
Trp	4.35	3.29	-	6H = 7.16, 5H = 7.24, 2H = 7.27, 4H = 7.49, 7H = 7.64
Cys	4.58	3.26	-	-

^{13}C NMR (D_2O , 100 MHz) δ

	CO	α -C	β -C	γ -C	Others
NO ₂ A-AHM	-	-	-	-	24.4 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 25.6 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 26.4 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 33.2 ($\text{CH}_2\text{-CO-NH}$), 33.2 ($\text{CH}_2\text{-CO-N}$), 35.5 ($\text{CH}_2\text{-CH}$), 39.0 ($\text{CH}_2\text{-N-(CO)}_2$), 39.0 (CH), 49.1 (N-CH ₂), 50.8 (N-CH ₂), 51.6 (N-CH ₂), 52.8 (N-CH ₂), 52.9 (N-CH ₂), 53.2 (N-CH ₂), 62.8 (N-CH ₂ -COO), 62.9 (2 N-CH ₂ -COO), 170.7 (CO-N), 176.1 (COOH), 176.9 (N-NH-CO), 177.6 (COOH), 178.1 (COOH) 179.6 (2 CO)
Glu	176.2	52.4	26.7	30.3	COOH = 177.6, CO (urea) = 179.8
Lys	178.1	53.5	30.7	22.1	δ -CH ₂ = 27.4, ϵ -CH ₂ = 39.0
Trp	167.7	52.5	27.1	108.7	4C = 112.0, 5C = 118.5, 6C = 119.4, 7C = 122.1, 2C = 124.6, 8C = 127.0, 9C = 136.2
Cys	172.3	55.5	32.6	-	-

 ^{19}F NMR (D_2O , 282 MHz) δ -166.70HPLC-MS (ESI) calculated for $\text{C}_{50}\text{H}_{71}\text{AlFN}_{12}\text{O}_{19}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 1221.44, found 1221.45

Synthesis of Al^{nat}F-2,2'-(7-(2-(2-(6-(3-(((2R,5S,11S,14R)-14-benzyl-11-(carboxymethyl)-5-(3-guanidinopropyl)-3,6,9,12,15-pentaoxo-1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadecan-2-yl)methyl)thio)-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl)-1-(carboxymethyl)hydrazinyl)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetic acid (Al^{nat}F-28)

Formula: $\text{C}_{48}\text{H}_{68}\text{AlFN}_{14}\text{O}_{17}\text{S}$

MW: 1191.19 g/mol

A solution of AlCl_3 (2.4 mg, 18.2 nmol, 1.5 equiv) at 2 mg/mL in NaOAc buffer 0.1 M pH 4.5 (1.2 mL) and a solution of NaF (2.6 mg, 60.8 nmol, 4.5 equiv) at 2 mg/mL in NaOAc buffer 0.1 M pH 4.5 (1.3 mL) were mixed together. The resulted mixture was stirred at RT for 20 min. A solution of **28** (13.9 mg, 12.2 nmol, 1 equiv) at 6.97 mg/mL in NaOAc buffer 0.1 M pH 4.5 (2 mL) and absolute EtOH (4.5 mL, 50% of total volume) were added to the reaction mixture

and stirred at 70°C for 30 min. Ethanol was removed under reduced pressure. HPLC purification was achieved using a gradient of 5% to 35% of B in 35 min. **Al^{nat}F-28** was detected by UV at 280 nm (R_t : 30.65 min) and the collected fraction was evaporated under reduced pressure and then freeze dried. **Al^{nat}F-28** was obtained as a white powder (11.6 mg, 81%).

Analytical HPLC (5-50% B, 15 min, 0.8 mL/min) R_t : 10.27 min, purity: 95% at 214 nm.

^1H NMR (D_2O , 300 MHz) δ

	$\alpha\text{-H}$	$\beta\text{-H}$	$\gamma\text{-H}$	Others
NO2A-AHM	-	-	-	1.25-1.42 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 1.48-1.78 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 2.37 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CO-NH}$), 2.45-2.61 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH-S}$), 3.09-3.81 (m, 22H, 6 CH_2 (NOTA), N- $\text{CH}_2\text{-CO-N}$, 3 $\text{CH}_2\text{-COOH}$, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{CO})_2$), 3.86 (dd, 1H, $J = 8.7, 3.5$ Hz, CH-S)
Arg	4.35	1.73 1.89	1.91	$\delta\text{-CH}_2 = 3.17$
Gly	4.21 4.25	-	-	-
Asp	4.67	2.76 2.94	-	-
Phe	4.45	3.05	-	5 $\text{CH}_{\text{Ar}} = 7.24 - 7.41$
Cys	4.38	2.95 3.13	-	-

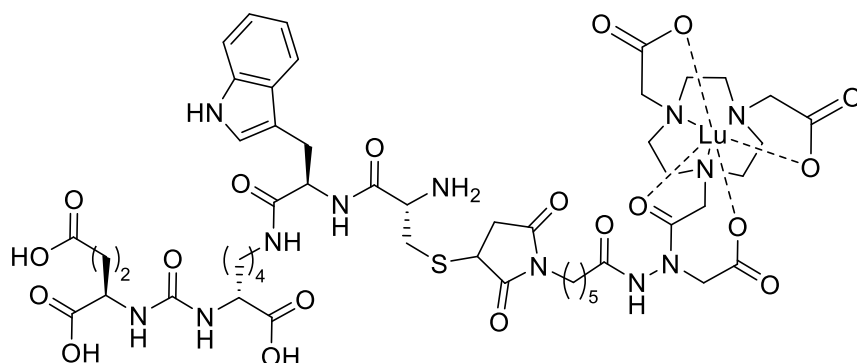
^{13}C NMR (D_2O , 100 MHz) δ

	CO	$\alpha\text{-C}$	$\beta\text{-C}$	$\gamma\text{-C}$	Others
NO2A-AHM	-	-	-	-	24.4 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 25.6 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 26.5 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 32.9 ($\text{CH}_2\text{-CO-N}$), 33.2 ($\text{CH}_2\text{-CO-NH}$), 35.8 ($\text{CH}_2\text{-N}(\text{CO})_2$), 35.9 ($\text{CH}_2\text{-CH}$), 36.5 (CH), 49.1 (N- CH_2), 50.2 (N- CH_2), 51.7 (N- CH_2), 53.0 (N- CH_2), 53.2 (N- CH_2), 54.0 (N- CH_2), 54.3 (N- $\text{CH}_2\text{-COO}$), 55.5 (N- $\text{CH}_2\text{-COO}$), 55.6 (N- $\text{CH}_2\text{-COO}$), 176.0 (COOH), 176.0 (N-NH-CO), 176.2 (COOH), 177.9 (COOH), 178.1 (CO-N), 179.2 (CO), 179.7 (CO)
Arg	170.9	53.1	26.9	24.6	$\delta\text{-CH}_2 = 40.8$, NH-C(=NH)(NH ₂) = 156.7
Gly	171.4	43.4	-	-	-
Asp	171.3	49.7	34.5	174.3	
Phe	172.8	55.3	34.6	136.2	$\text{C}_{\text{Ar}} = 127.2$, $\text{C}_{\text{Ar}} = 128.8$, $\text{C}_{\text{Ar}} = 128.9$, $\text{C}_{\text{Ar}} = 129.3$, $\text{C}_{\text{Ar}} = 129.4$
Cys	172.0	39.6	31.9	-	-

^{19}F NMR (D_2O , 282 MHz): $\delta = -166.58$ ppm

HPLC-MS (ESI) calculated for $\text{C}_{48}\text{H}_{69}\text{AlFN}_{14}\text{O}_{17}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 1191.40, found 1191.40

Synthesis of $^{\text{nat}}\text{Lu}-(((1S)-5-((2S)-2-((2R)-2\text{-amino-3-}((1-(6-(2-(2-(4,7\text{-bis(carboxymethyl)-1,4,7\text{-triazonan-1-yl)acetyl)-2-(carboxymethyl)hydrazinyl)-6\text{-oxohexyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)thio)propanamido)-3-(1*H*-indol-3-yl)propanamido)-1-carboxypentyl)carbamoyl)-L-glutamic acid ($^{\text{nat}}\text{Lu-27}$)$



Formula:

$\text{C}_{50}\text{H}_{69}\text{LuN}_{12}\text{O}_{19}\text{S}$

MW: 1349.17 g/mol

A solution of **27** (21.8 mg, 19.0 nmol, 1 equiv) at 10.88 mg/mL in NaOAc buffer 0.1 M pH 4.5 (2 mL) and a solution of $\text{Lu}(\text{NO}_3)_3$ 10.3 mg, 28.4 nmol, 1.5 equiv) at 3.81 mg/mL in NaOAc buffer 0.1 M pH 4.5 (2.7 mL) were added to the reaction mixture and stirred at 40°C for 30 min. HPLC purification was achieved using a gradient of 5% to 35% of B in 35 min. $^{\text{nat}}\text{Lu-27}$ was detected by UV at 280 nm (R_t : 25.75 min) and the collected fraction was evaporated under reduced pressure and then freeze dried. $^{\text{nat}}\text{Lu-27}$ was obtained as a white powder (15.45 mg, 62%).

Analytical HPLC (5–50%B in 15 min, 0.8 mL/min) R_t : 8.67 min, purity: 95% at 214 nm.

^1H NMR (D_2O , 400 MHz) δ

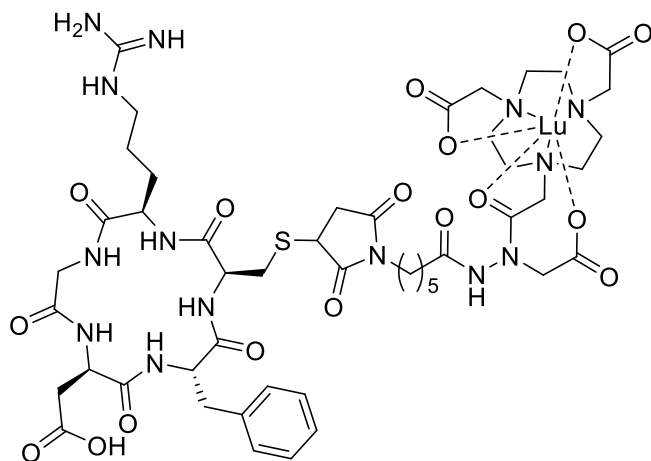
	$\alpha\text{-H}$	$\beta\text{-H}$	$\gamma\text{-H}$	Others
NO2A-AHM	-	-	-	1.26-1.39 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 1.53-1.73 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 2.38 (br s, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO-NH}$), 2.61-2.71 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH-S}$), 2.91-3.86 (m, 22H, 6 CH_2 (NOTA), $\text{N-CH}_2\text{-CO-N}$, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{CO})_2$, 3 $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 3.97-4.10 (m, 1H, CH-S),
Glu	4.24	1.95 2.15	2.48	-
Lys	4.04	1.49	0.89 0.96	$\delta\text{-CH}_2 = 1.07$, $\epsilon\text{-CH}_2 = 2.85$, 3.04
Trp	4.39	3.27	-	6H = 7.16, 5H = 7.25, 2H = 7.27, 4H = 7.49, 7H = 7.65
Cys	4.60	3.21	-	-

^{13}C NMR (D_2O , 100 MHz) δ

	CO	α -C	β -C	γ -C	Others
NO ₂ A- AHM	-	-	-	-	24.3 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 25.6 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 26.4 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 32.7 ($\text{CH}_2\text{-CO-NH}$), 33.1 ($\text{CH}_2\text{-CO-N}$), 35.7 ($\text{CH}_2\text{-CH}$), 39.0 ($\text{CH}_2\text{-N-(CO)}_2$), 39.0 (CH), 48.8 (N-CH ₂), 50.1 (N-CH ₂), 50.9 (N-CH ₂), 53.8 (N-CH ₂), 54.1 (N-CH ₂), 54.6 (N-CH ₂), 58.0 (N-CH ₂ -COO), 64.7 (2 N-CH ₂ -COO), 159.3 (CO-N), 175.9 (COOH), 177.7 (N-NH-CO), 178.0 (COOH), 179.6 (COOH) 179.8 (2 CO)
Glu	174.0	52.4	26.7	30.3	COOH = 175.8, CO (urea) = 180.1
Lys	177.0	53.1	30.7	22.1	δ -CH ₂ = 27.4, ϵ -CH ₂ = 39.0
Trp	167.9	52.5	27.1	108.6	4C = 112.0, 5C = 118.5, 6C = 119.4, 7C = 122.1, 2C = 124.6, 8C = 127.0, 9C = 136.2
Cys	172.2	53.5	32.6	-	-

HPLC-MS (ESI) calculated for $\text{C}_{50}\text{H}_{69}\text{LuN}_{12}\text{O}_{19}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 134939, found 1349.45

Synthesis of $^{\text{nat}}\text{Lu-2,2'-(7-(2-(2-(6-(3-(((2\text{R},5\text{S},11\text{S},14\text{R})-14\text{-benzyl-11-(carboxymethyl)-5-(3-guanidinopropyl)-3,6,9,12,15-pentaoxo-1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadecan-2-yl)methyl)thio)-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl)-1-(carboxymethyl)hydrazinyl)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetic acid ($^{\text{nat}}\text{Lu-28}$)$

Formula: $\text{C}_{48}\text{H}_{67}\text{LuN}_{14}\text{O}_{17}\text{S}$

MW: 1319.17 g/mol

A solution of **28** (21.3 mg, 18.6 nmol, 1 equiv) at 10.64 mg/mL in NaOAc buffer 0.1 M pH 4.5 (2 mL) and a solution of $\text{Lu}(\text{NO}_3)_3$ (9.8 mg, 27.0 nmol, 1.5 equiv) at 3.81 mg/mL in NaOAc buffer 0.1 M pH 4.5 (2.6 mL) were added to the reaction mixture and stirred at 40°C for 30 min. HPLC purification was achieved using a gradient of 5% to 35% of B in 35 min. $^{\text{nat}}\text{Lu-28}$ was detected by UV at 280 nm (R_t : 27.80 min) and the collected fraction was evaporated under

Partie Expérimentale

reduced pressure and then freeze dried. ^{nat}**Lu-28** was obtained as a white powder (13.67 mg, 56%).

¹H NMR (D₂O, 400 MHz): δ

	α-H	β-H	γ-H	Others
NO ₂ A-AHM	-	-	-	1.23-1.38 (m, 2H, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CONH), 1.52-1.75 (m, 4H, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CONH), 2.38 (br s, 2H, CH ₂ -CO-NH), 2.50-2.56 (m, 2H, CH ₂ -CH-S), 3.06-3.95 (m, 23H, 6 CH ₂ (NOTA), N-CH ₂ -CO-N, 3 CH ₂ -COOH, CH ₂ -N-(CO) ₂ , CH-S)
Arg	4.26	1.65 1.69	2.07	δ-CH ₂ = 3.17
Gly	4.21 4.20	-	-	-
Asp	4.72	2.76 2.99	-	-
Phe	4.66	3.04	-	5 CH _{Ar} = 7.26 – 7.36
Cys	4.24	2.87 3.13	-	-

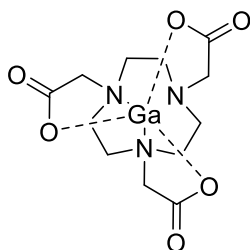
¹³C NMR (D₂O, 100 MHz) δ

	CO	α-C	β-C	γ-C	Others
NO ₂ A-AHM	-	-	-	-	26.7 (CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CONH), 27.1 (CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CONH), 28.9 (CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CONH), 35.5 (CH ₂ -CO-N), 37.5 (CH ₂ -CO-NH), 38.4 (CH ₂ -N-(CO) ₂), 38.9 (CH ₂ -CH), 41.4 (CH), 51.3 (N-CH ₂), 52.6 (N-CH ₂), 53.9 (N-CH ₂), 54.0 (N-CH ₂), 56.5 (N-CH ₂), 57.1 (N-CH ₂), 57.7 (2 N-CH ₂ -COO), 64.1 (N-CH ₂ -COO), 175.5 (COOH), 176.5 (N-NH-CO), 177.2 (COOH), 178.3 (COOH), 180.6 (CO-N), 180.8 (CO), 181.1 (CO)
Arg	173.8	52.3	29.6	28.0	δ-CH ₂ = 42.1, NH-C(=NH)(NH ₂) = 159.2
Gly	173.9	43.1	-	-	-
Asp	173.9	46.0	36.1	175.2	
Phe	174.7	55.3	37.5	138.7	C _{Ar} = 129.7, C _{Ar} = 131.3, C _{Ar} = 131.3, C _{Ar} = 131.8, C _{Ar} = 131.8
Cys	174.5	39.6	31.9	-	-

Analytical HPLC (5–50% B in 15 min, 0.8 mL/min) R_t: 9.71 min, purity: 93.3% at 214 nm.

HPLC-MS (ESI) calculated for C₄₈H₆₇LuN₁₄O₁₇S [M+H]⁺ m/z 1319.40, found 1319.65

Synthesis of Ga-NOTA



Formula: $C_{12}H_{18}GaN_3O_6$

MW: 370.01 g/mol

To a solution of NOTA in NaOAc buffer 0.1 M pH 4.5 (100 μ L, 1 mg/mL, 0.33 mmol, 1 equiv). was added NaOAc buffer 0.1 M pH 4.5 (100 μ L) and a solution of GaCl₃ in NaOAc buffer 0.1 M pH 4.5 (34.5 μ L, 2 mg/mL, 0.99 mmol, 3 equiv). The reaction mixture was stirred 30 min at 40°C.

Conversion rate >9%.

Analytical HPLC (5-40% B in 15 min, 0.8 mL/min), R_t: 2.27 min, purity >99% at 214 nm.

HPLC-MS (ESI) calculated for $C_{12}H_{18}GaN_3O_6Na$ [M+Na]⁺ m/z 392.03, found 392.10.

Molecular modeling

Initial structures were generated using Avogadro 1.2.0 software^[291,292] and used as input for further geometry optimization. The geometry's optimization has been performed with density functional theory (DFT) using B3LYP functionals. The 6-31G(d)* basis set was used for **AlF-NO2A-AHM** study whereas basis set def2-TZVP+SDD was used for **Lu-NO2A-AHM**. All the calculations have been performed using the Gaussian16 software.^[293] Optimization was performed in aqueous solution with water modeled as a polarizable continuum model (PCM). Vibrational frequencies have been calculated to confirm that all structures are local minima on the potential energy surface. Furthermore, free energy has been estimated using the rigid rotor approach. Interconversion between different conformations, and defluorination have been studied considering relaxed scans along the respective relevant coordinates using the same level of theory as for the geometry's optimization.

Radiochemistry

Sodium chloride solution for injection, 0.9% (wt/vol) was purchased from B. Braun. Anhydrous AlCl₃, 99.999% (wt/wt), trace metals basis and sodium acetate, 99.99% (wt/wt) trace metals basis were purchased from Sigma Aldrich. Acetic acid glacial (>99.85%) was supplied by Merck. Anhydrous absolute ethanol was purchased from Carlo Erba. PSMA-11 (4,6,12,19-

Tetraazadocosane-1,3,7-tricarboxylic acid, 22-[3-[[[2-[[[5-(2 carboxyethyl)-2 hydroxyphenyl]methyl](carboxymethyl)amino]ethyl](carboxymethyl)amino]methyl]-4-hydroxyphenyl]-5,13,20-trioxo-, (3S,7S)-) was purchased from MedKoo Biosciences (Morrisville, USA) . Only Milli-Q water (18.2 MΩ·cm) was used for the aqueous solution preparation. Sep-Pak[®] Accell Plus QMA Plus Light Cartridge (130 mg Sorbent per Cartridge, 37-55 μm), Oasis HLB prime and Sep-Pak[®] Plus Short tC18 were purchased from Waters.

Buffer was prepared and controlled with Mettler Toledo pH-meter with InLab[®]Micro pH electrode.

The activity measurements were carried out using the radioisotope dose calibrator (CRC[®]-25R, Capintec, Inc.).

No-carrier-added fluoride-18 was produced *via* the ¹⁸O (p,n)¹⁸F nuclear reaction on a PET Trace cyclotron (GE). The bombardment was performed at 10 μA during 5 min to provide about 5 GBq of fluoride-18 delivered as a solution in ¹⁸O-enriched water (1.6 mL).

Gallium-68 was produced using a ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator (Galliapharm: Eckert & Ziegler Europe, 370 MBq) eluted with 5 mL of a 0.1 M HCl solution.

Manuel radiosynthesis were performed using ThermoMixer[®] from Eppendorf. Automated radiosynthesis were carried out on an AllInOne[®] and miniAIO[®] synthesis module (Trasis, Ans, Belgium).

Al³⁺ quantification was realized by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) (Thermo Fisher Scientific iCAP 6300 duo, ASX250 autosampler, QTegra application software).

Quality control procedure

Radiosynthesis of [¹⁸F]AIF-PSMA-11 and [¹⁸F]AIF-NO2A-AHM were monitored by thin-layer chromatography (TLC) using silica plate as stationary phase and H₂O/CH₃CN (4/6, v/v) as mobile phase. Radiolabeling of [⁶⁸Ga]Ga-NO2A-AHM-c(RGDfC) was monitored by TLC using iTLC-SG as stationary phase and NH₄OAc 1 M/MeOH (1/1, v/v) as mobile phase. TLC plates were revealed using TLC-scanner mini-GITA[®] (Elysia Raytest, Straubenhardt, Germany). Gina X software (Elysia Raytest, Angleur, Belgium) was used for operation of chromatograph acquisition and processing of data.

Radiosynthesis were monitored by HPLC using Alliance Waters system (2695eb pump, auto sampler injector, 2998 PDA detector in series with a NaI detector from Berthold (Bad Wildbad, Germany) controlled by Empower Software (Orlando, FL, USA). The system was equipped with an ACE[®] Avantor RP-C18 column (150 x 3.0 mm, 3 μm). Radiolabeling of [¹⁸F]AIF-PSMA-11 was analyzed using a gradient of 5% of B during 0.5 min followed by a gradient from 5% to 40% of B in 10 min (mobile phase A: H₂O, 0.1% TFA, mobile phase B: CH₃CN, 0.1% TFA). The flow rate was 0.6 mL/min and the injection volume was 20 μL. The peaks were detected with UV detection at 280 nm and radioactive detection.

Radiolabeling of [¹⁸F]AIF-NO2A-AHM and [⁶⁸Ga]Ga-NO2A-AHM-c(RGDfC) was analyzed using a gradient from 5% to 40% of B in 12 min (mobile phase A: H₂O, 0.1% TFA, mobile phase B: CH₃CN, 0.1% TFA). The flow rate was 0.6 mL/min and the injection volume was 20 μL. The peaks were detected with UV detection at 280 nm and radioactive detection.

Radiosynthesis were monitored by UHPLC using NEXERA LC40 XS (Shimadzu) system controlled by LabSolution software (Kyoto, Japan) equipped with a PhotoDiode Array Detector SPD-M40 (Shimadzu, Marne-la-Vallée, France) in series with a radio HPLC detector (Herm LB500 with fLumo detector) from Berthold (Bad Wildbad, Germany). The system was equipped with an ACE[®] Avantor excel2 superC18 column (50 x 2.1 mm, 2 μm, 90 Å). The radiotracer was analyzed with an isocratic of 5% of B during 0.5 min followed by a gradient from 5% to 40% of B in 4.5 min (mobile phase A: H₂O, 0.1% TFA, mobile phase B: CH₃CN, 0.1% TFA). The flow rate was 0.8 mL/min and the injection volume was 3-10 μL. The peaks were detected with UV detection at 280 nm and radioactive detection.

Al³⁺ quantification

Sep-Pak[®] Accell Plus QMA Plus Light Cartridge were activated using H₂O (2 x 3 mL) for injection and flushed. Solutions containing 1,079 and 2,698 mg/L of AlCl₃ were eluted from the QMA cartridge. The sample were acidified to 5% with HNO₃ class "TraceMetalTM" (Thermo Fisher Scientific). Concentration of aluminum in the initial solution and the eluate was determined by ICP-OES (Thermo Fisher Scientific iCAP 6300 duo, ASX250 autosampler, QTegra application software). The wavelengths for the analysis were 167, 227, 308 and 396 nm. The radial sight was used for the analysis of all major cations to avoid saturation of the detector. The instrument performed three measurements per sample. An external calibration curve for each wavelength was realized with standard solution containing from 0.05 to 10 mg/L of Al³⁺ in NaCl 0.9%.

