

**RADIOMARQUAGE ET VECTORISATION DE
NANOCAPSULES LIPIDIQUES
POUR DES APPLICATIONS EN
RADIOIMMUNOTHÉRAPIE DES CANCERS.**

THÈSE DE DOCTORAT

École Doctorale CHIMIE BIOLOGIE

Discipline : Chimie Organique

Spécialité : Radiochimie

présentée et soutenue publiquement par

JESTIN Emmanuelle

Le 05 Février 2007, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs : M. GUILLOTEAU Denis, PU-PH, Faculté de Pharmacie de Tours
M. BENOIST Eric, MCU, Université Paul Sabatier, Toulouse III

Examineurs : M. BENOIT Jean-Pierre, PU-PH, Faculté de Pharmacie de Angers
M. DENIAUD David, MCU, Faculté des Sciences de Nantes

Directeurs de thèse : M. GESTIN Jean-François, Directeur de Recherche INSERM, Nantes
M. HINDRÉ François, MCU, Faculté de Pharmacie de Angers.

Invité : M. BARBET Jacques, Directeur de Recherche CNRS, Nantes

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE 1.REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	2
I. La Radioimmunothérapie.....	2
I.1. Introduction : l'utilisation des anticorps pour le traitement des tumeurs.	2
I.2. Le radioimmunoconjugué.....	4
I.3. La cible antigénique.....	13
I.4. Choix du radionucléide.....	14
I.5. Applications cliniques.....	21
II. Les nanocapsules lipidiques	28
II.1. Préparation des nanocapsules lipidiques.....	28
II.1.1. Constitution des nanocapsules lipidiques.....	28
II.2. Biocompatibilité des nanocapsules lipidiques.....	30
II.3. Utilisation des nanocapsules lipidiques à visée médicale.....	34
Objectifs de la thèse	38
CHAPITRE 2.MODIFICATIONS DE LA FORMULATION DES NANOCAPSULES lipidiques.....	41
I. Optimisation de la formulation des nanocapsules lipidiques : quel type de polymère utiliser ?	42
II. Nouvelles formulations des nanocapsules lipidiques.....	45
II.1. Matériels	45
II.2. Méthode conventionnelle.....	45
II.3. Méthode dite de "post-insertion".....	53
II.3.2. Radiomarquage au ^{99m} Tc – Résultats des stabilités sanguines.....	54
II.4. Conclusion.....	54
CHAPITRE 3.SYNTHÈSES DES "CONSTRUCTS".....	55
I. Synthèse du "construct" intermédiaire DSPE-PEG _n -NH ₂	56
I.1. Brève revue bibliographique.....	56
I.2. Stratégie de synthèse.....	57
I.3. Optimisation de la synthèse.....	59
II. Fonctionnalisation des "constructs" DSPE-PEG _n -NH ₂	65
II.1. Synthèses des agents chélatants.....	65
II.2. Synthèse des différents haptènes.....	69
II.3. Synthèses des "constructs" finaux.....	72
CHAPITRE 4. DIFFÉRENTES