EtOH quantification

Ethanol content was determined by gas chromatography (GC) performed on GC-2010 Plus Shimadzu system (Kyoto, Japan), equipped with a flame ionization detector (FID). The GC system was supplied with H₂ (100 mL/min) from PG Plus 100 generator (Vici DBS™, Switzerland), ensuring 99.9996% of hydrogen purity, and He (6.0, Messer, flow rate 30 mL/min). GC system was operated with a SH-Rtx-624 column (30 m × 0.32 mm × 1.8 μm) at the following conditions of oven temperature: 40°C during 1 min, 40-80°C in 4 min, 80-220°C in 3,5 min, 220 °C during 5 min. A volume of 10 μL of sample was injected *via* liquid auto injector system AOC-20i (Shimadzu, Kyoto, Japon). Liquid auto injector was set in split mode. The column and FID were heated to 240°C and 250°C, respectively. Gina X software (Elysia Raytest, Angleur, Belgium) was used for operation of chromatograph acquisition and processing of data.

General method for the radiosynthesis of [¹⁸F]AIF-PSMA-11 in manual mode

[¹⁸F]NaF was synthesized on AllInOne® module following the protocol of Collet *et al.*^[287] Briefly, [¹⁸F]NaF was eluted from a Sep-Pak® Accell Plus QMA Plus Light Cartridge with NaCl 0.9% (3 mL) with RCY of 80.75 ± 3.37% dc (n = 12). Aluminum chloride solution at 2 mM in NaCl 0.9% (5-60 μL, 0.5, 1 or 1.5 equiv relative to amount of PSMA-11) and 500 μL of [¹⁸F]NaF solution (50 MBq) were put in contact together in NaOAc buffer 0.1 M pH 4.5 (125 μL) and EtOH (97-1780 μL) at RT for 5 min. A solution of PSMA-11 of 1 mg/mL in MilliQ water (20, 50 or 80 μL, 1 equiv) in NaOAc buffer 0.1 M pH 4.5 (125 μL) and EtOH (97-1780 μL) were added and the radiolabeling was performed at 35, 50 or 65°C for 15 min using a ThermoMixer® (300 rpm) (EtOH rate of 20, 50 or 80%). The radiolabeling was controlled by radio-UHPLC (R_t: 3.05 min) and by radio-TLC (R_f: 0.76) using the conditions described above.

Purification step optimization

Manual purification was performed on Oasis HLB cartridge or Sep-Pak® tC18 cartridge. The reaction mixture was diluted to reach 2, 10 or 20% of EtOH thanks to NaCl 0.9%. eluted from the cartridge. After flushing step, the cartridge was washed thrice with NaCl 0.9% (3 mL). [¹⁸F]AIF-PSMA-11 was released using EtOH (1 mL). All fraction was measured thanks to dose calibrator.

General method for the radiosynthesis of [^{18}F]AIF-PSMA-11 on AllInOne[®] synthesizer (Trasis)

- **Cassette description**

Tableau 43: Position on manifold of material and reagents for automated radiosynthesis of [^{18}F]AIF-PSMA-11

Manifold position	Materials or reagents
1 horizontal	Silicone tubing to pressure inlet
1 vertical	Silicone tubing to [^{18}O]H ₂ O recovery vial
2	Water for injection (WFI) bag
3	Syringe of 10 mL (S1)
4	Silicone tubing to QMA cartridge at position 5
5	Sep-Pak [®] light Accell plus QMA cartridge
6	[^{18}O]H ₂ O/[^{18}F]F inlet reservoir (S2) (plunger)
7	NaCl 0.9% (wt/vol) bag
8	Aluminum solution vial of 4 mL
9	Silicone tubing to reactor
10	Precursor solution vial of 4 mL
12	Silicone tubing to final vial
13	Silicone tubing to HLB cartridge at position 15
14	Syringe of 10 mL (S3)
15	HLB prime cartridge
16	EtOH vial of 10 mL
18 horizontal	Silicone tubing to exhaust

- **Automated Radiosynthesis**

[^{18}F]Fluoride (500 MBq) delivered as a solution in ^{18}O -enriched water (3 mL) was pumped into the plunger of the AIO[®] module. [^{18}F]Fluoride was trapped on a Sep-Pak[®] Accell Plus QMA Plus Light Cartridge and washed with H₂O (3 mL) for injection. [^{18}F]Fluoride was eluted in [^{18}F]NaF form thanks to NaCl 0.9% (0.5 mL) and placed into the reactor. The aluminum solution (5-60 μL AlCl₃ 2 mM in NaCl 0.9% in NaOAc pH 4,5/EtOH at different proportions (1.5 mL)) (0.5, 1 or 1.5 equiv) was transferred to the reactor to put in contact [^{18}F]NaF and AlCl₃ during 5 min at RT under nitrogen bubbling (150 mbar). PSMA-11 solution (20, 50 or 80 μL PSMA-11 1 mg/mL in H₂O in NaOAc pH 4,5/EtOH at different proportions (1.5 mL)) was transferred in the reactor. The radiolabeling was performed at 35, 50 or 65°C for 15 min in

the sealed reactor. After radiolabeling, the reactor was cooled to 30°C. For radiolabeling efficiency quantification, the crude mixture was analyzed in this step. For fully automated radiosynthesis, the reaction mixture was diluted in the reactor with NaCl 0.9% to reach 10% (v/v) of EtOH. Purification was performed on an Oasis HLB prime cartridge. The diluted reaction mixture was transferred on the HLB cartridge. The reactor was rinsed once with NaCl 0.9% (5 mL) and transferred on the HLB cartridge. The cartridge was washed with NaCl 0.9% (3 x 5 mL). The [¹⁸F]AIF-PSMA-11 was eluted thanks to EtOH (1 mL) into the final vial. Finally, the solution was diluted with NaCl 0.9% (9 mL). Quality control procedure was applied to determine the radiochemical purity of the product by radio-UHPLC (R_t : 3.05 min) and by radio-TLC (R_f : 0.76) using the conditions described above.

Manual Radiosynthesis evaluation of [¹⁸F]AIF-NO2A-AHM

Radiosynthesis was adapted from [¹⁸F]AIF-PSMA-11 radiosynthesis. [¹⁸F]NaF was eluted from a Sep-Pak[®] Accell Plus QMA Plus Light Cartridge with NaCl 0.9% (3 mL). Aluminum chloride solution at 2 mM in NaCl 0.9% (16-26 μ L, 0.6-1 equiv) and [¹⁸F]Na (30 mL) solution (500 μ L, 50 MBq) were put in contact together in 1250 μ L of NaOAc buffer 0.1 M pH 4.5/EtOH (45/55 or 20/80, v/v) at RT for 5 min. A solution of NO2A-AHM of 1 mg/mL in MilliQ water was added (30-50 μ L, 1 equiv) and the radiolabeling was performed at 90°C for 15 min using a ThermoMixer[®] (300 rpm). The radiolabeling efficiency was determined by radio-HPLC using a gradient of 5% to 50% of B in 10 min (R_t : 6.1 min) and by radio-TLC using silica plate as stationary phase and H₂O/CH₃CN (4/6, v/v) as mobile phase (R_f : 0.71).

Radiosynthesis of [⁶⁸Ga]Ga-NO2A-AHM

Radiosynthesis were performed on a miniAIO[®] (Trasis) module. Gallium-68 (316 ± 41 MBq) was eluted from ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator thanks to HCl 0.1 M (5 mL) to the reactor in position 2. The precursor solution containing NO2A-AHM-c(RGDfC) solution at 1 mg/mL (50 μ L), H₂O (100 μ L), fresh sodium ascorbate 0.08 M (350 μ L), NaOAc 1.5 M (450 μ L) in position 4 was transferred to the reactor. The radiolabeling was performed at 30°C for 10 min in a sealed reactor. The diluted reaction mixture was transferred in the final vial in position 6 to evaluate the radiolabeling efficiency.

Purification was performed in manual mode using HLB prime cartridge. The crude of labeling was trapped on HLB. Then washing using NaCl 0.9% (3 x 3 mL) was done. The release was performed using EtOH (1 mL). The activity of each eluted solution and of the HLB cartridge was done for each step.

Crude of labeling was analyzed by HPLC with an ACE[®] Avantor RP-C18 column (150 x 3.0 mm, 3 µm). The radiotracer was analyzed with a gradient from 5% to 60% of B in 15 min (mobile phase A: H₂O, 0.1% TFA, mobile phase B: CH₃CN, 0.1% TFA). The flow rate was 0.8 mL/min and the injection volume was 20 µL. The peaks were detected with UV detection at 220 nm and NaI detector. Crude of labeling was analyzed by radio-TLC using iTLC-SG as stationary phase and NH₄OAc/MeOH (1/1, v/v) as mobile phase.

Automated radiosynthesis of [¹⁷⁷Lu]Lu-NO2A-AHM

Radiosynthesis were performed on a EasyOne[®] (Trasis) module. The lutetium-177 solution (350 ± 30 MBq of [¹⁷⁷Lu]Lu³⁺ in HCl 0.1 M (0,4 mL)) provided by ITM was transferred in the reactor. The precursor solution containing **NO2A-AHM** solution at 1 mg/mL (20 µL) and NaAsc (0,56 M in H₂O) in position 3 was transferred to vial which has contained the lutetium-177 solution and then, was transferred into the reactor. The radiolabeling was performed 30 min at 90°C in a sealed reactor. The reaction mixture was transferred in the final vial in position 6 to evaluate the radiolabeling efficiency and diluted with NaCl 0,9% to reach a final volume of 10 mL.

Manual radiosynthesis of [¹⁷⁷Lu]Lu-NO2A-AHM

Radiosynthesis were performed on a ThermoMixer[®]. The lutetium-177 solution (380 MBq of [¹⁷⁷Lu]Lu³⁺ in HCl 0.1 M (0,4 mL)) provided by ITM was transferred in a vial. The precursor solution containing a **NO2A-AHM** solution at 1 mg/mL (20 µL) in NaAsc (200 mg in 2 mL H₂O) or in NaOAc (0,7 M pH 8, 2 mL) was added to the vial. The radiolabeling was performed 30 min at 40°C in a sealed reactor. The reaction mixture was analyze to evaluate the radiolabeling efficiency.

Crude of labeling with lutetium-177 was analyzed by HPLC with an ACE[®] Avantor RP-C18 column (150 x 3.0 mm, 3 µm). The radiotracer was analyzed with a gradient from 5% to 50% of B in 10 min (mobile phase A: H₂O, 0.1% TFA, mobile phase B: CH₃CN, 0.1% TFA). The flow rate was 0.8 mL/min and the injection volume was 20 µL. The peaks were detected with UV detection at 220 nm and NaI detector. Crude of labeling was analyzed by radio-TLC using iTLC-SG as stationary phase and citrate buffer 0.5 M pH 5.0 as mobile phase.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] “Cancer,” can be found under <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, (accessed 29/09/2022)
- [2] “Qu’est-ce que la chimiothérapie? - Chimiothérapie,” can be found under <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Se-faire-soigner/Traitements/Chimiotherapie/Qu-est-ce-que-la-chimiotherapie>, (accessed 30/09/2022)
- [3] “La chimiothérapie dans le traitement des cancers | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer,” can be found under <https://www.fondation-arc.org/traitements-soins-cancer/chimiotherapie>, (accessed 29/09/2022)
- [4] “L’hormonothérapie | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer,” can be found under <https://www.fondation-arc.org/traitements-soins-cancer/hormonotherapie>, (accessed 29/09/2022)
- [5] “La radiothérapie | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer,” can be found under <https://www.fondation-arc.org/traitements-soins-cancer/la-radiotherapie>, (accessed 29/09/2022)
- [6] G. Sgouros, L. Bodei, *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 589–608.
- [7] A. Sundlöv, K. Sjögren-Gleisner, *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2017**, *44*, 1480–1489.
- [8] C. Kratochwil, F. Bruchertseifer, *et al.*, *J. Nucl. Med.* **2016**, *57*, 1941–1944.
- [9] M. S. Hofman, J. Violet, *et al.*, *Lancet Oncol.* **2018**, *19*, 825–833.
- [10] D. Ganguly, S. Chakraborty, *et al.*, in *Commun. Comput. Inf. Sci.*, **2010**, 504–516.
- [11] A. Rahmim, H. Zaidi, *Nucl. Med. Commun.* **2008**, *29*, 193–207.
- [12] M. L. James, S. S. Gambhir, *Physiol. Rev.* **2012**, *92*, 897–965.
- [13] O. Israel, O. Pellet, *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2019**, *46*, 1990–2012.
- [14] M. Urhan, S. Dadparvar, *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, *34*, 1012–1017.
- [15] G. Gnanasegaran, J. R. Ballinger, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2014**, *41*, 26–35.
- [16] S. L. Pimlott, A. Sutherland, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *40*, 149–162.
- [17] A. R. Andersen, *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* **1989**, *1*, 288–318.
- [18] “There is Only One Cardiolite,” can be found under <https://www.cardiolite.com/index.asp>, (accessed 14/09/2022)
- [19] A. Sainz-Esteban, R. Olmos, *et al.*, *Nucl. Med. Commun.* **2015**, *36*, 251–259.
- [20] A. K. Shukla, U. Kumar, *J. Med. Phys.* **2006**, *31*, 13–21.
- [21] D. W. Townsend, *J. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 938–955.
- [22] T. Jones, D. W. Townsend, *J. Med. Imaging* **2017**, *4*, 011013.
- [23] A. Sanchez-Crespo, *Ga-68 Spec. Issue* **2013**, *76*, 55–62.
- [24] A. Signore, K. L. Anzola, *et al.*, *Curr. Pharm. Des.* **2018**, *24*, 743–753.
- [25] C. M. Paulos, M. J. Turk, *et al.*, *Folate Recept. Target. Drugs Cancer Inflamm. Dis.* **2004**, *56*, 1205–1217.
- [26] C. Collet, S. Schmitt, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 5603–5612.
- [27] S. Tiepolt, M. Patt, *et al.*, *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2019**, *4*, 17.
- [28] F. Mota, A. A. Ordonez, *et al.*, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 1964–1977.
- [29] K. Lameka, M. D. Farwell, M. Ichise, *Handb. Clin. Neurol.*, Elsevier, **2016**, 209–227.
- [30] B. Muoio, L. Giovanella, G. Treglia, *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, 3061–3073.
- [31] A. Clément, T. Zaragori, *et al.*, *Cancer Imaging* **2022**, *22*, 16.
- [32] J. Yang, Y. Kan, *et al.*, *Acta Radiol.* **2014**, *55*, 389–398.
- [33] J. Kuten, I. Fahoum, *et al.*, *J. Nucl. Med.* **2020**, *61*, 527–532.
- [34] M. Abghari-Gerst, W. R. Armstrong, *et al.*, *J. Nucl. Med.* **2022**, *63*, 567–572.
- [35] T. A. Hope, C. Truillet, *et al.*, *J. Nucl. Med.* **2017**, *58*, 81–84.
- [36] A. Afshar-Oromieh, L. P. Sattler, *et al.*, *J. Nucl. Med.* **2017**, *58*, 750–755.
- [37] M. Eder, O. Neels, *et al.*, *Pharmaceuticals* **2014**, *7*, 779–796.
- [38] R. N. Miller, M. A. Pozo, *Clin. Transl. Oncol.* **2011**, *13*, 780–786.
- [39] K. Siwowska, S. Haller, *et al.*, *Mol. Pharm.* **2017**, *14*, 523–532.
- [40] N. Bagdasarov, *Fundam. Rock Phys.*, Cambridge University Press, **2021**, 505–540.
- [41] R. A. Kuznetsov, K. S. Bobrovskaya, *et al.*, *Radiochemistry* **2019**, *61*, 381–395.
- [42] Z. Talip, C. Favaretto, *et al.*, *Mol. Basel Switz.* **2020**, *25*, 966.
- [43] C. Müller, K. Zhernosekov, *et al.*, *J. Nucl. Med.* **2012**, *53*, 1951–1959.
- [44] “The Proton Synchrotron,” can be found under <https://home.cern/fr/science/accelerators/proton-synchrotron>, (accessed 05/10/2022)
- [45] H. Verhoeven, T. E. Cocolios, *et al.*, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B*, **2020**, *463*, 327–329.
- [46] F. Rösch, *Appl. Radiat. Isot.* **2013**, *76*, 24–30.
- [47] T. I. Kostelnik, C. Orvig, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 902–956.

- [48] Y. Xu, W. Qu, *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, 2021, 4653–4682.
- [49] V. Pichler, N. Berroterán-Infante, *et al.*, *J. Nucl. Med.* **2018**, 59, 1350–1354.
- [50] P. J. H. Scott, *Further Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography and New Strategies for Their Production, Volume 2*, John Wiley & Sons, **2015**.
- [51] O. Morris, M. Fairclough, *et al.*, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2019**, 62, 4–23.
- [52] C. Fersing, A. Bouhleb, *et al.*, *Molecules* **2019**, 24, 2866.
- [53] C. Müller, K. A. Domnanich, *et al.*, *Br. J. Radiol.* **2018**, 91, 20180074.
- [54] T. Mastren, B. V. Marquez, *et al.*, *Mol. Imaging* **2015**, 14, 526–532.
- [55] C. J. Anderson, R. Ferdani, *Cancer Biother. Radiopharm.* **2009**, 24, 379–393.
- [56] J. R. Dilworth, S. I. Pascu, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, 47, 2554–2571.
- [57] J. P. Holland, M. J. Williamson, J. S. Lewis, *Mol. Imaging* **2010**, 9, 1–20.
- [58] R. Bejot, V. Gouverneur, *Fluor. Pharm. Med. Chem.*, Imperial College Press, **2011**, 335–382.
- [59] A. R. Jalilian, *Iran. J. Nucl. Med.* **2016**, 24, 1–10.
- [60] R. A. Werner, T. Derlin, *et al.*, *Theranostics* **2020**, 10, 1–16.
- [61] B. J. B. Nelson, J. D. Andersson, F. Wuest, *Pharmaceutics* **2021**, 13, 49.
- [62] S. M. Qaim, B. Scholten, B. Neumaier, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2018**, 318, 1493–1509.
- [63] I. Novak-Hofer, A. P. Schubiger, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2002**, 29, 821–830.
- [64] E. W. Price, C. Orvig, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 43, 260–290.
- [65] C. Müller, N. P. van der Meulen, *et al.*, *J. Nucl. Med.* **2017**, 58, 91S–96S.
- [66] M. R. A. Pillai, R. Nanabala, *et al.*, Knapp, *Nucl. Med. Biol.* **2016**, 43, 692–720.
- [67] C. Müller, C. Vermeulen, *et al.*, *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2017**, 1, 1–5.
- [68] C. Müller, P. A. Schubiger, R. Schibli, *Nucl. Med. Biol.* **2007**, 34, 595–601.
- [69] K. Hashimoto, H. Matsuoka, S. Uchida, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2003**, 255, 575–579.
- [70] S. Banerjee, M. R. A. Pillai, F. F. Knapp, *Chem. Rev.* **2015**, 115, 2934–2974.
- [71] O. Jacobson, D. O. Kiesewetter, X. Chen, *Bioconjug. Chem.* **2015**, 26, 1–18.
- [72] M. Pretze, C. Wängler, B. Wängler, *BioMed Res. Int.* **2014**, 2014, 674063.
- [73] L. C. Libert, X. Franci, *et al.*, *J. Nucl. Med.* **2013**, 54, 1154–1161.
- [74] T. L. Ross, M. Honer, *et al.*, *J. Nucl. Med.* **2010**, 51, 1756–1762.
- [75] T. Vucko, N. Pétry, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, 27, 4101–4109.
- [76] M. Roche, *Stratégies Innovantes Pour Le Radiomarquage de Macro-Biomolécules Au Fluor-18 Pour Des Applications En Imagerie Moléculaire in Vivo*, These de doctorat, Université Paris-Saclay (ComUE), **2018**.
- [77] O. Morris, A. McMahon, *et al.*, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2016**, 59, 277–283.
- [78] O. Morris, J. Gregory, *et al.*, *Appl. Radiat. Isot.* **2016**, 116, 120–127.
- [79] A. Speranza, G. Ortosecco, *et al.*, *Appl. Radiat. Isot.* **2009**, 67, 1664–1669.
- [80] Endocyte, *A Multi-Center Clinical Study to Evaluate the Safety and Efficacy of FolateScan (Technetium Tc 99m EC20) in Women With Suspected Ovarian or Endometrial Cancer*, Clinicaltrials.gov, **2012**.
- [81] B. M. Zeglis, J. S. Lewis, *J. Vis. Exp.* **2015**, e52521.
- [82] D. H. L. Oncology, *An Exploratory Study to Evaluate [68Ga]ABY-025 for PET Imaging of HER2 Expression in Subjects With Metastatic Breast Cancer*, Clinicaltrials.gov, **2015**.
- [83] Memorial Sloan Kettering Cancer Center, *Biodistribution and Dosimetry of Serial PET Imaging With Ga-68 Labeled F(Ab') 2- Trastuzumab*, Clinicaltrials.gov, **2020**.
- [84] A. Iagaru, *68Ga-DOTA-Bombesin PET/MRI in the Evaluation of Patients With Prostate Cancer: A Feasibility Study*, Clinicaltrials.gov, **2017**.
- [85] Xijing Hospital, *68Ga-AlfatideII for the Differential Diagnosis of Lung Cancer and Lung Tuberculosis by PET/CT*, ClinicalTrials.gov, **2015**.
- [86] S. Isal, J. Pierson, *et al.*, *EJNMMI Res.* **2018**, 8, 51.
- [87] W. J. McBride, R. M. Sharkey, *et al.*, *J. Nucl. Med.* **2009**, 50, 991–998.
- [88] O. Boerman, R. Sharkey, *et al.*, *J. Nucl. Med.* **2008**, 49, 52P–52P.
- [89] C. A. D'Souza, W. J. McBride, *et al.*, *Bioconjug. Chem.* **2011**, 22, 1793–1803.
- [90] T. Long, N. Yang, *et al.*, *Clin. Nucl. Med.* **2019**, 44, 452–458.
- [91] Universitaire Ziekenhuizen KU Leuven, *All8F-NOTA-Octreotide PET Imaging of the Somatostatin Receptor in Neuroendocrine Tumors*, Clinicaltrials.gov, **2022**.
- [92] Universitaire Ziekenhuizen KU Leuven, *All8F-NOTA-Octreotide PET Imaging of the Somatostatin Receptor in Neuroendocrine Tumors: A First-in-Human PET/CT Study*, Clinicaltrials.gov, **2020**.
- [93] J. Hou, T. Long, *et al.*, *EJNMMI Res.* **2021**, 11, 55.

- [94] J. Hou, T. Long, *et al.*, *Mol. Imaging* **2022**, 2022, e6511179.
- [95] F. L. Giesel, S. Adeberg, *et al.*, *J. Nucl. Med.* **2021**, 62, 201–207.
- [96] T. Liu, C. Liu, *et al.*, *J. Nucl. Med.* **2019**, 60, 1284–1292.
- [97] Y. Miki, J. Swensen, *et al.*, *Science* **1994**, 266, 66–71.
- [98] W. Cheng, Z. Wu, *et al.*, *PLoS ONE* **2014**, 9, e100521.
- [99] Y. Zhou, S. Gao, *et al.*, *Sci. Rep.* **2017**, 7, 2877.
- [100] X. Luan, Y. Huang, *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2016**, 43, 2336–2342.
- [101] W. Wan, N. Guo, *et al.*, *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2013**, 54, 691–698.
- [102] H. Zhang, N. Liu, *et al.*, *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2016**, 57, 524–529.
- [103] J. Giglio, M. Zeni, *et al.*, *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2018**, 3, 4.
- [104] S. Boschi, J. T. Lee, *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2016**, 43, 2122–2130.
- [105] N. Malik, B. Baur, *et al.*, *Mol. Imaging Biol.* **2015**, 17, 777–785.
- [106] Q. Chen, X. Meng, *et al.*, *Mol. Pharm.* **2016**, 13, 1520–1527.
- [107] J. Guo, L. Lang, *et al.*, *Mol. Imaging Biol.* **2014**, 16, 274–283.
- [108] S. Liu, H. Liu, *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, 38, 1732.
- [109] T. Tshibangu, C. Cawthorne, *et al.*, *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2020**, 5, 4.
- [110] I. Dijkgraaf, S. Y. A. Terry, *et al.*, *Contrast Media Mol. Imaging* **2013**, 8, 238–245.
- [111] M. Kameswaran, U. Pandey, *et al.*, *Appl. Radiat. Isot.* **2016**, 114, 196–201.
- [112] U. Pandey, N. Gamre, S. P. Lohar, A. Dash, *Appl. Radiat. Isot.* **2017**, 127, 1–6.
- [113] B. Mitran, S. S. Rinne, *et al.*, *Int. J. Cancer* **2019**, 145, 3347–3358.
- [114] Z. Novy, A. Laznickova, *et al.*, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2014**, 57, 448–452.
- [115] H.C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2004–2021.
- [116] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Tech. Third Ed.*, Academic Press, Boston, **2013**, 229–258.
- [117] R. Fay, J. P. Holland, *J. Nucl. Med.* **2019**, 60, 587–591.
- [118] C. Collet, F. Maskali, *et al.*, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2016**, 59, 54–62.
- [119] F. Mangin, C. Collet, *et al.*, *RSC Adv.* **2021**, 11, 7672–7681.
- [120] K. Kettenbach, L. M. Reffert, *et al.*, *Pharmaceuticals* **2018**, 11, 30.
- [121] B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 4895–4950.
- [122] R. Selvaraj, S. Liu, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 5011–5014.
- [123] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. A. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, 2, 2141–2143.
- [124] M. Pretze, F. Wuest, *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 6410–6414.
- [125] B. E. Uno, K. K. Deibler, *et al.*, *Adv. Synth. Catal.* **2018**, 360, 1719–1725.
- [126] D. O. Kiesewetter, N. Guo, *et al.*, *Theranostics* **2012**, 2, 999–1009.
- [127] X. Pan, Q. Xu, *et al.*, *Mol. Med. Rep.* **2019**, 20, 2276–2284.
- [128] J. M. J. M. Ravasco, H. Faustino, *et al.*, *Chem. – Eur. J.* **2019**, 25, 43–59.
- [129] W. D. Erwin, B. Esmaeli, *Nucl. Med. Commun.* **2009**, 30, 681–686.
- [130] K. G. Rothberg, Y. S. Ying, *et al.*, *J. Cell Biol.* **1990**, 110, 637–649.
- [131] J. F. Ross, P. K. Chaudhuri, M. Ratnam, *Cancer* **1994**, 73, 2432–2443.
- [132] C. Chen, J. Ke, *et al.*, *Nature* **2013**, 500, 486–489.
- [133] Endocyte, *A Single-Center Phase I Clinical Study to Evaluate The Biodistribution and Safety of 99mTc-Etarfolatide (EC20) in Normal Volunteers*, Clinicaltrials.Gov, **2014**.
- [134] N. Schaefer, *Biodistribution, Tumor Detection, and Radiation Dosimetry of [18F]-AZAFOL as positron emission tomography (PET) Tracer in Folate Receptor Positive Cancer Imaging*, Clinicaltrials.Gov, **2020**.
- [135] Q. Chen, X. Meng, *et al.*, *Mol. Pharm.* **2017**, 14, 4353–4361.
- [136] C. Müller, H. Struthers, *et al.*, *J. Nucl. Med.* **2013**, 54, 124–131.
- [137] P. Shahrokhi, A. Masteri Farahani, *et al.*, *Chem. Biol. Drug Des.* **2022**, 99, 136–161.
- [138] J. R. Nedrow-Byers, M. Jabbes, *et al.*, *The Prostate* **2012**, 72, 904–912.
- [139] P. Majer, P. F. Jackson, *et al.*, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 1989–1996.
- [140] A. P. Kozikowski, J. Zhang, *et al.*, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1729–1738.
- [141] A. P. Kozikowski, F. Nan, *et al.*, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 298–301.
- [142] S. S. Taneja, *Rev. Urol.* **2004**, 6 Suppl 10, S19–28.
- [143] F. L. Giesel, B. Hadaschik, *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2017**, 44, 678–688.
- [144] A. Afshar-Oromieh, H. Hetzheim, *et al.*, *J. Nucl. Med.* **2015**, 56, 1697–1705.
- [145] Curium US LLC, *A Multi-Center, Open-Label, Randomized Phase 3 Trial Comparing the Safety and Efficacy of 177Lu-PSMA-I&T Versus Hormone Therapy in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer*, Clinicaltrials.Gov, **2022**.

- [146] Excel Diagnostics and Nuclear Oncology Center, *PSMA-Directed Targeted Alpha Therapy With 225Ac-PSMA-I&T of Castration-Resistant Prostate Cancer (TATCIST). A Phase II Clinical Trial.*, Clinicaltrials.Gov, **2022**.
- [147] Weill Medical College of Cornell University, *Phase I/II 225Ac-J591 Plus 177Lu-PSMA-I&T for Progressive Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer*, Clinicaltrials.Gov, **2022**.
- [148] Y. A. Kadry, D. A. Calderwood, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2020**, 1862, 183206.
- [149] Z. Liu, F. Wang, X. Chen, *Drug Dev. Res.* **2008**, 69, 329–339.
- [150] Y. Odia, J. H. Shih, *et al.*, *J. Neurooncol.* **2014**, 120, 431–440.
- [151] D. A. Reardon, K. L. Fink, *et al.*, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2008**, 26, 5610–5617.
- [152] I. Dijkgraaf, O. C. Boerman, *Cancer Biother. Radiopharm.* **2009**, 24, 637–647.
- [153] S. S. Gambhir, *Phase 1-2 18F-FPPRGD2 PET/CT or PET/MRI Imaging of Avβ3 Integrins Expression as a Biomarker of Angiogenesis*, Clinicaltrials.Gov, **2019**.
- [154] J. Wu, *18F-Alfatide II PET/CT in the Diagnosis and Treatment Response Evaluation of Breast Cancer Patients*, Clinicaltrials.Gov, **2019**.
- [155] Siemens Molecular Imaging, *A Phase II, Open Label, Non-Randomized, Multi-Center, Pilot, Efficacy Study of [F-18]RGD-K5 Positron Emission Tomography (PET) as a Tool to Monitor Response to an Anti-Angiogenic Drug*, Clinicaltrials.Gov, **2012**.
- [156] RDO Pharm., *An Evaluation of the Efficacy and Safety of Technetium [99mTc] Hydrazinonicotinamide PEGylated Bicyclic RGD Peptide Injection in a Multicenter, Open, Self-Controlled Clinical Trial for the Lymph Node Metastasis in Lung Tumors*, Clinicaltrials.Gov, **2022**.
- [157] Z. Liu, J. Shi, *et al.*, *Mol. Pharm.* **2011**, 8, 591–599.
- [158] U. Wiesing, *Med. Health Care Philos.* **2019**, 22, 593–597.
- [159] S. S. Kelkar, T. M. Reineke, *Bioconjug. Chem.* **2011**, 22, 1879–1903.
- [160] J. R. Ballinger, *Br. J. Radiol.* **2018**, 91, 20170969.
- [161] N. Drude, L. Tienken, F. M. Mottaghy, *Methods San Diego Calif* **2017**, 130, 14–22.
- [162] M. S. Hofman, W. F. E. Lau, R. J. Hicks, *RadioGraphics* **2015**, 35, 500–516.
- [163] Australian and New Zealand Urogenital and Prostate Cancer Trials Group, *TheraP: A Randomised Phase 2 Trial of 177Lu-PSMA617 Theranostic Versus Cabazitaxel in Progressive Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer (ANZUP Protocol 1603)*, Clinicaltrials.Gov, **2022**.
- [164] K. Herrmann, M. Schwaiger, *et al.*, *Lancet Oncol.* **2020**, 21, e146–e156.
- [165] C. A. Umbricht, M. Benešová, *et al.*, *EJNMMI Res.* **2017**, 7, 9.
- [166] L. Greifenstein, N. Engelbogen, *et al.*, *ChemMedChem* **2020**, 15, 695–704.
- [167] O. Keinänen, K. Fung, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2020**, 117, 28316–28327.
- [168] J. M. Kelly, S. Ponnala, *et al.*, *Mol. Pharm.* **2020**, 17, 1954–1962.
- [169] J. Grünberg, I. Novak-Hofer, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* **2005**, 11, 5112–5120.
- [170] C. Müller, M. Bunka, *et al.*, *J. Nucl. Med.* **2014**, 55, 1658–1664.
- [171] N. Bandara, T. J. Stott Reynolds, *et al.*, *Nucl. Med. Biol.* **2018**, 62–63, 71–77.
- [172] C. A. Ferreira, E. B. Ehlerding, *et al.*, D. Ni, W. Cai, *Mol. Pharm.* **2020**, 17, 1697–1705.
- [173] E. Lopci, A. Chiti, *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, 38, 28.
- [174] H. Chen, O. Jacobson, *et al.*, *J. Nucl. Med.* **2017**, 58, 590–597.
- [175] L. Rbah-Vidal, A. Vidal, *et al.*, *Neoplasia* **2017**, 19, 17–27.
- [176] C. R. Dias, S. Jeger, *et al.*, *Nucl. Med. Biol.* **2011**, 38, 19–28.
- [177] V. Rosecker, C. Denk, *et al.*, *Chembiochem* **2019**, 20, 1530–1535.
- [178] M. L. Lepage, H.-T. Kuo, *et al.*, *ChemBioChem* **2020**, 21, 943–947.
- [179] S. Ahenkorah, E. Murce, *et al.*, *Theranostics* **2022**, 12, 5971–5985.
- [180] H.-S. Chong, X. Sun, P. Dong, C. S. Kang, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2011, 6641–6648.
- [181] H.-S. Chong, H. A. Song, *et al.*, *Bioconjug. Chem.* **2008**, 19, 1439–1447.
- [182] C. S. Kang, H. A. Song, *et al.*, *Nucl. Med. Biol.* **2013**, 40, 600–605.
- [183] C. S. Kang, X. Sun, *et al.*, *Bioconjug. Chem.* **2012**, 23, 1775–1782.
- [184] H. Chong, K. Garmestani, *et al.*, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 3458–3464.
- [185] C. S. Kang, Y. Chen, *et al.*, *Nucl. Med. Biol.* **2015**, 42, 242–249.
- [186] M. Dadwal, C. S. Kang, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 7513–7515.
- [187] H. A. Song, C. S. Kang, *et al.*, *Bioconjug. Chem.* **2011**, 22, 1128–1135.
- [188] P. Le Grel, A. Salaün, *et al.*, *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 8756–8767.
- [189] “Hydrazine Building Blocks - Enamine,” can be found under <https://enamine.net/research/product-focus/131-hydrazine-building-blocks>, (accessed 25/07/2022)
- [190] S. H. L. Verhelst, M. D. Witte, *et al.*, *ChemBioChem* **2006**, 7, 943–950.

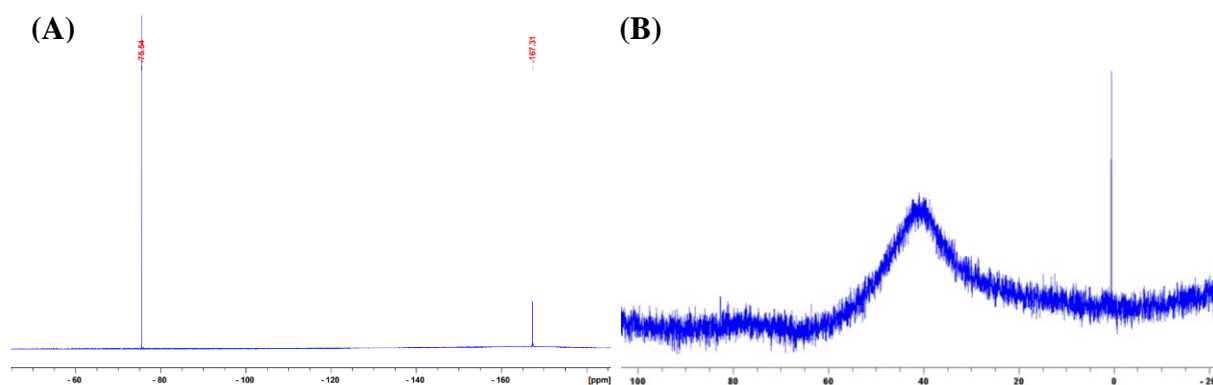
- [191] C. B. Bourguet, P.-L. Boulay, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 3361–3365.
- [192] S. A. Khan, S. Shahid, *et al.*, *J. Mol. Struct.* **2019**, *1175*, 73–89.
- [193] V. Surzhko, T. Roisnel, *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 1343–1347.
- [194] K. Fuchs, C. Dorner-Ciossek, *et al.*, *Pyrazolopyrimidines Et Leur Utilisation Pour Le Traitement De Troubles Du Snc*, **2010**, WO2010026214A1.
- [195] C. E. Cannizzaro, Z.-Y. Yang, *et al.*, *Inhibiteurs De Protéase Antiviraux*, **2008**, WO2008011117A2.
- [196] A. Bredihhin, U. Mäeorg, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 6788–6793.
- [197] A. Cheguillaume, F. Lehardy, *et al.*, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2924–2927.
- [198] A. Cheguillaume, I. Doubli-Bounoua, *et al.*, *Synlett* **2000**, 331–334.
- [199] R. Hoffman, H. Kim, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 2953–2956.
- [200] S. Acherar, B. Jamart-Grégoire, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 6377–6379.
- [201] R.-O. Moussodia, S. Acherar, *et al.*, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 4682–4692.
- [202] N. Brosse, M.-F. Pinto, B. Jamart-Grégoire, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4370–4374.
- [203] E. Romero, R.-O. Moussodia, *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *2018*, 4754–4761.
- [204] A. Benmohammed, O. Koumeri, *et al.*, *Molecules* **2014**, *19*, 3068–3083.
- [205] D. Boeglin, W. D. Lubell, *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 864–878.
- [206] R.-O. Moussodia, Synthèse et Études Conformationnelles de 1:1-[Alpha-Alpha-Nalpha-Bn Hydrazino]Mères Linéaires et Cycliques, These de doctorat, Université de Lorraine, **2012**.
- [207] S. A. Thomson, J. A. Josey, *et al.*, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6179–6194.
- [208] S. H. Bouayad-Gervais, W. D. Lubell, *Molecules* **2013**, *18*, 14739–14746.
- [209] J. Spiegel, C. Mas-Moruno, *et al.*, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 5271–5278.
- [210] Y. Yamamoto, T. Shirai, N. Miyaoura, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2803–2805.
- [211] K. Long, T. A. Edwards, A. J. Wilson, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4034–4040.
- [212] Y. Li, C. Barløse, *et al.*, *Chem. – Eur. J.* **2017**, *23*, 38–41.
- [213] F. della Sala, E. R. Kay, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4187–4191.
- [214] S. Sato, T. Sakamoto, *et al.*, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7899–7906.
- [215] A. Rahim, B. Sahariah, B. K. Sarma, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 5743–5746.
- [216] Y. Huang, Y. Liu, *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *2018*, 1546–1551.
- [217] J. Song, X. Peng, *et al.*, *ACS Omega* **2018**, *3*, 13089–13096.
- [218] Z. Baranyai, F. Uggeri, *et al.*, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, *2013*, 147–162.
- [219] A.-S. Felten, N. Pellegrini-Moïse, *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 5645–5654.
- [220] M. de Guadalupe Jaraquemada-Pelaez, C. Pena-Bonhome, *et al.*, *Nucl. Med. Biol.* **2022**, *108–109*, S149.
- [221] M. I. Tsionou, C. E. Knapp, *et al.*, *RSC Adv.* **2017**, *7*, 49586–49599.
- [222] C. Chollet, R. Bergmann, *et al.*, *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 771–784.
- [223] A. Moussaron, V. Jouan-Hureau, *et al.*, *Mol. Basel Switz.* **2021**, *26*, 7273.
- [224] R. Zhao, K. Ploessl, *et al.*, *Mol. Pharm.* **2020**, *17*, 4589–4602.
- [225] M. Weineisen, J. Simecek, *et al.*, *EJNMMI Res.* **2014**, *4*, 63.
- [226] E. Ruivo, K. Adhikari, *et al.*, *Nucl. Med. Biol.* **2019**, *76–77*, 36–42.
- [227] D. Coates, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2003**, *35*, 769–773.
- [228] I. Bertini, V. Calderone, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7952–7955.
- [229] L. Cerofolini, M. Fragai, C. Luchinat, *Curr. Med. Chem.* **2019**, *26*, 2609–2633.
- [230] D. Kang, U. Simon, *et al.*, *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 818.
- [231] P. Laverman, C. A. D’Souza, *et al.*, *Tumor Biol.* **2012**, *33*, 427–434.
- [232] J. W. Akitt, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1989**, *21*, 1–149.
- [233] M. Haouas, F. Taulelle, C. Martineau, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2016**, *94–95*, 11–36.
- [234] A. de Sá, M. I. M. Prata, *et al.*, *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104*, 1051–1062.
- [235] S. Wang, Y. Gai, *et al.*, *J. Inorg. Biochem.* **2022**, *229*, 111719.
- [236] S. Wang, Y. Gai, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2022**, *60*, 116687.
- [237] C. Guilbaud-Chéreau, B. Dinesh, *et al.*, *Nanomaterials* **2022**, *12*, 1643.
- [238] C. Sparr, N. Purkayastha, *et al.*, *Chem. Biodivers.* **2013**, *10*, 2101–2121.
- [239] M. Klingler, D. Summer, *et al.*, *J. Nucl. Med.* **2019**, *60*, 1010–1016.
- [240] M. Salvé, H. T. Avohou, *et al.*, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2018**, *61*, 487–500.
- [241] N. Doti, M. Mardirossian, *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, *22*, 8677.
- [242] C. E. Dumelin, S. Trüssel, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3196–3201.
- [243] R. Haubner, B. Kuhnast, *et al.*, *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 61–69.
- [244] N. Abbasi Gharibkandi, J. M. Conlon, S. J. Hosseinimehr, *Peptides* **2020**, *133*, 170385.

- [245] X. Chen, R. Park, *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2004**, *31*, 1081–1089.
- [246] S. H. Hausner, N. Bauer, *et al.*, *Mol. Imaging Biol.* **2020**, *22*, 1543–1552.
- [247] H. Azaïs, A. Moussaron, *et al.*, *Bull. Cancer (Paris)* **2014**, *101*, 1109–1113.
- [248] A. Stallivieri, F. Baros, *et al.*, *Curr. Med. Chem.*, **2015**, *22*, 3185–3207.
- [249] H. Azaïs, C. Rebahi, *et al.*, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2020**, *30*, 101683.
- [250] A. M. Gazzali, M. Lobry, *et al.*, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *93*, 419–430.
- [251] L. Wagner, B. Kenzhebayeva, *et al.*, *Coord. Chem. Rev.* **2022**, *470*, 214702.
- [252] H. Azaïs, G. Queniat, *et al.*, *Int. J. Gynecol. Cancer* **2015**, *25*, 1194–1200.
- [253] M. Baydoun, O. Moralès, *et al.*, *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 1185.
- [254] J. K. Amartei, *Nucl. Med. Biol.* **1993**, *20*, 539–543.
- [255] K. J. H. Allen, R. Jiao, *et al.*, *Cancer Biother. Radiopharm.* **2018**, *33*, 349–355.
- [256] A. Irvani, J. Violet, *et al.*, *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2020**, *23*, 38–52.
- [257] German Cancer Research Center, *An Open-Label, Single-Arm, Rater-Blinded, Multicenter Phase 1/2 Study to Assess Safety and Diagnostic Accuracy and Radiotherapeutic Implications of Pre-Operative Ga-68-PSMA-11 PET/CT Imaging in Comparison to Histopathology, in Newly-Diagnosed Prostate Cancer (PCA) Patients at High Risk for Metastasis, Scheduled for Radical Prostatectomy (RP) With Extended Pelvic Lymph Node Dissection (EPLND)*, Clinicaltrials.Gov, **2020**.
- [258] C. Collet, T. Vucko, *et al.*, *React. Chem. Eng.* **2019**, *4*, 2088–2098.
- [259] S. Dall’Angelo, Q. Zhang, *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 4551–4558.
- [260] C. Müller, A. Hohn, *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2006**, *33*, 1007–1016.
- [261] C. P. Leamon, R. B. Deprince, R. W. Hendren, *J. Drug Target.* **1999**, *7*, 157–169.
- [262] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [263] B. Merrifield, *Biosci. Rep.* **1985**, *5*, 353–376.
- [264] F. Albericio, R. Subiros-Funosas, *Encycl. Reag. Org. Synth.*, John Wiley & Sons, **2012**.
- [265] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788–798.
- [266] S. R. Banerjee, C. A. Foss, *et al.*, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4504–4517.
- [267] A. P. Kozikowski, J. Zhang, *et al.*, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1729–1738.
- [268] R. P. Bandari, Z. Jiang, *et al.*, *Nucl. Med. Biol.* **2014**, *41*, 355–363.
- [269] A. M. Jordan, T. H. Khan, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2625–2633.
- [270] L. Zhang, K. Tian, *et al.*, *Acta Pharm. Sin. B* **2012**, *2*, 588–597.
- [271] A. Boeijen, J. van Ameijde, R. M. J. Liskamp, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8454–8462.
- [272] P. Cudic, M. Stawikowski, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2008**, *494*, 223–246.
- [273] F. Bizet, N. Tonali, *et al.*, *New J. Chem.* **2018**, *42*, 17062–17072.
- [274] C. F. McCusker, P. J. Kocienski, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 547–549.
- [275] L. V. Parfenova, E. S. Lukina, *et al.*, *Molecules* **2020**, *25*, 229.
- [276] M. Lahnsteiner, A. Kastner, *et al.*, *Chemistry*, **2020**, *26*, 15867–15870.
- [277] J. Ariztia, K. Jouad, *et al.*, *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 1490.
- [278] L. Allott, C. D. Pieve, *et al.*, *React. Chem. Eng.* **2017**, *2*, 68–74.
- [279] K. Kersemans, K. De Man, *et al.*, *Appl. Radiat. Isot.* **2018**, *135*, 19–27.
- [280] X. Jiang, X. Wang, *et al.*, *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 649148.
- [281] K. Hu, J. Li, *et al.*, *Acta Pharm. Sin. B* **2022**, *12*, 867–875.
- [282] S. Naka, T. Watabe, *et al.*, *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2021**, *6*, 28.
- [283] G. A. Lewis, D. Mathieu, R. Phan-Tan-Luu, *Pharmaceutical Experimental Design*, CRC Press, **1998**.
- [284] G. D. Bowden, B. J. Pichler, A. Maurer, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 11370.
- [285] G. D. Bowden, N. Chailanggar, *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 6995–7000.
- [286] G. D. Bowden, S. Stotz, *et al.*, *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 15690–15701.
- [287] K. J. Makaravage, A. F. Brooks, *et al.*, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 5440–5443.
- [288] E. Al-Momani, I. Israel, S. Samnick, *Appl. Radiat. Isot.* **2017**, *130*, 102–108.
- [289] S. Lütje, G. M. Franssen, *et al.*, *J. Nucl. Med.* **2019**, *60*, 1017–1022.
- [290] P. Laverman, W. J. McBride, *et al.*, *J. Nucl. Med.* **2010**, *51*, 454–461.
- [291] C. Collet, M. Otabashi, *et al.*, *Appl. Radiat. Isot.* **2015**, *102*, 87–92.
- [292] “easyQBD,” can be found under <https://www.easyqbd.eu/>, (accessed 05/02/2023)
- [293] K. Eryilmaz, B. Kilbas, *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2021**, *6*, 16.
- [294] L. Xing, Y. Xu, *et al.*, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–13.
- [295] M. D. Hanwell, D. E. Curtis, D. C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, G. R. Hutchison, *J. Cheminformatics* **2012**, *4*, 17.

- [296] T. A. Team, “Avogadro - Free cross-platform molecular editor,” can be found under <https://avogadro.cc/>, (accessed 14/08/2020)
- [297] M. J. Frisch, G. W. Trucks, *et al.*, *Gaussian, Inc.*, Wallingford, CT, **2016**

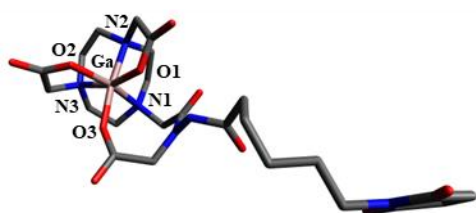
ANNEXES

Annexe 1 : (A) Spectre RMN ^{19}F de $\text{Al}^{\text{nat}}\text{F-NO}_2\text{A-AHM}$ dans le D_2O à 283 K (376,5 MHz) (le pic à -75,54 ppm correspond au TFA), (A) spectre RMN ^{27}Al de $\text{Al}^{\text{nat}}\text{F-NO}_2\text{A-AHM}$ dans le D_2O à 283 K (104,26 MHz) (*: H_2O présent dans le D_2O)

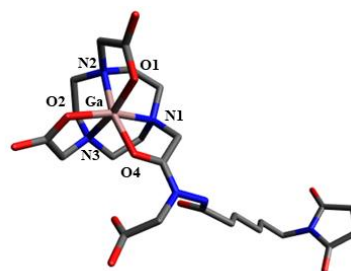


Annexe 2 : Longueurs de liaisons et angles de liaisons de coordination des complexes Hexa_Ga_bras et Hexa_Ga_O=C

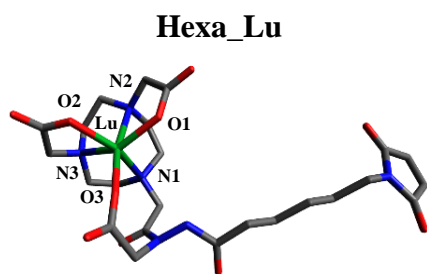
Hexa_Ga_O=C



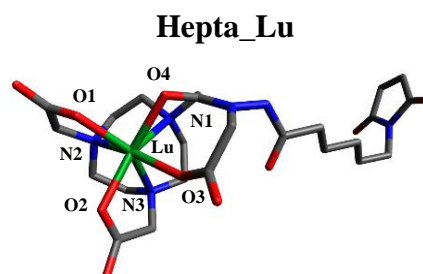
Hexa_Ga_bras



Hexa_Ga_bras				Hexa_Ga_O=C			
Longueur de liaisons (Å)		Angle de liaisons de coordination (deg)		Longueur de liaisons (Å)		Angle de liaisons de coordination (deg)	
Ga-N1	2,15117	N1-Ga-O1	159,20532	Ga-N1	2,1099	N1-Ga-O1	97,54298
Ga-N2	2,19832	N1-Ga-N2	78,9345	Ga-N2	2,08608	N1-Ga-N2	85,28923
Ga-N3	2,08258	N1-Ga-N3	86,46087	Ga-N3	2,09557	N1-Ga-N3	84,19292
Ga-O1	1,94957	N1-Ga-O3	88,73847	Ga-O1	1,93147	N1-Ga-O3	81,47344
Ga-O2	1,94573	N1-Ga-O2	111,00384	Ga-O2	1,92176	N1-Ga-O2	166,04655
Ga-O3	1,91072	O1-Ga-O2	89,62361	Ga-O4	1,97827	O1-Ga-O2	95,80882
		O1-Ga-O3	92,46705			O1-Ga-O3	92,56105
		O1-Ga-N2	80,43096			O1-Ga-N2	83,55830
		O1-Ga-N3	93,92856			O1-Ga-N3	168,87347
		O2-Ga-O4	94,1684			O2-Ga-O3	93,91871
		O2-Ga-N2	162,65281			O2-Ga-N2	100,2539
		O2-Ga-N3	82,56725			O2-Ga-N3	83,48296
		O3-Ga-N2	100,38636			O4-Ga-N2	165,60338
		O3-Ga-N3	172,79471			O4-Ga-N3	98,56547
		N2-Ga-N3	83,96654			N2-Ga-N3	85,63997

Annexe 3 : Longueurs de liaisons et angles de liaisons pour les complexes Hexa_Lu_bras et Hepta_Lu


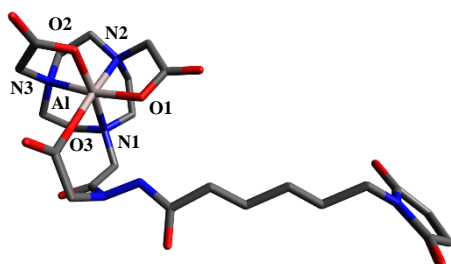
Hexa_Lu_bras			
Longueur de liaisons (Å)		Angle de liaisons de coordination (deg)	
Lu-N1	2,55951	N1-Lu-O1	99,33501
Lu-N2	2,52480	N1-Lu-N2	72,97244
Lu-N3	2,49656	N1-Lu-N3	71,75419
Lu-O1	2,15224	N1-Lu-O3	99,21404
Lu-O2	2,16199	N1-Lu-O2	142,62691
Lu-O3	2,13073	O1-Lu-O2	108,50557
		O1-Lu-O3	103,36858
		O1-Lu-N2	70,53154
		O1-Lu-N3	141,0945
		O2-Lu-O3	98,06437
		O2-Lu-N2	93,04366
		O2-Lu-N3	70,91276
		O3-Lu-N2	168,6278
		O3-Lu-N3	115,34723
		N2-Lu-N3	70,66622



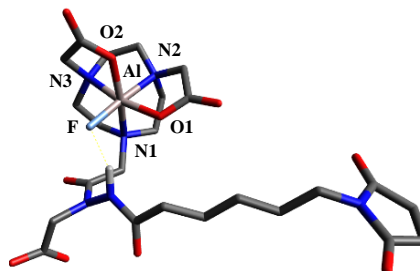
Hepta_Lu			
Longueur de liaisons (Å)		Angle de liaisons de coordination (deg)	
Lu-N1	2,59922	N1-Lu-O1	111,05576
Lu-N2	2,48974	N1-Lu-N2	72,03728
Lu-N3	2,54007	N1-Lu-N3	69,98959
Lu-O1	2,16573	N1-Lu-O3	98,29510
Lu-O2	2,19679	N1-Lu-O2	139,9564
Lu-O3	2,21268	N1-Lu-O4	66,82994
Lu-O4	2,33718	O1-Lu-O2	94,56019
		O1-Lu-O3	130,10469
		O1-Lu-N2	71,06994
		O1-Lu-N3	139,30159
		O1-Lu-O4	81,20188
		O2-Lu-O3	86,78233
		O2-Lu-N2	89,01377
		O2-Lu-N3	70,55122
		O2-Lu-O4	150,38966
		O3-Lu-N2	158,67038
		O3-Lu-N3	87,87930
		O3-Lu-O4	74,35773
		N2-Lu-N3	71,0239
		N2-Lu-O4	116,58706
		O4-Lu-N3	129,74781

Annexe 4 : Longueurs de liaisons et angles de liaisons de coordination des complexes Hexa_Al_bras et Hexa_Al_F

Hexa_Al_bras



Hexa_Al-F

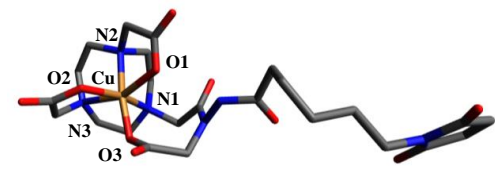


Hexa_Al_bras			
Longueur de liaisons (Å)	Angle de liaisons de coordination (deg)		
Al-N1	2,23017	N1-Al-O1	92,6225
Al-N3	2,06379	N1-Al-N2	82,06798
Al-N2	2,11321	N1-Al-N3	83,81901
Al-O1	1,84628	N1-Al-O3	89,83268
Al-O2	1,87187	N1-Al-O3	166,33093
Al-O3	1,81044	O1-Al-O3	98,81573
		O1-Al-O3	98,39435
		O1-Al-N2	83,71488
		O1-Al-N3	166,92922
		O1-Al-O3	95,83529
		O2-Al-N2	91,72096
		O2-Al-N3	83,37103
		O3-Al-N2	171,73039
		O3-Al-N3	94,17832
		N2-Al-N3	83,3386

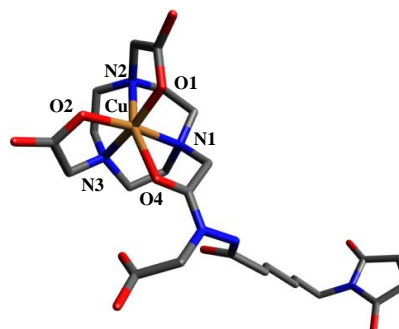
Hexa_Al_F			
Longueur de liaisons (Å)	Angle de liaisons de coordination (deg)		
Al-N1	2,15818	N1-Al-O1	95,10333
Al-N2	2,12566	N1-Al-N2	83,08297
Al-N3	2,09099	N1-Al-N3	83,40338
Al-O1	1,85419	N1-Al-F	90,01285
Al-O2	1,88284	N1-Al-O2	165,45088
Al-F	1,73327	O1-Al-O2	97,53192
		O1-Al-F	98,73043
		O1-Al-N2	82,86079
		O1-Al-N3	165,56184
		O2-Al-F	95,15489
		O2-Al-N2	91,3428
		O2-Al-N3	82,56151
		F-Al-N2	173,03512
		F-Al-N3	95,63395
		N2-Al-N3	82,70323

Annexe 5 : Longueurs de liaisons et angles de liaisons de coordination des complexes Hexa_Cu_bras et Hexa_Cu_O=C

Hexa_Cu_bras



Hexa_Cu_O=C

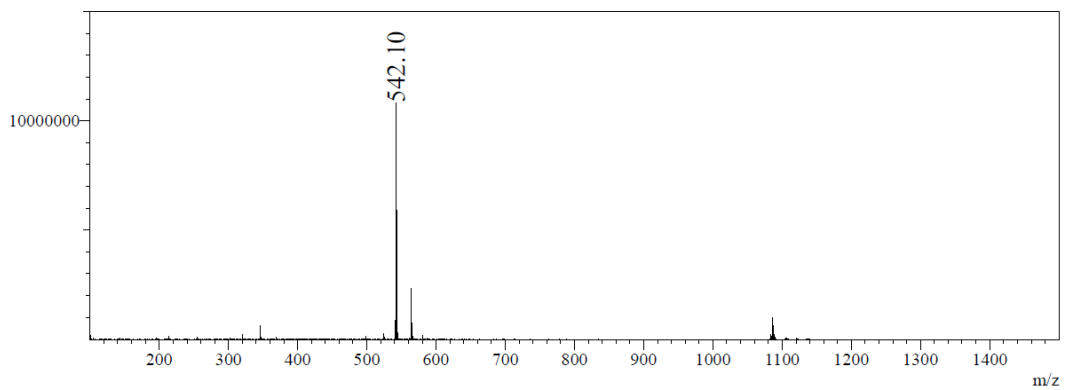
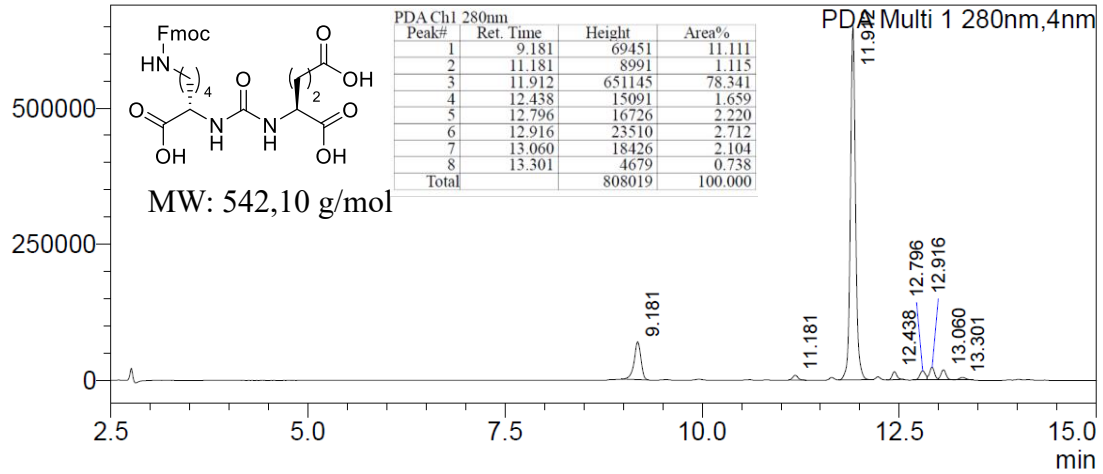


Hexa_Cu_bras			
Longueur de liaisons (Å)	Angle de liaisons de coordination (deg)		
Cu-N1	2,00569	N1-Cu-O1	109,01004
Cu-N2	1,99763	N1-Cu-N1	90,75785
Cu-N3	2,41261	N1-Cu-N2	79,36755
Cu-O1	2,22678	N1-Cu-O3	86,47785
Cu-O2	1,86042	N1-Cu-O2	159,38005
Cu-O3	1,86094	O1-Cu-O2	91,49889
		O1-Cu-O3	92,56105
		O1-Cu-N2	80,13074
		O1-Cu-N3	159,12653
		O2-Cu-O3	94,49653
		O2-Cu-N2	90,69713
		O2-Cu-N3	80,57839
		O3-Cu-N2	172,10058
		O3-Cu-N3	106,01957
		N2-Cu-N3	80,68515

Hexa_Cu_O=C			
Longueur de liaisons (Å)	Angle de liaisons de coordination (deg)		
Cu-N1	2,02741	N1-Cu-O1	93,99452
Cu-N2	2,25842	N1-Cu-N1	83,61306
Cu-N3	1,92181	N1-Cu-N2	87,89520
Cu-O1	1,84613	N1-Cu-O4	80,67034
Cu-O2	1,92181	N1-Cu-O2	172,64722
Cu-O4	2,29922	O1-Cu-O2	92,31121
		O1-Cu-O4	89,66306
		O1-Cu-N2	82,86813
		O1-Cu-N3	171,28211
		O2-Cu-O4	95,60158
		O2-Cu-N2	100,93996
		O2-Cu-N3	86,43358
		O4-Cu-N2	162,07691
		O4-Cu-N3	99,04363
		N2-Cu-N3	88,89467

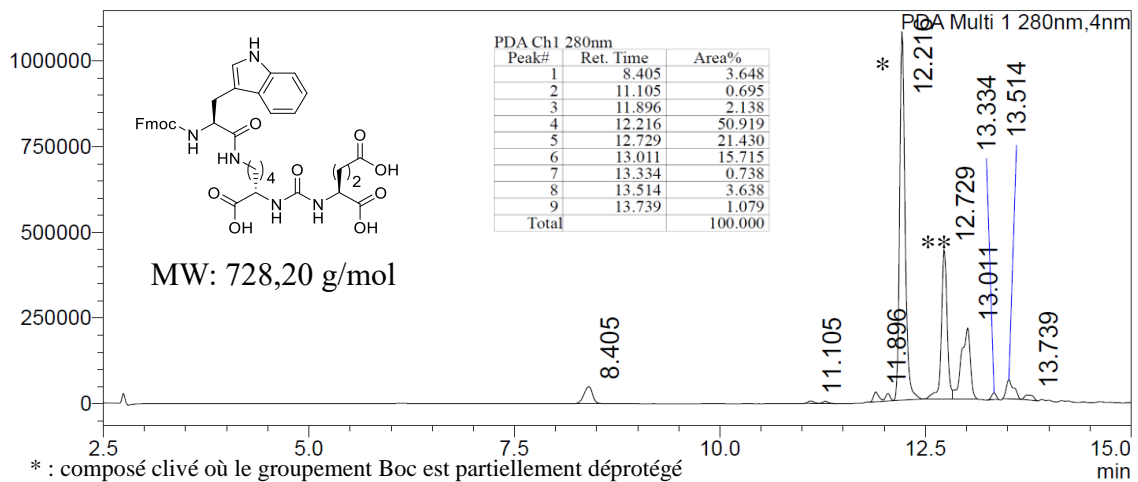
Annexe 6 : Chromatogramme et spectre de masse de Fmoc-KuE obtenues par HPLC-MS (5 – 100% B en 15 min (A : H₂O/CH₃CN 95/5 v/v, 0,1% TFA, B : CH₃CN, 0,1% TFA), 0,8 mL/min, 280 nm)

uAU



Annexe 7 : Chromatogramme et spectre de masse de Fmoc-WKuE obtenues par HPLC-MS (5 – 100% B en 15 min (A : H₂O/CH₃CN 95/5 v/v, 0,1% TFA, B : CH₃CN, 0,1% TFA), 0,8 mL/min, 280 nm)

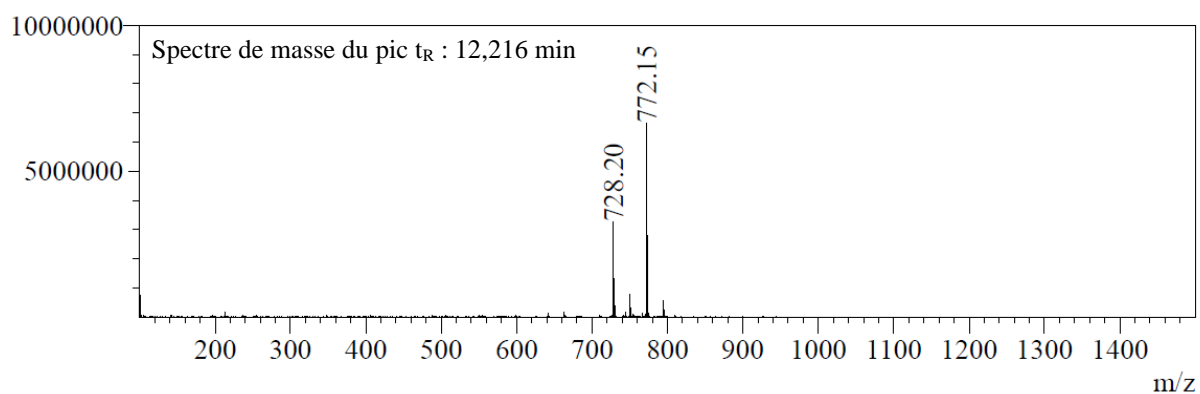
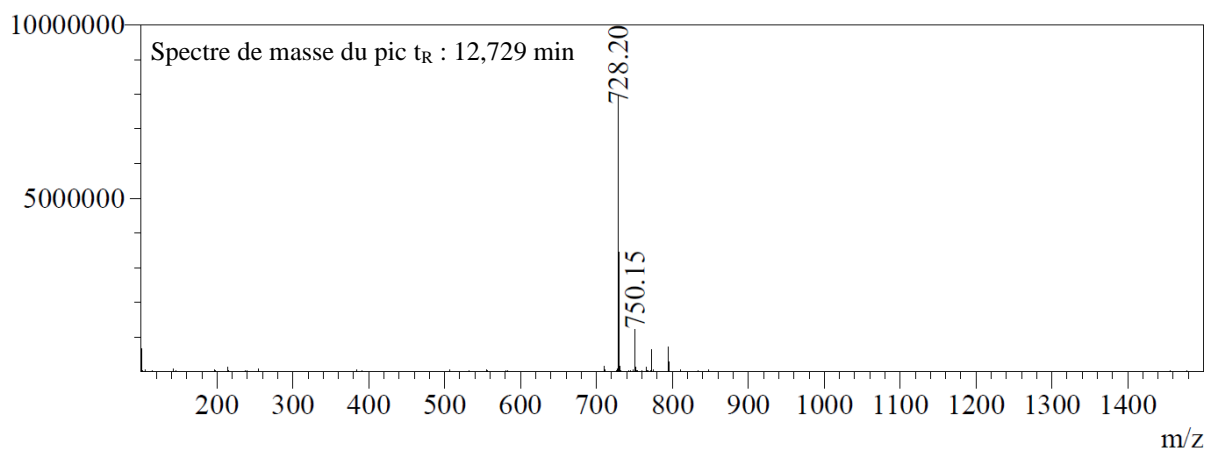
uAU



* : composé clivé où le groupement Boc est partiellement déprotégé

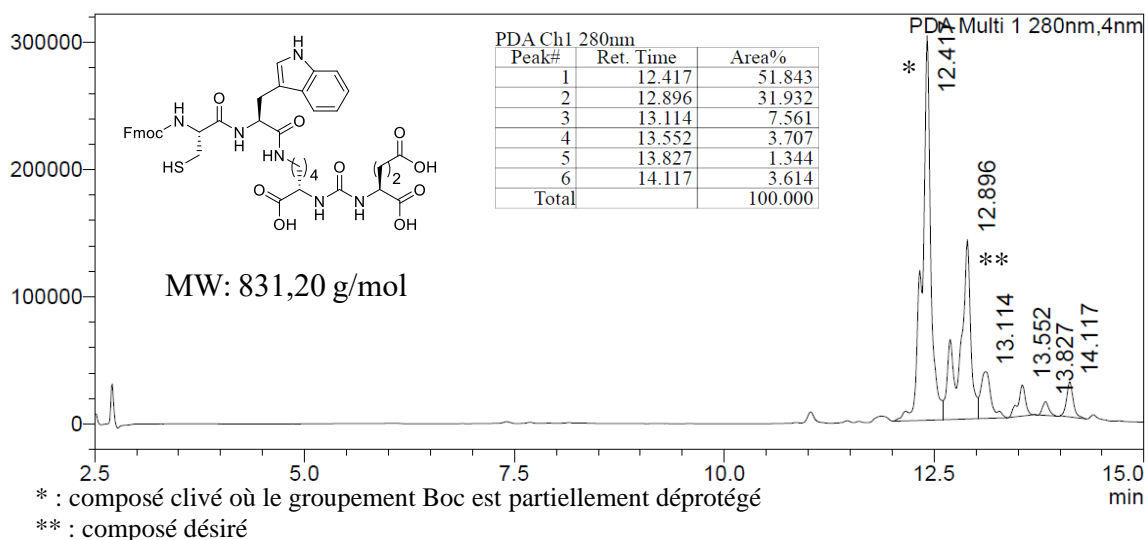
** : composé désiré

Annexe

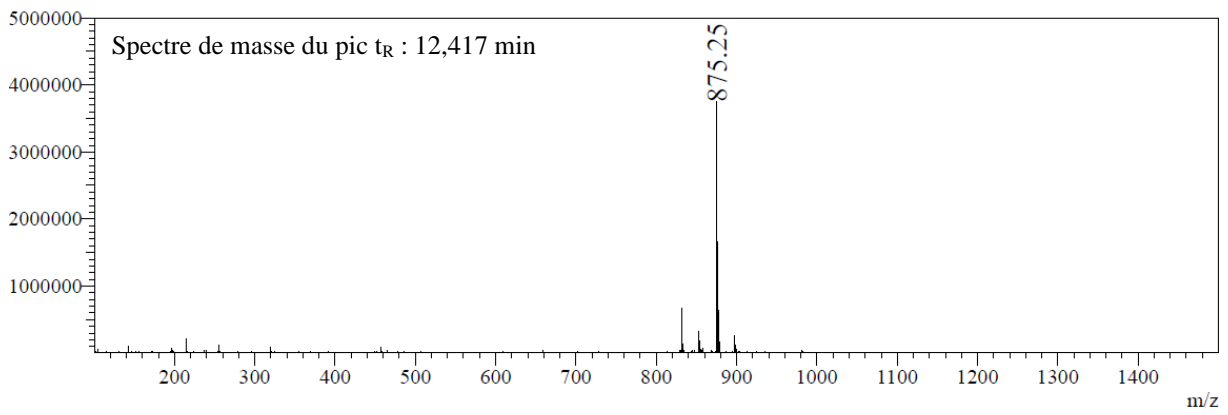
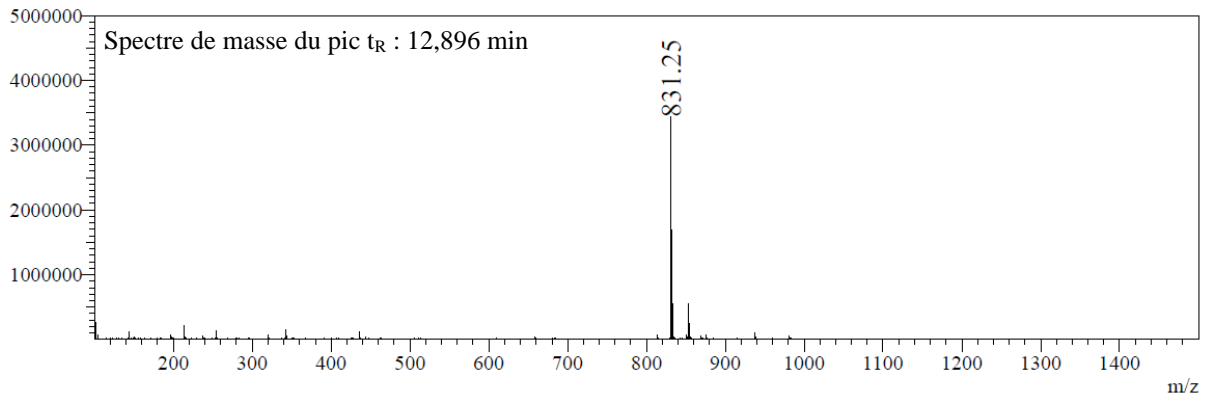


Annexe 8 : Chromatogramme et spectre de masse de Fmoc-CWKuE obtenues par HPLC-MS (5 – 100% B en 15 min (A : H₂O/CH₃CN 95/5 v/v, 0,1% TFA, B : CH₃CN, 0,1% TFA), 0,8 mL/min, 280 nm)

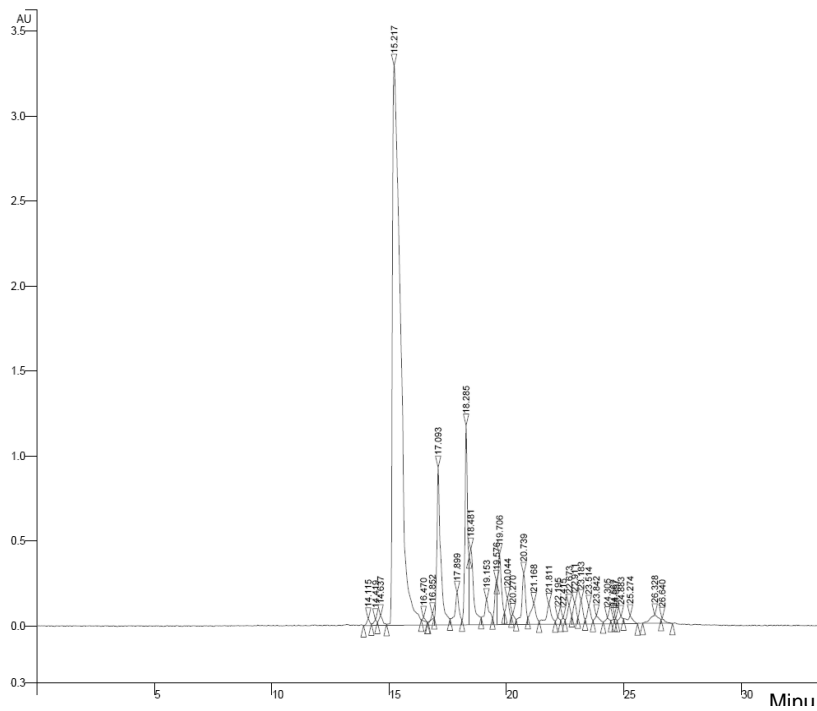
uAU



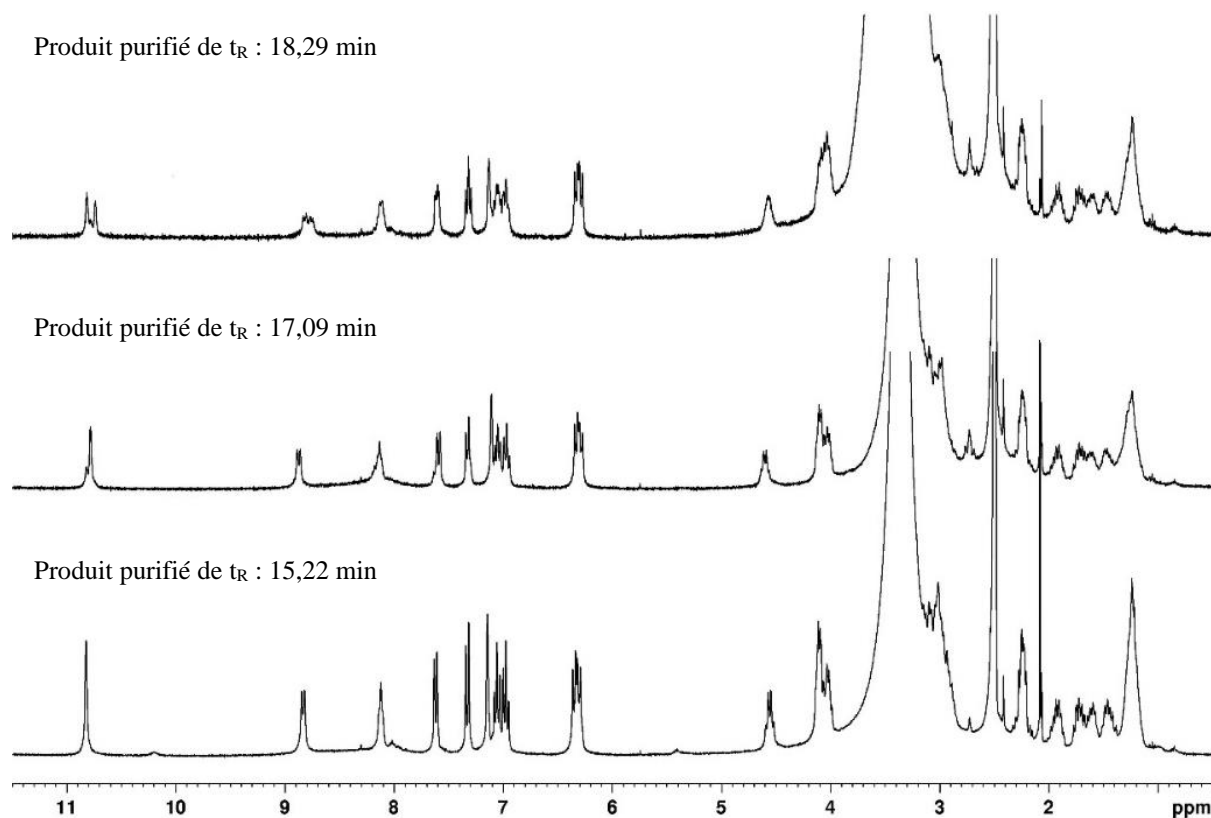
Annexe



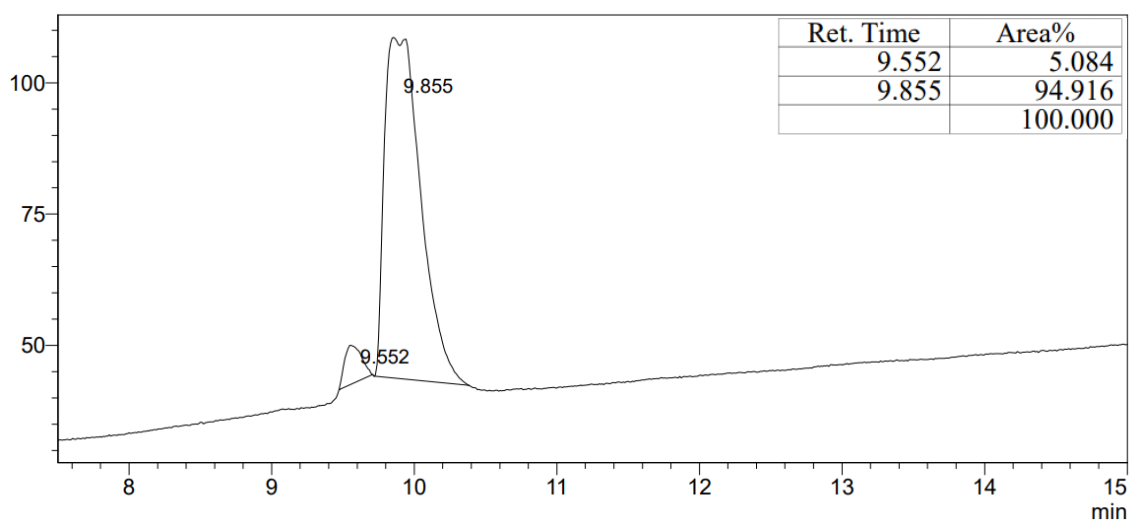
Annexe 9 : Chromatogramme de l'HPLC préparative de la purification de **20** (5 – 40% B en 20 min (A : H₂O/CH₃CN 95/5 v/v, 0,1% TFA, B : CH₃CN, 0,1% TFA), 12 mL/min, 280 nm)



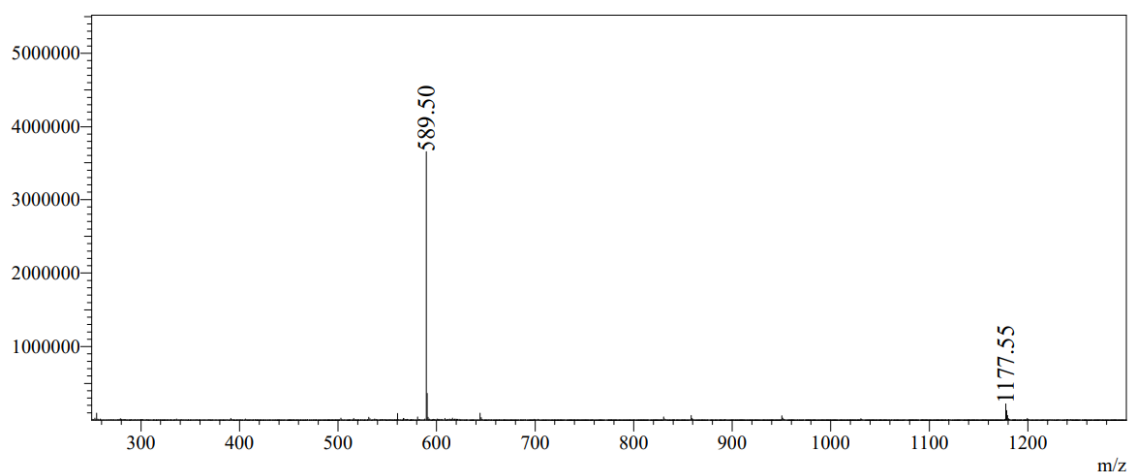
Annexe 10 : Spectres RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz, 300 K) des 3 produits de m/z identique (609,20) isolés par purification par HPLC préparative (composé **20**)



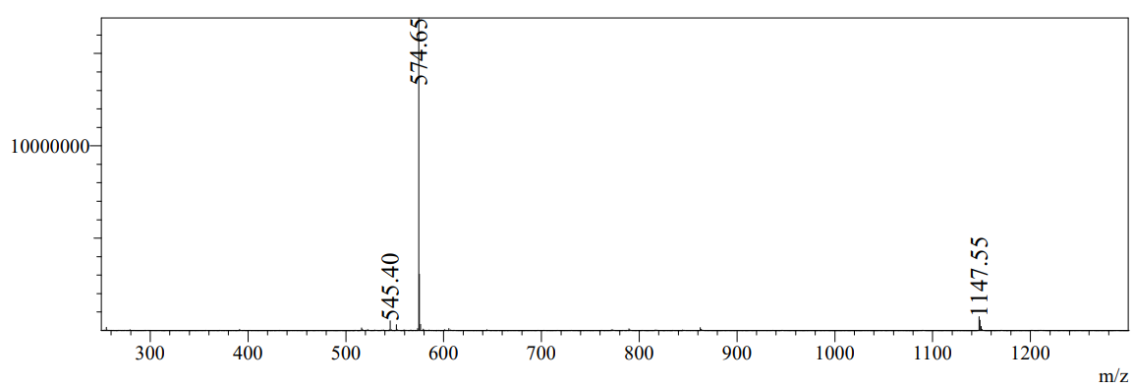
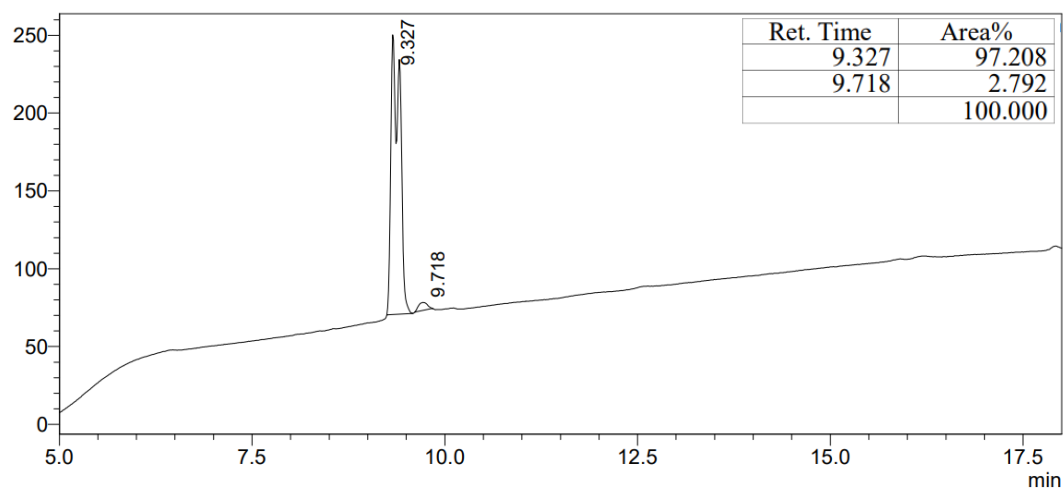
Annexe 11 : Chromatogramme à 214 nm et spectre de masse du composé **27** obtenues par HPLC-MS (5 – 100% B en 15 min (A : $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 95/5 v/v, 0,1% TFA, B : CH_3CN , 0,1% TFA), 0,8 mL/min, 214 nm)



Annexe

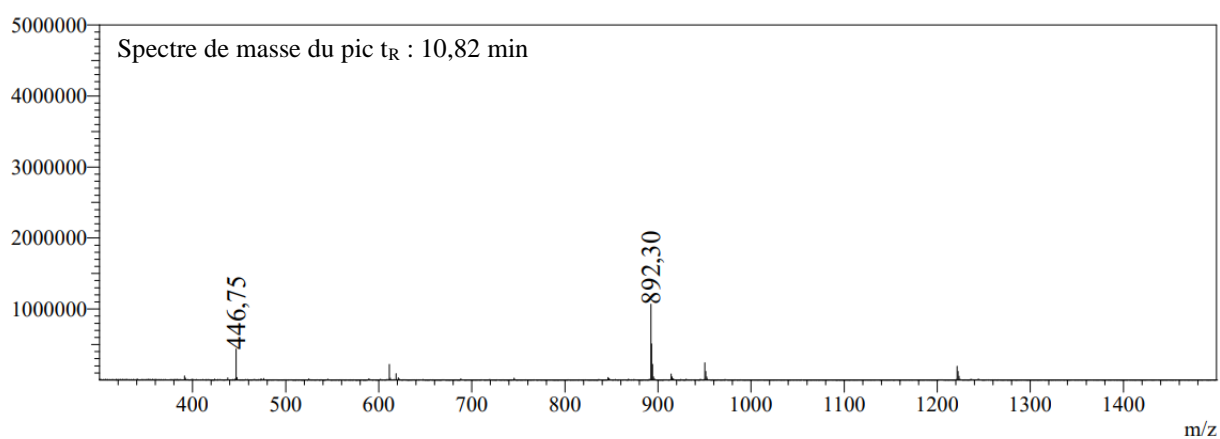
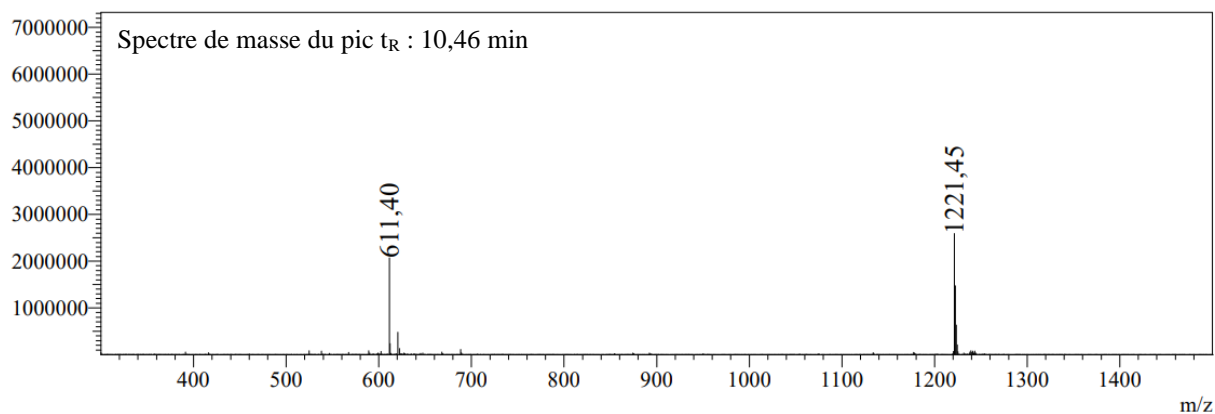
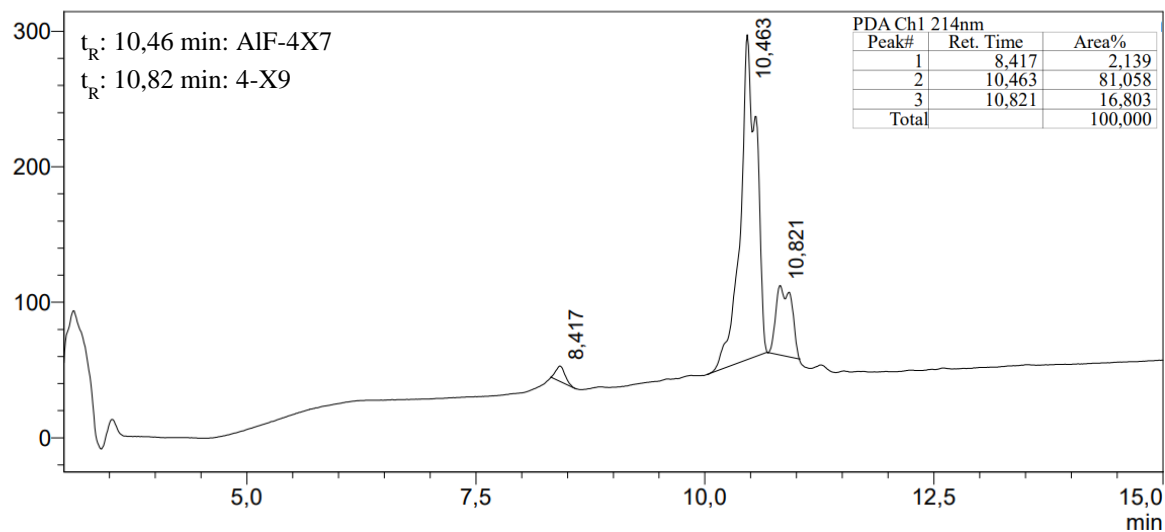


Annexe 12 : Chromatogramme à 214 nm et spectre de masse du composé **28** obtenues par HPLC-MS (5 – 100% B en 15 min (A : H₂O/CH₃CN 95/5 v/v, 0,1% TFA, B : CH₃CN, 0,1% TFA), 0,8 mL/min, 214 nm)



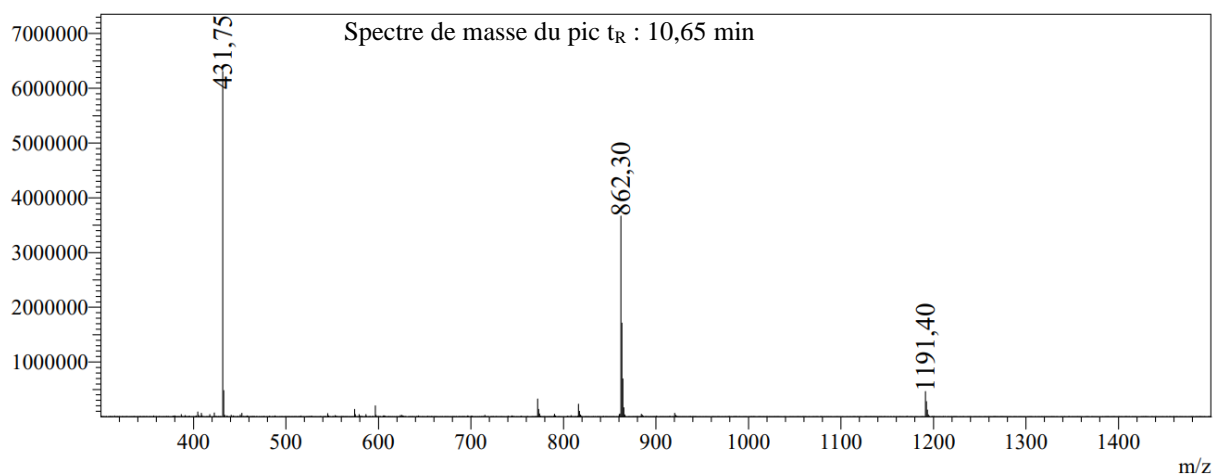
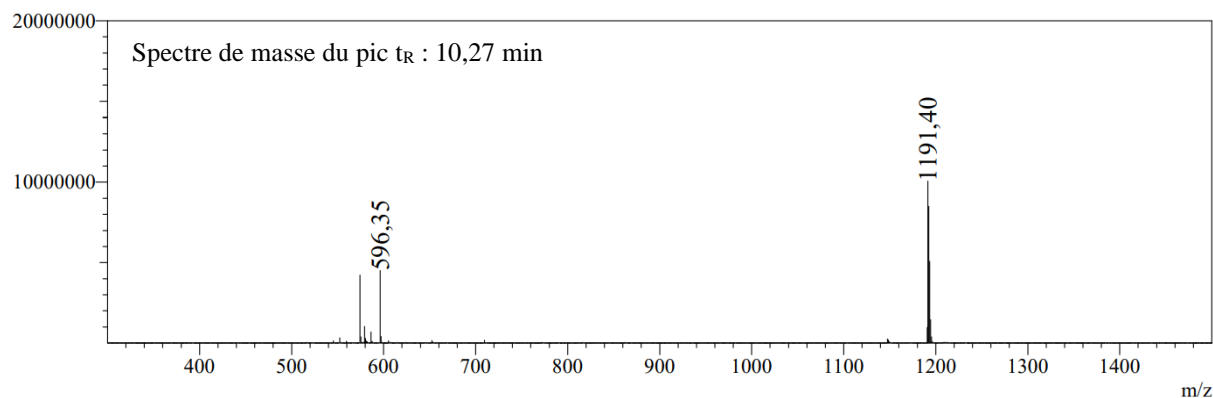
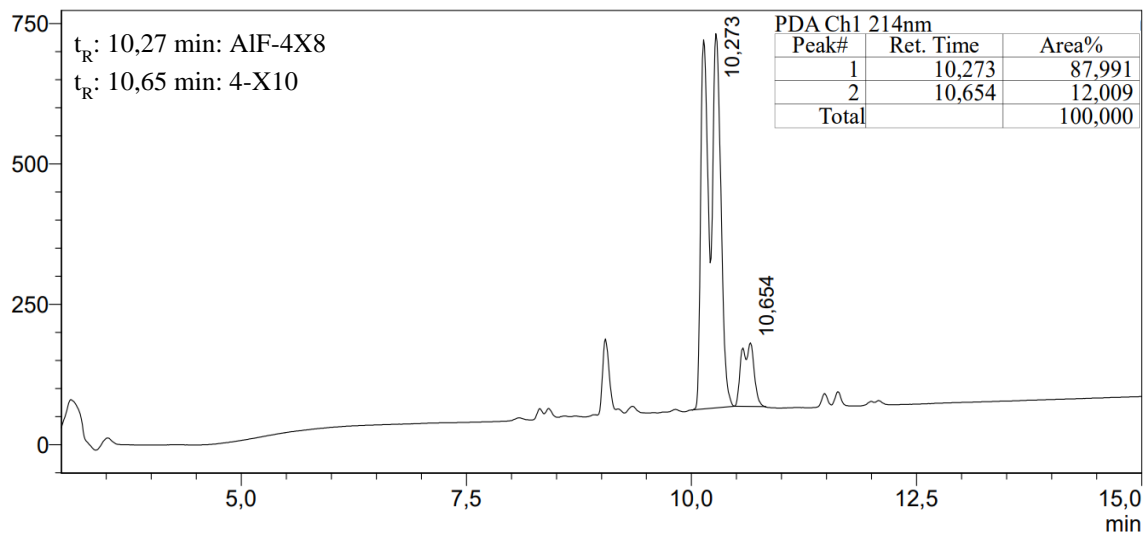
Annexe 13 : Chromatogramme et spectre de masse du composé **Al^{nat}F-27 (Al^{nat}F-NO2A-AHM-CWkuE)** obtenues par HPLC-MS (5 – 50% B en 15 min (A : H₂O/CH₃CN 95/5 v/v, 0,1% TFA, B : CH₃CN, 0,1% TFA), 0,8 mL/min, 214 nm)

mAU

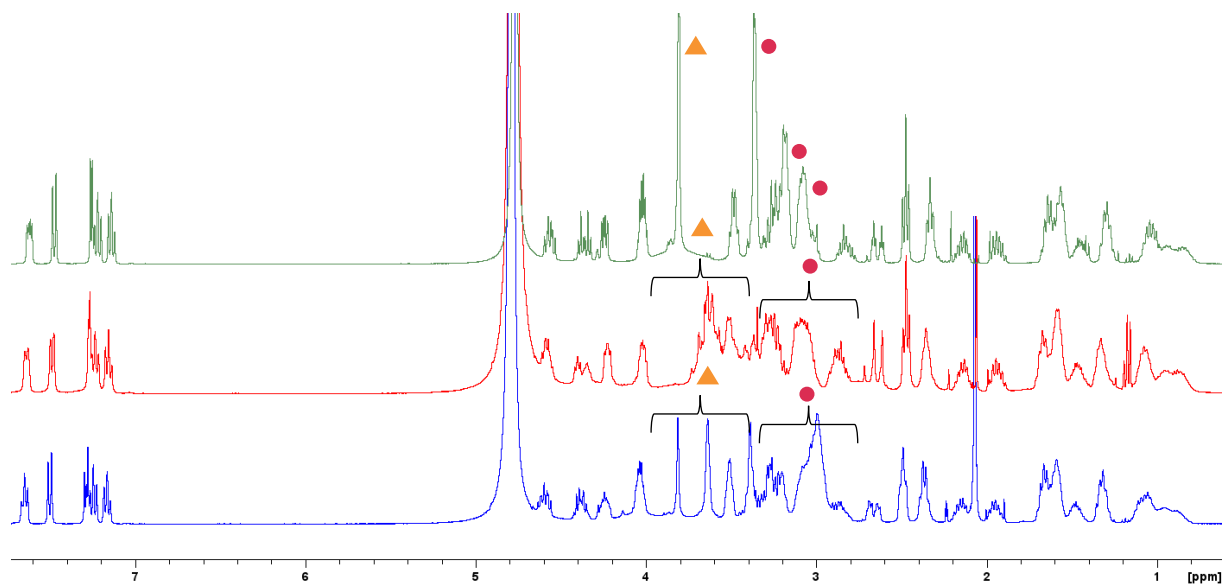


Annexe 14 : Chromatogramme et spectre de masse du composé **Al^{nat}F-28 (Al^{nat}F-NO2A-AHM-c(RGDfC))** obtenus par HPLC-MS (5 – 50% B en 15 min (A : H₂O/CH₃CN 95/5 v/v, 0,1% TFA, B : CH₃CN, 0,1% TFA), 0,8 mL/min, 214 nm)

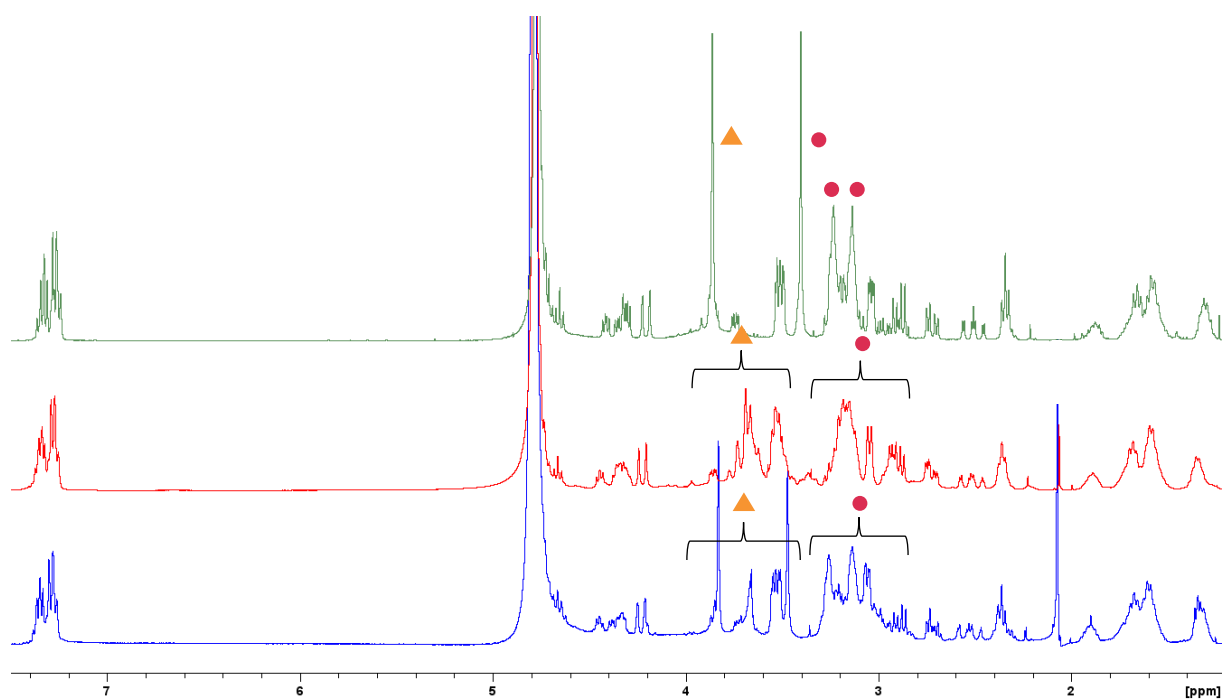
mAU



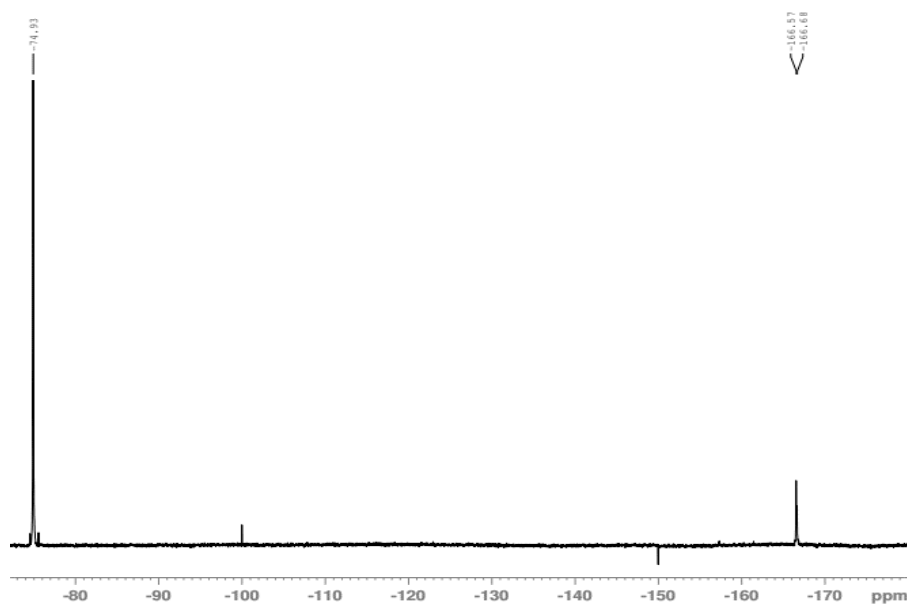
Annexe 15 : Comparaison spectres RMN ^1H de **27** (vert), $\text{Al}^{\text{nat}}\text{F-27}$ (rouge) et $^{\text{nat}}\text{Lu-27}$ (bleu)
(D_2O , 400 MHz, 300 K)



Annexe 16 : Comparaison spectres RMN ^1H de **28** (vert), $\text{Al}^{\text{nat}}\text{F-28}$ (rouge) et $^{\text{nat}}\text{Lu-28}$ (bleu)
(D_2O , 400 MHz, 300 K)

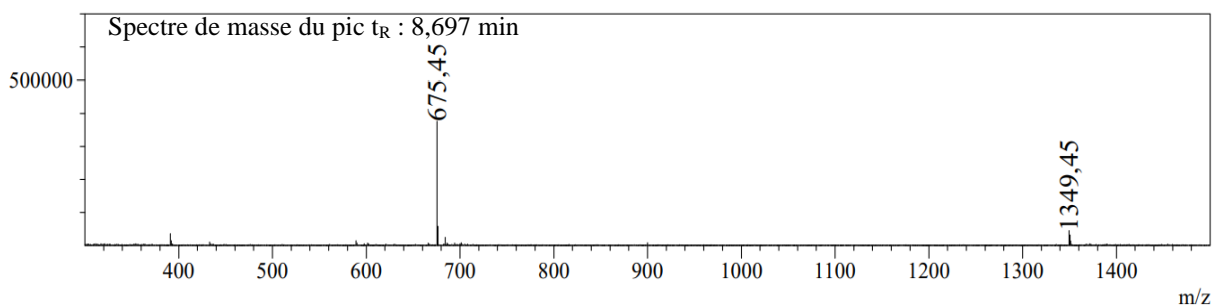
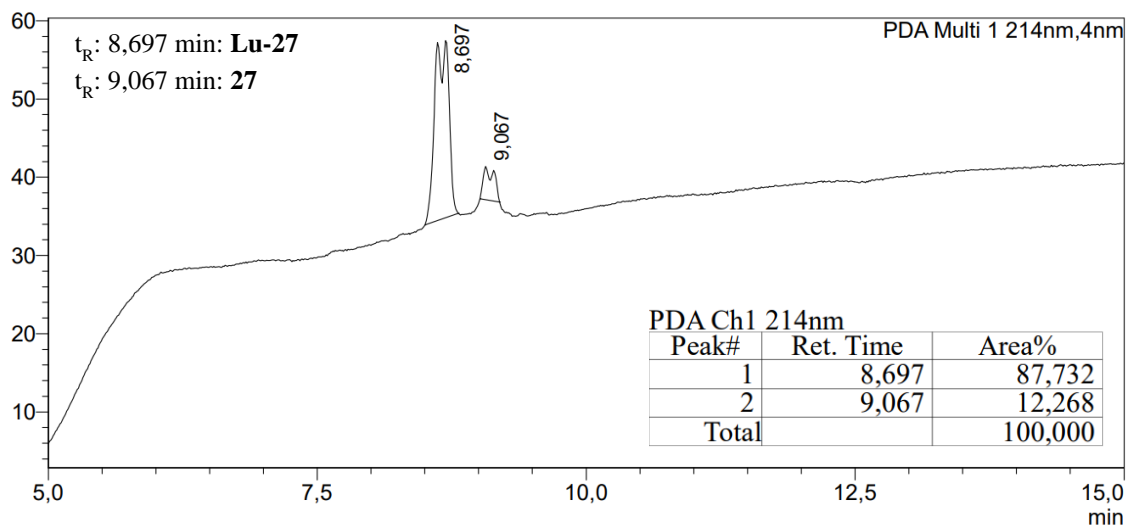


Annexe 17 : Spectre RMN ^{19}F (D_2O , 282 MHz, 300 K) de $\text{Al}^{\text{nat}}\text{F-27}$ (les pics à -100 et -150 ppm sont des artefacts)

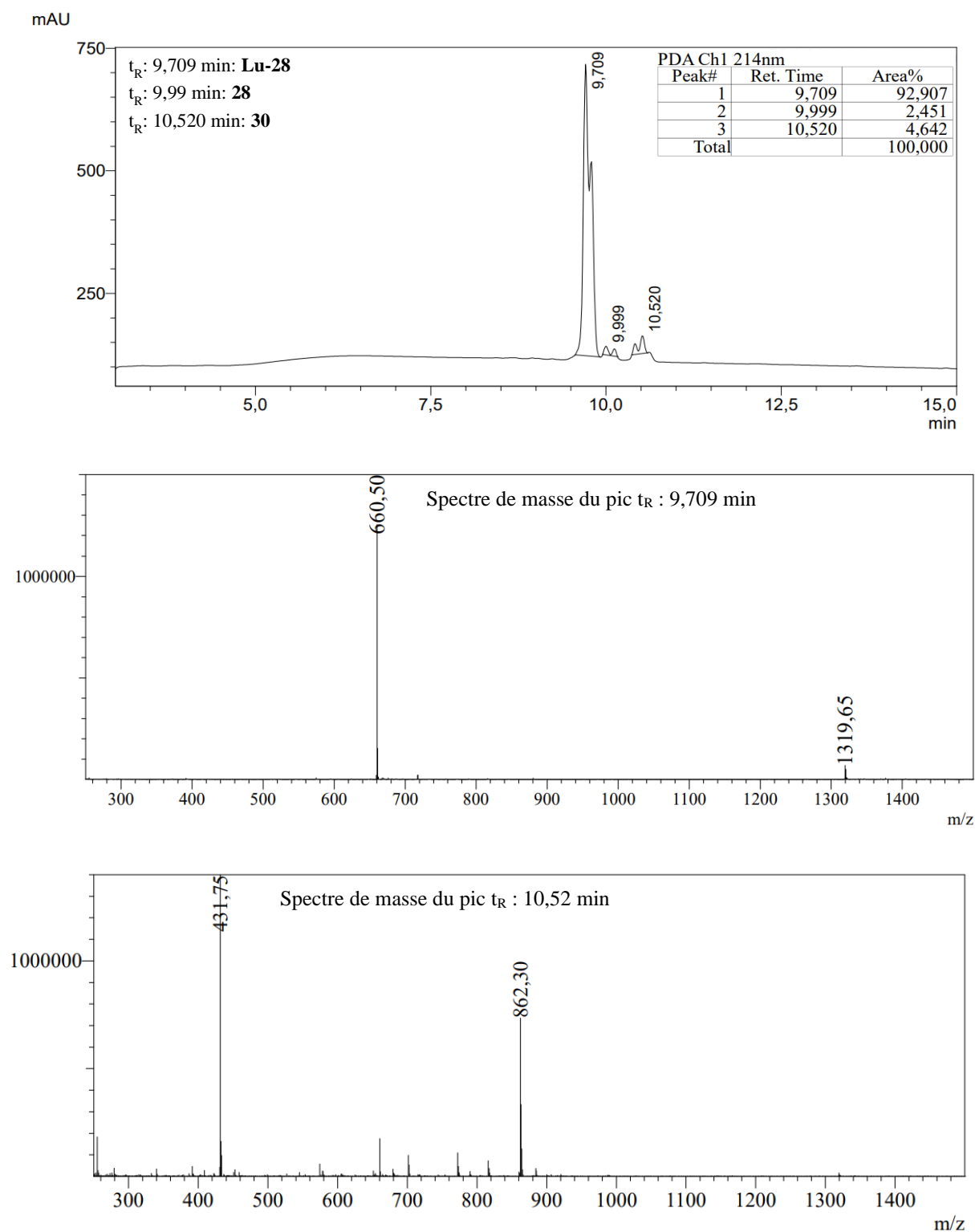


Annexe 18 : Chromatogramme et spectre de masse du $^{\text{nat}}\text{Lu-27}$ ($^{\text{nat}}\text{Lu-NO}_2\text{A-AHM-CWkuE}$) obtenus par HPLC-MS (5 – 50% B en 15 min (A : $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 95/5 v/v, 0,1% TFA, B : CH_3CN , 0,1% TFA), 0,8 mL/min, 214 nm)

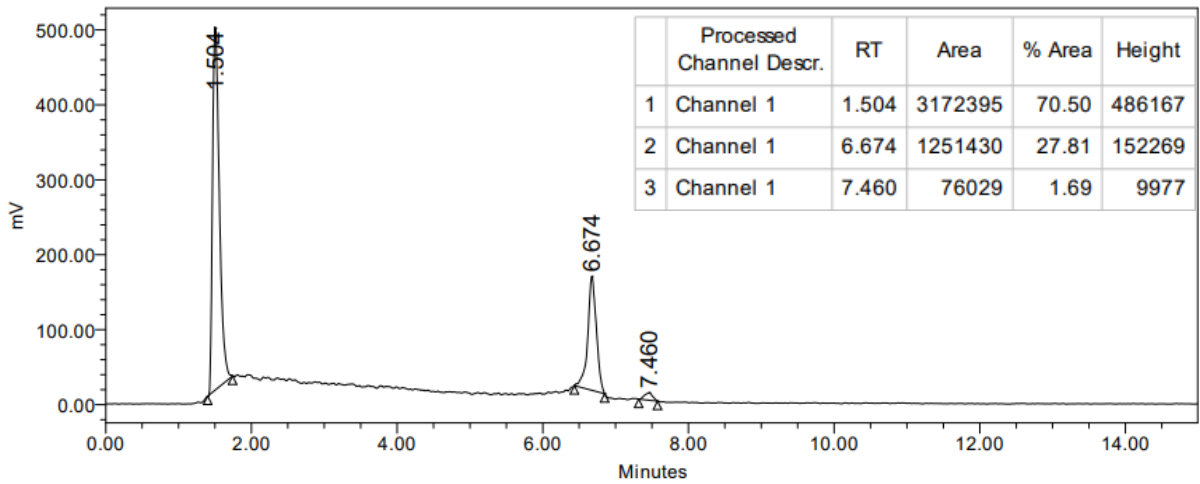
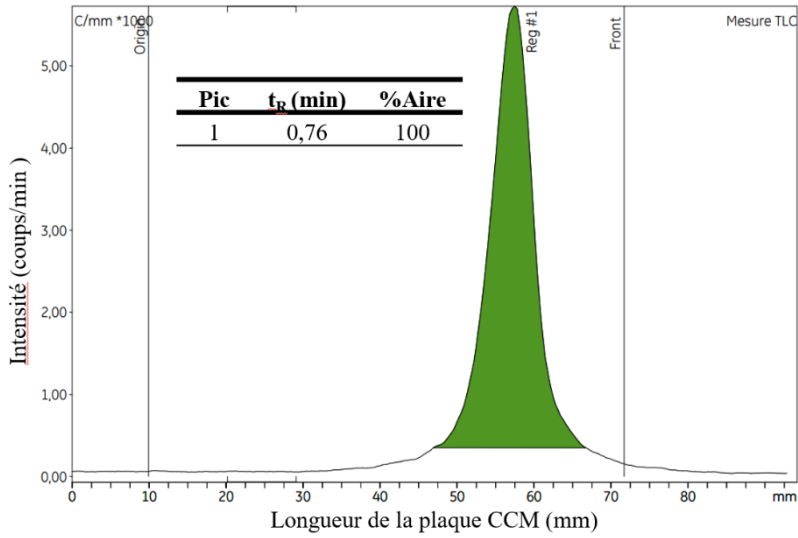
mAU



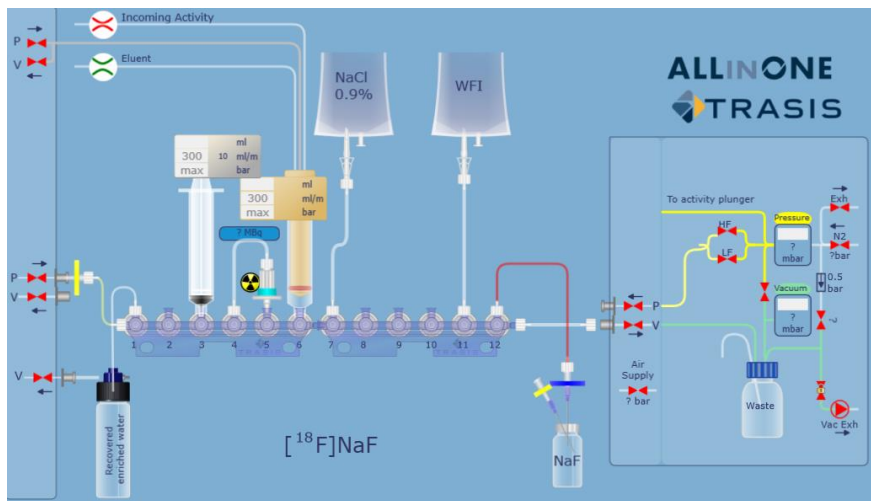
Annexe 19 : Chromatogramme et spectre de masse de ^{nat}Lu-28 (^{nat}Lu-NO₂A-AHM-c(RGDfC)) obtenus par HPLC-MS (5 – 50% B en 15 min (A : H₂O/CH₃CN 95/5 v/v, 0,1% TFA, B : CH₃CN, 0,1% TFA), 0,8 mL/min, 214 nm)



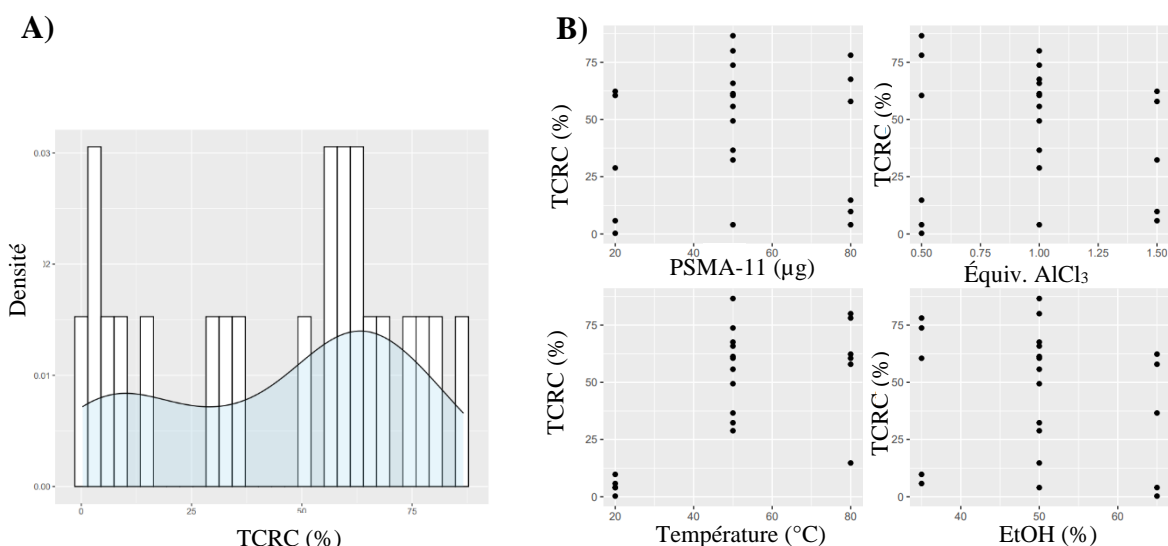
Annexe 20 : Analyse radio-CCM et radio-HPLC de [¹⁸F]AlF-PSMA-11 après purification sur HLB. Conditions d'éluion CCM : CH₃CN/H₂O 60/40, conditions HPLC : 5-40%B en 12 min.



Annexe 21 : Représentation graphique de la séquence de radiosynthèse de [¹⁸F]NaF sur AIO®

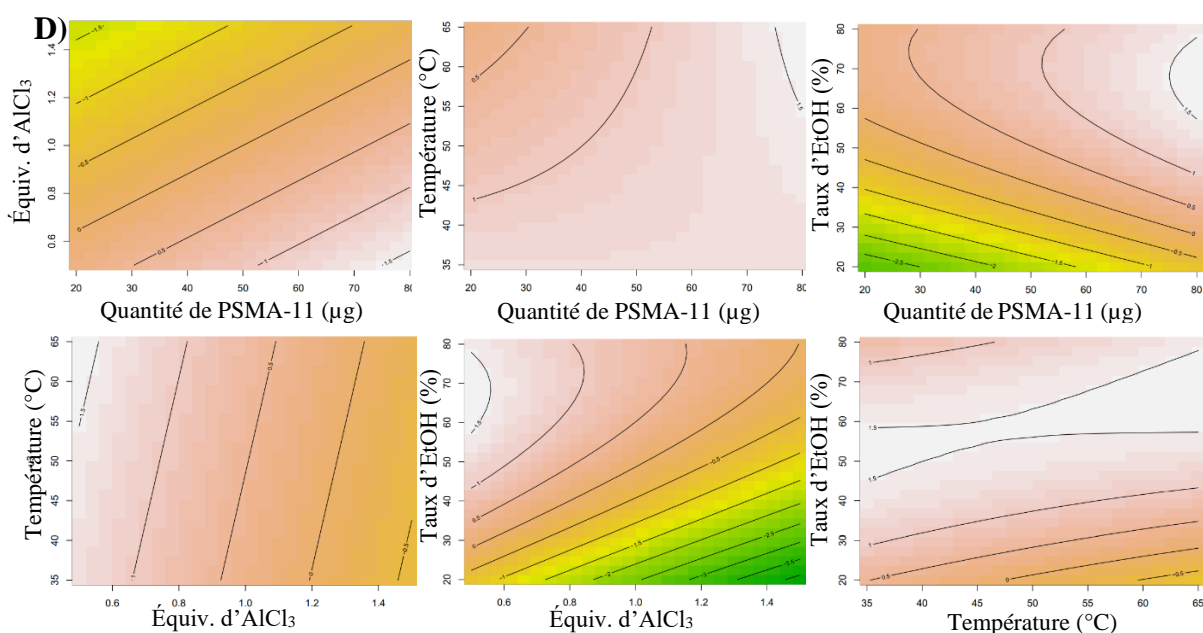


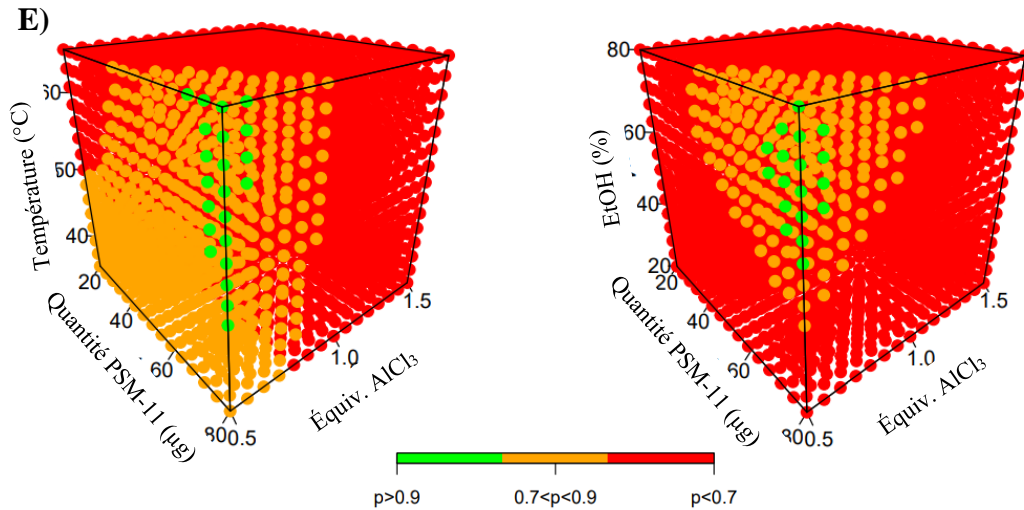
Annexe 22 : **A)** Histogramme et densité des valeurs de TCRC obtenu par radio-HPLC (Y_1). **B)** Graphique en dispersion des valeurs de Y_1 en fonctions des valeurs des quatre facteurs. **C)** équation. **D)** Modèle de surface de réponse pour Y_2 . Ces graphiques sont présentés pour des valeurs fixées des facteurs : $u_1 : 80$, $u_2 : 0,5$, $u_3 : 65$, $u_4 : 67,14$ lorsque ceux-ci ne sont pas étudiés sur le graphique. **E)** *Design space* pour $Y_1 > 60\%$, température : 65°C et EtOH : $67,14\%$. La partie de la carte en vert correspond aux conditions expérimentales à utiliser permettant d'obtenir un $Y_1 > 60\%$ avec une probabilité de 90%.



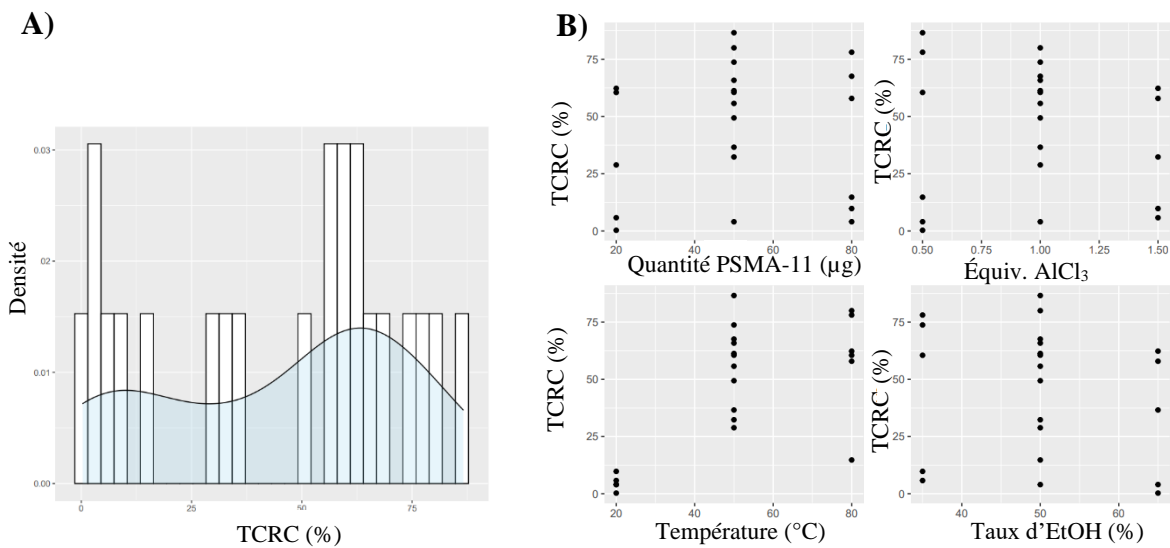
$$\text{C) } Y_1 = b_0 + b_1u_1 + b_2u_2 + b_3u_3 + b_4u_4 + b_{44}u_4^2 + b_{13}u_1u_3 + b_{14}u_1u_4 + b_{24}u_2u_4 + b_{34}u_3u_4 + E$$

$$Y_1 = 3,5665 - 0,0066u_1 - 4,0804u_2 - 0,1215u_3 + 0,0741u_4 - 0,001u_4^2 + 0,0007u_1u_3 - 0,0003u_1u_4 + 0,0328u_2u_4 + 0,0011u_3u_4 + E$$



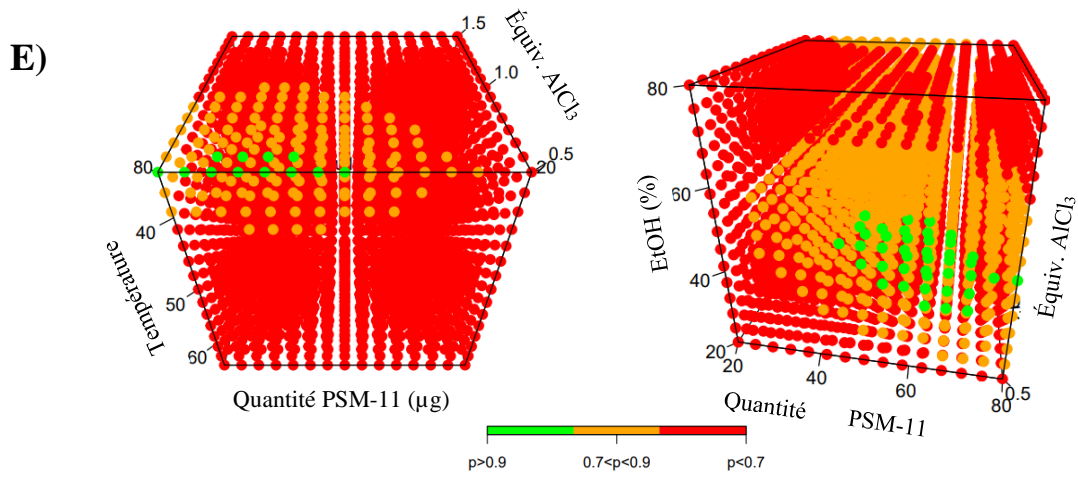
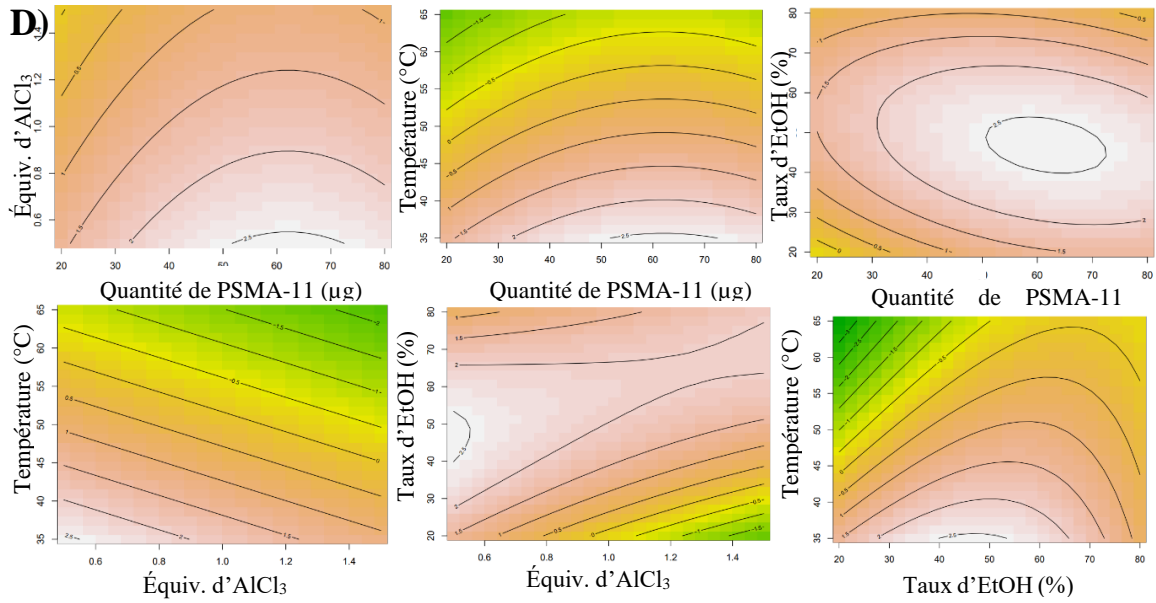


Annexe 23 : **A)** Histogramme et densité des valeurs de TCRC obtenu par radio-CCM (Y_2). **B)** Graphique en dispersion des valeurs de Y_2 en fonctions des valeurs des quatre facteurs. **C)** équation. **D)** Modèle de surface de réponse pour Y_2 . Ces graphiques sont présentés pour des valeurs fixées des facteurs : $u_1 : 62,86$, $u_2 : 0,5$, $u_3 : 35$, $u_4 : 45,71$ lorsque ceux-ci ne sont pas étudiés sur le graphique. **E)** *Design space* pour $Y_2 > 80\%$, température : 35°C et EtOH : $45,71\%$. La partie de la carte en vert correspond aux conditions expérimentales à utiliser permettant d'obtenir un $Y_2 > 80\%$ avec une probabilité de 90%.

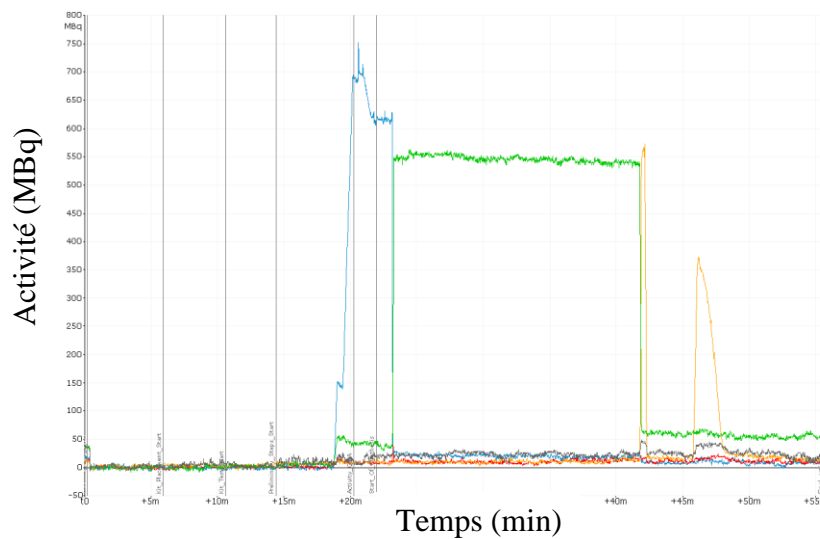


$$\text{C) } Y_2 = b_0 + b_1u_1 + b_2u_2 + b_3u_3 + b_4u_4 + b_{11}u_1^2 + b_{33}u_3^2 + b_{13}u_1u_3 + b_{23}u_2u_3 + b_{34}u_3u_4 + E$$

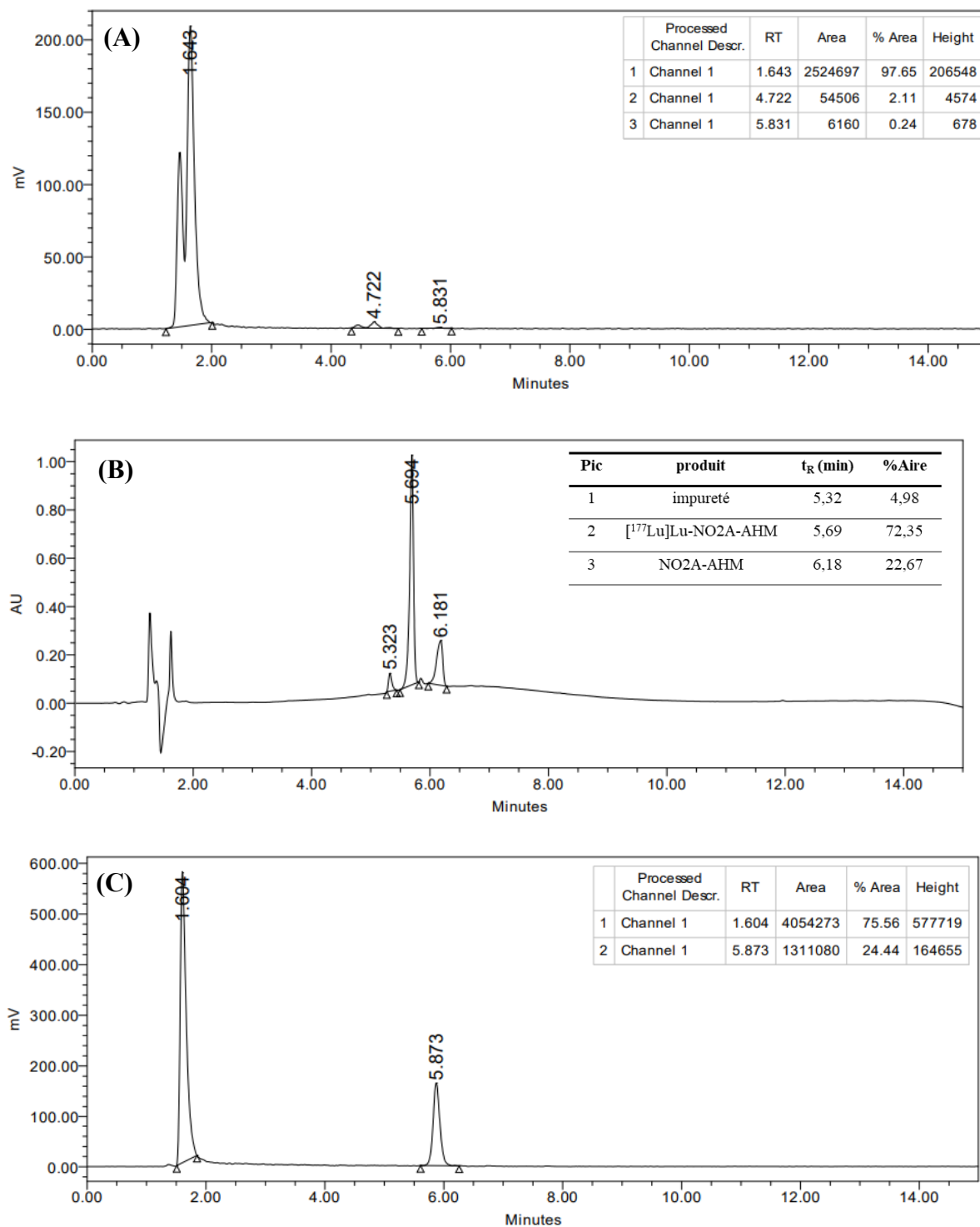
$$Y_2 = 4,741 + 0,1068u_1 - 4,824u_2 - 0,2075u_3 + 0,0692u_4 - 0,0007u_1^2 - 0,0016u_3^2 - 0,0006u_1u_3 + 0,0739u_2u_3 + 0,0021u_3u_4 + E$$



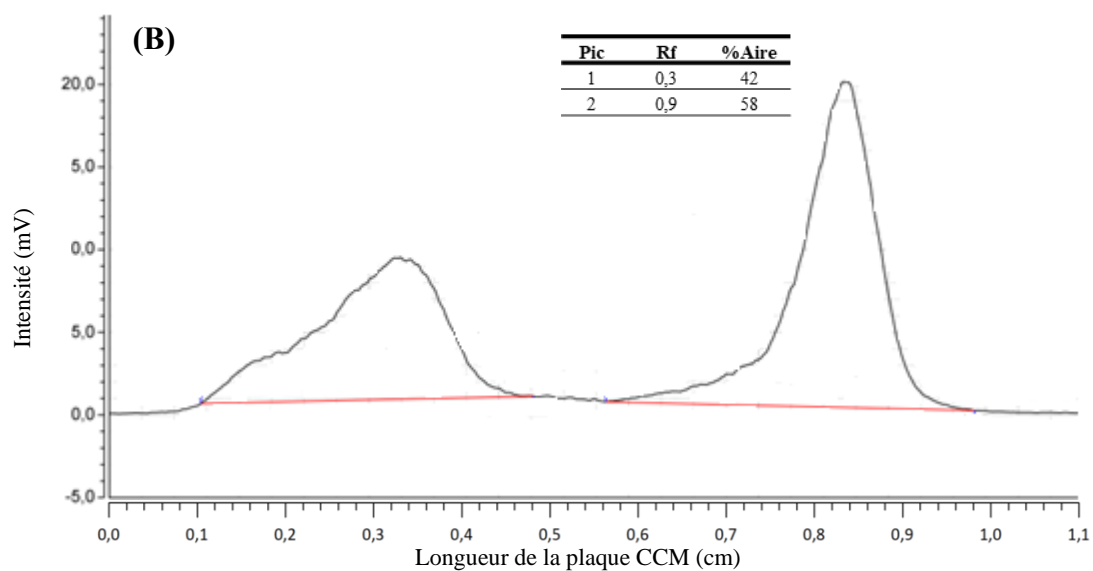
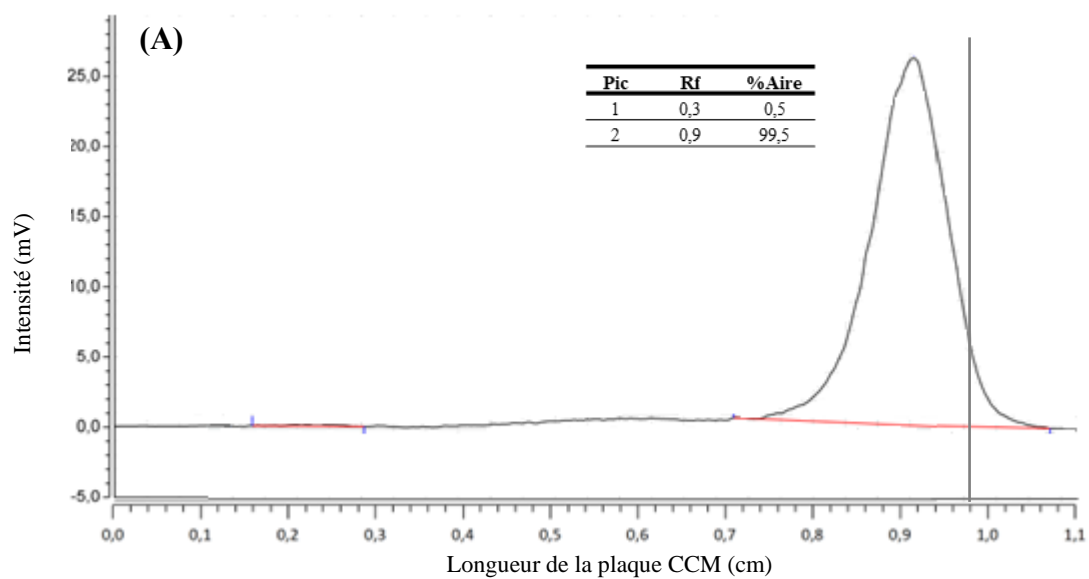
Annexe 24 : Courbe de radioactivité permettant le suivi de la radiosynthèse automatisée de [¹⁸F]AIF-PSMA-11 (bleu : capteur situé au niveau de la QMA, vert : capteur situé au niveau du four, orange : capteur situé au niveau de la seringue S3)



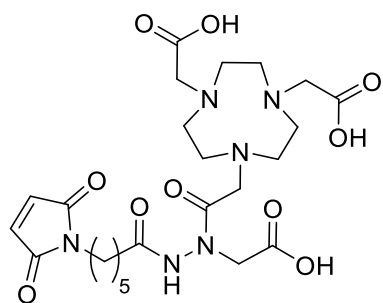
Annexe 25 : Chromatogrammes de (A) premier essai de radiomarquage de **NO2A-AHM** au lutécium-177 sur EasyOne, (B) deuxième essai de radiomarquage de **NO2A-AHM** au lutécium-177, (C) troisième essai de radiomarquage de **NO2A-AHM** obtenues par HPLC (5 – 50% B en 10 min (A : H₂O, 0.1% of TFA, B: CH₃CN, 0.1% TFA), 0,8 mL/min, 214 nm)



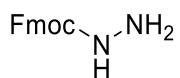
Annexe 26 : Analyse radio-CCM de (A) premier essai de radiomarquage de **NO₂A-AHM** au lutécium-177 sur EasyOne, (B) troisième essai de radiomarquage de **NO₂A-AHM** au lutécium-177. Conditions d'élution CCM : iTLC-SG, tampon citrate 0,5 M pH 5,0.



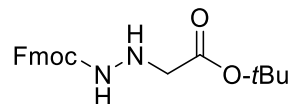
Liste des produits



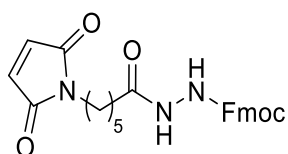
NO2A-AHM



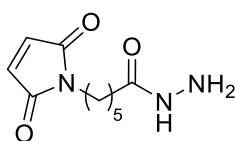
1



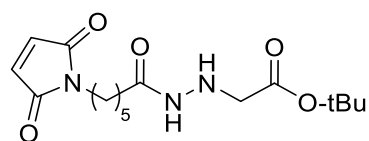
2



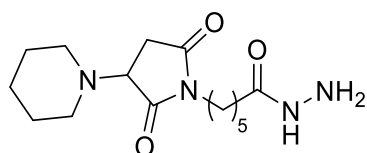
3



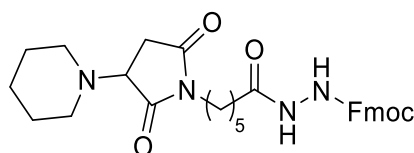
4



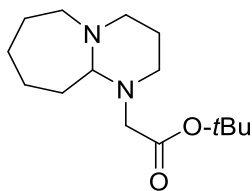
5



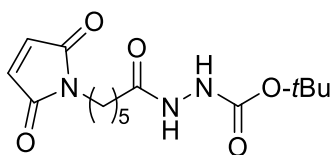
6



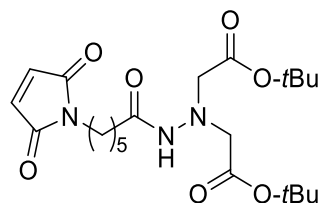
7



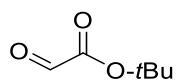
8



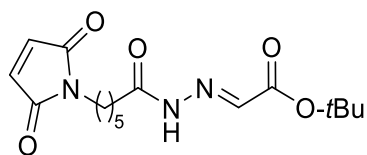
9



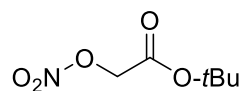
10



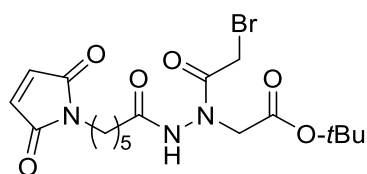
11



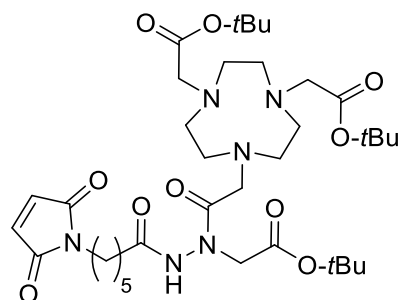
12



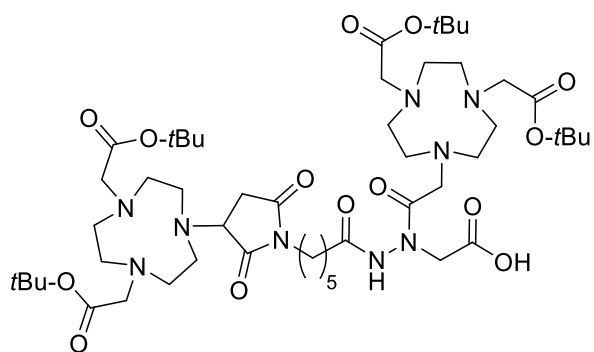
13



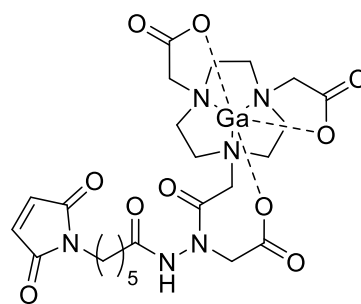
14



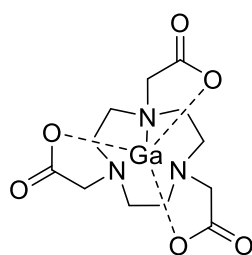
15



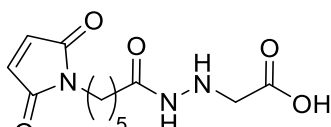
16



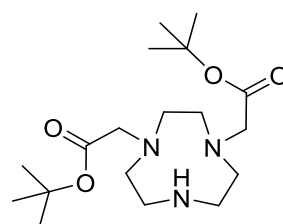
natGa-NO2A-AHM



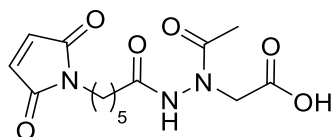
natGa-NOTA



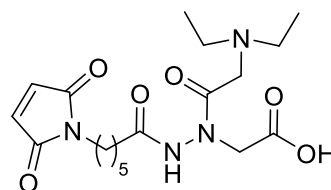
17



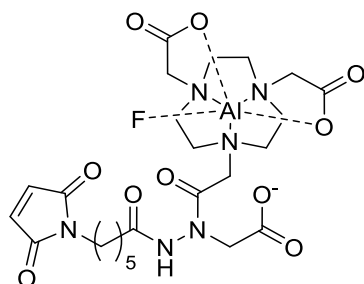
NO2AtBu



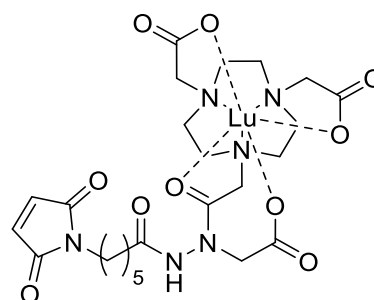
18



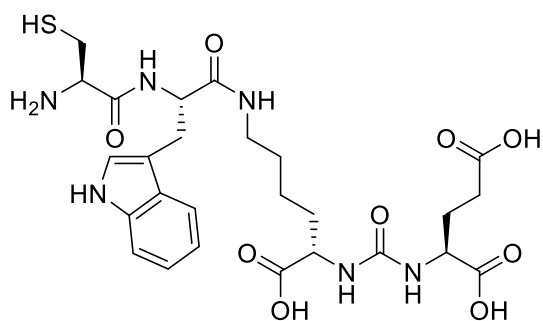
19



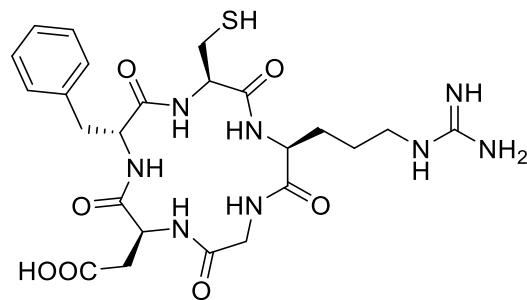
Al^{nat}F-NO2A-AHM



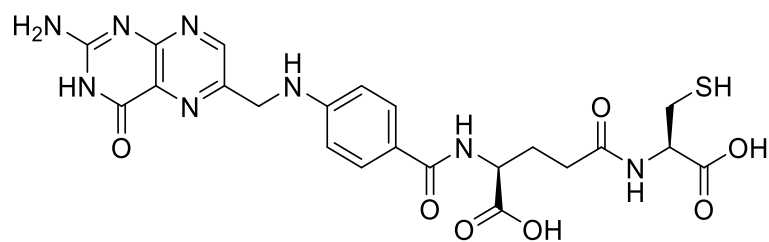
natLu-NO2A-AHM



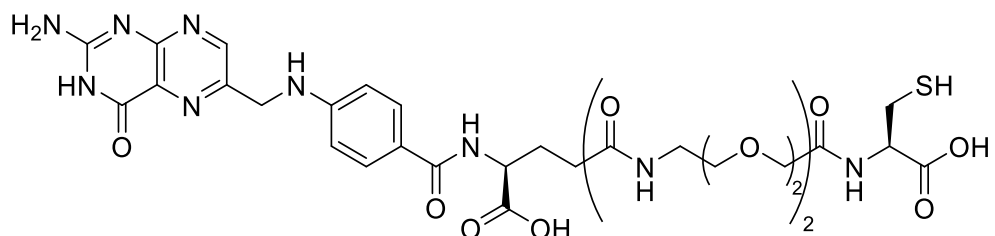
20



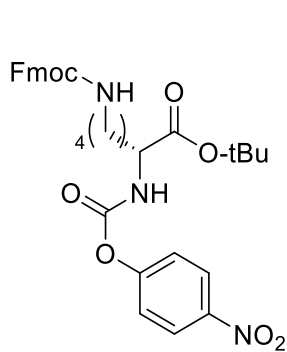
21



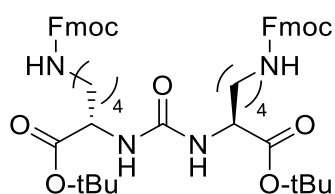
22



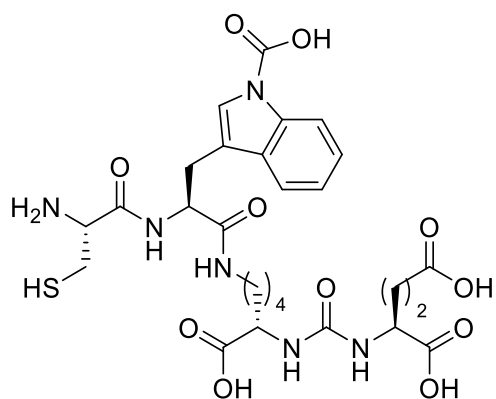
23



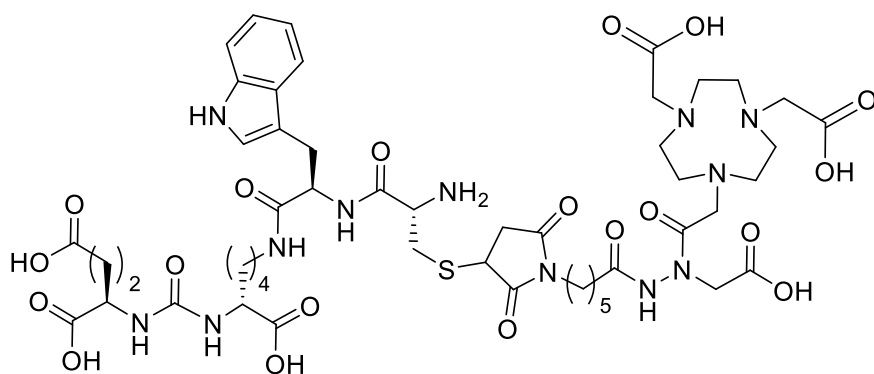
24



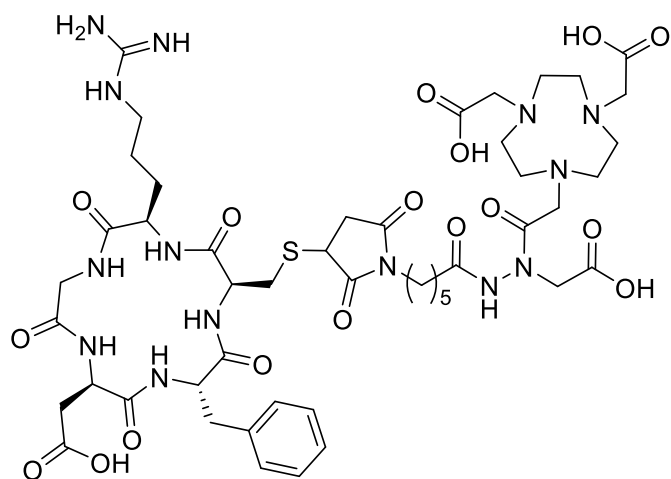
25



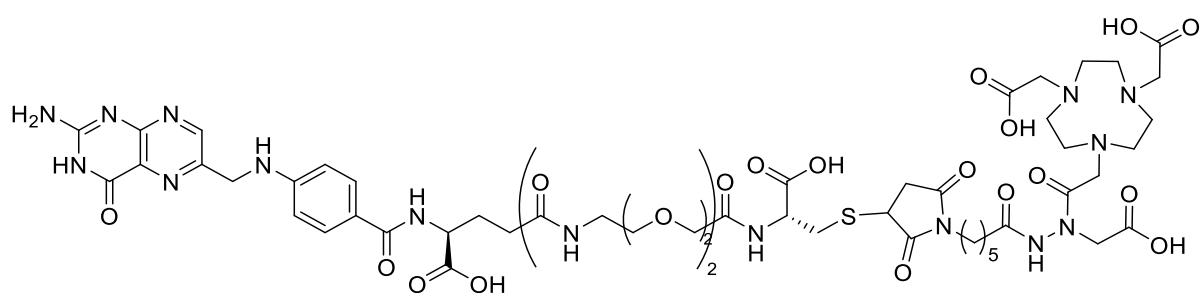
26



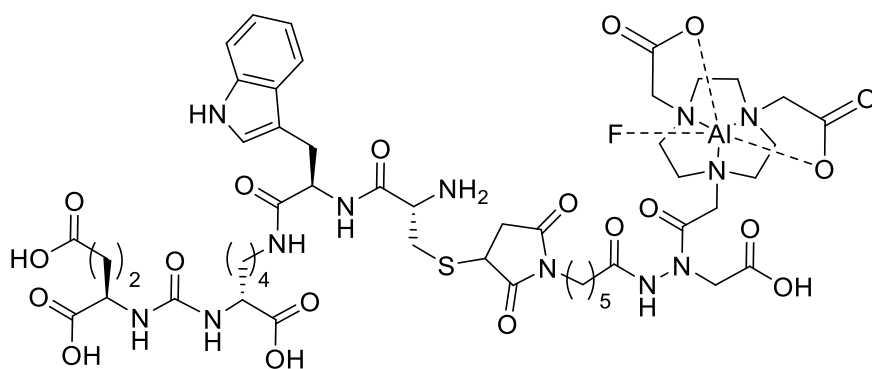
27



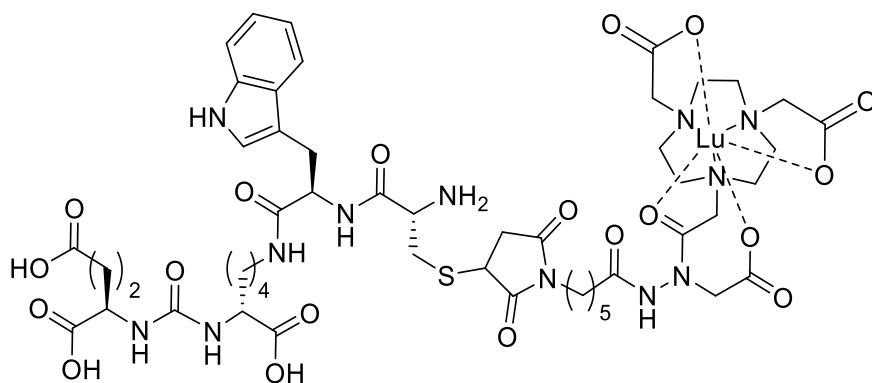
28



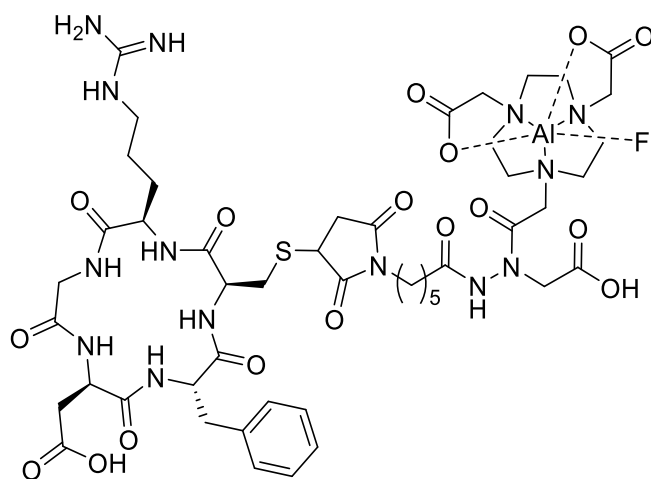
29



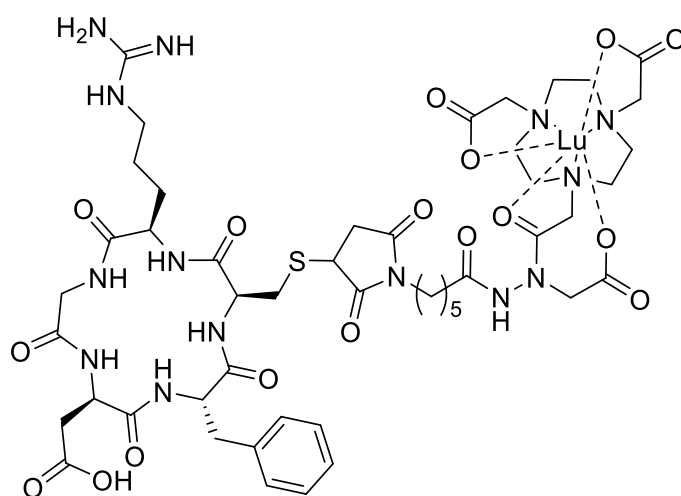
Al^{nat}F-27



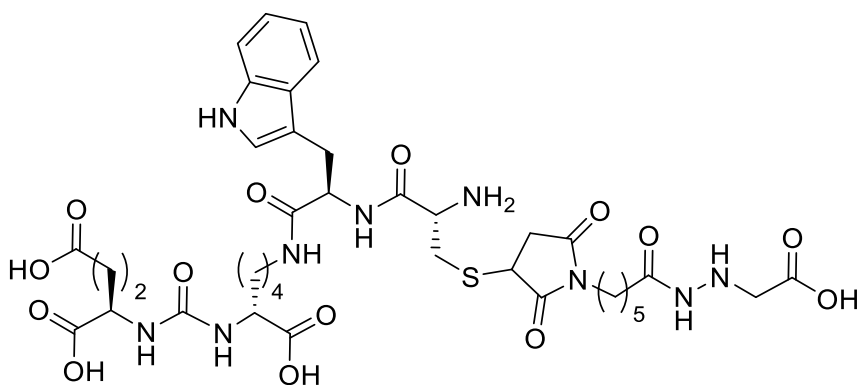
natLu-27



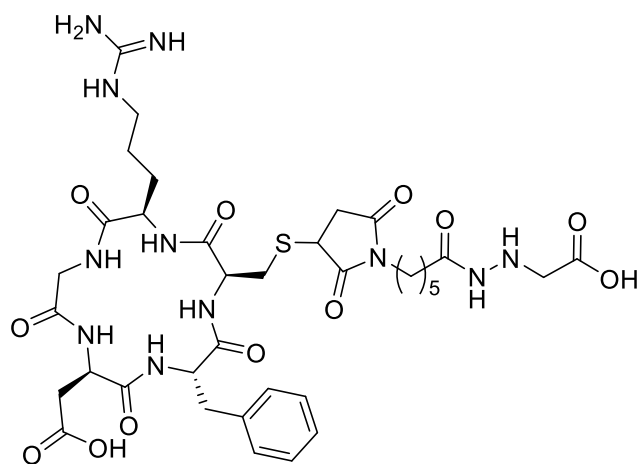
Al^{nat}F-28



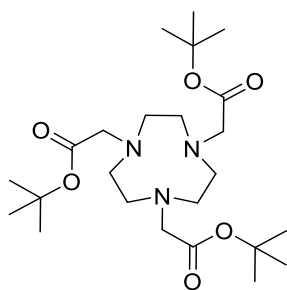
nat⁵Lu-28



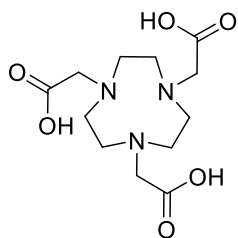
30



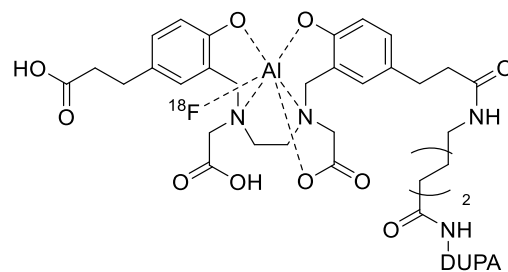
31



NOTAzBu



NOTA



[¹⁸F]AlF-PSMA-11

Élaboration de chélatant bifonctionnel original utilisable en theranostic pour le radiomarquage de biomolécules

L'imagerie moléculaire, en particulier l'imagerie de tomographie par émission de positons (β^+) (TEP) est devenue indispensable au diagnostic de nombreuses maladies comme les cancers. L'essor de cette technique non invasive est lié à l'obtention d'images tridimensionnelles, après injection d'un radiotracer, permettant de localiser et quantifier des cibles spécifiques à la pathologie. Les radiotraceurs sont également employés pour le traitement de cancer par radiothérapie interne vectorisée (RTIV). Ces radiotraceurs associent majoritairement un agent de ciblage, interagissant avec un biomarqueur de la pathologie, et un agent chélatant complexant un radionucléide permettant l'enregistrement d'images. Récemment une nouvelle technique de radiomarquage au fluor-18 par chimie de complexation (*i.e.*, formation du complexe d'aluminium-fluor-18) a vu le jour et est devenue une technique de choix pour le développement de nouveaux radiotraceurs. En fonction de la nature des agents chélatants, différents radionucléides peuvent être complexés par les traceurs. Le fluor-18 (^{18}F) et le gallium-68 (^{68}Ga) sont des radionucléides de choix pour l'imagerie TEP et le lutécium-177 (^{177}Lu) pour la RTIV, mais ces trois radionucléides possèdent des propriétés de complexation différentes. Ainsi, l'aluminium-fluor-18 peut être complexé par des agents chélatants de types HBED-CC et NOTA, le gallium-68, par des agents chélatant de types HBED-CC, NOTA et DOTA et le lutécium-177, par des agents chélatant de type DOTA.

L'objectif de ces travaux de thèse est de développer un nouvel agent chélatant bifonctionnel (ACB) pouvant être (i) radiomarké à l'aluminium-fluor-18, au gallium-68 et au lutécium-177 par chimie de complexation, et (ii) couplé à des peptides de ciblage. Le but est de préparer des « peptides-chélatants » pouvant être utilisés en imagerie TEP et en RTIV pour une application en theranostic (thérapie + diagnostic) s'insérant dans une démarche de médecine personnalisée. Dans un premier temps, le nouvel ACB a été synthétisé puis complexé à l'aluminium-fluor, au gallium et au lutécium (références froides). Des études de complexation ont été réalisées par RMN et par modélisation moléculaire pour montrer l'aptitude de l'ACB à complexer ces trois radionucléides. L'ACB a ensuite été couplé à des agents de ciblage connus tels que le RGD (pour le diagnostic de tumeurs surexprimant les intégrines $\alpha_v\beta_3$), le motif DUPA (pour le diagnostic du cancer de la prostate) et l'acide folique (pour le diagnostic du cancer de l'ovaire). En parallèle de ces travaux, la stratégie de radiomarquage aluminium-fluor-18, a été mise au point à Nancyclotep sur le précurseur de marquage PSMA-11 à l'aide d'une méthodologie des plans d'expériences, encore peu utilisée en radiochimie de nos jours. Enfin, le radiomarquage à l'aluminium-fluor-18 et au gallium-68 du nouvel ACB a été réalisé.

Development of a novel bifunctional chelating agent used in theranostics approach for the radiolabeling of biomolecules

Molecular imaging, in particular positron emission tomography (β^+) imaging (PET), has become essential for the diagnosis of many diseases such as cancers. The rise of this non-invasive technique is linked to the obtaining of three-dimensional images, after radiotracer injection, allowing the localization and quantification of pathology-specific targets. Radiotracers are also used for the cancer treatment by targeted radionuclide radiotherapy (TRT). These radiotracers mainly combine a targeting agent, interacting with a pathology biomarker, and a radionuclide chelating agent allowing image recording. Recently a new fluorine-18 radiolabeling method enabled by aluminum complexation has emerged and has become a technique of choice for the development of new radiotracers. Depending on the nature of the chelating agents, different radionuclides can be complexed by the tracers. Fluorine-18 (^{18}F) and gallium-68 (^{68}Ga) are the radionuclides of choice for PET imaging and lutetium-177 (^{177}Lu) for TRT, but these three radionuclides have different complexing properties. Thus, aluminum-fluorine-18 can be complexed by HBED-CC and NOTA chelating agents, gallium-68 by HBED-CC, NOTA and DOTA chelating agents and lutetium-177 by DOTA chelating agent.

The objective of this thesis work is to develop a new bifunctional chelating agent (BCA) that can be (i) radiolabeled with aluminum-fluorine-18, gallium-68 and lutetium-177 by coordination chemistry, and (ii) coupled to targeting peptides. The aim is to prepare a precursor of labeling, composed of a chelator coupled to a targeting agent, that can be used in PET imaging and TRT for theranostic application (therapy + diagnosis) as part of the personalized medicine approach. Initially, the new BCA was synthesized and complexed with aluminum-fluorine, gallium, and lutetium (non-radioactive references). To show the ability of ACB to complex these three radionuclides, complexation studies were performed by NMR and molecular modelling. The BCA was then coupled to targeting agents such as the RGD moiety (for the diagnosis of tumors overexpressing $\alpha_v\beta_3$ integrins), the DUPA recognition pattern (for the diagnosis of prostate cancer) and folic acid (for the diagnosis of ovarian cancer). In parallel to this work, the aluminum-fluorine-18 radiolabeling strategy was developed at Nancyclotep on the precursor of labeling named PSMA-11. The implementation of the design of experiments methodology, which is rarely used in radiochemistry today, was realized. Finally, the radiolabeling of the new BCA with aluminum-fluorine-18 and gallium-68 was carried out.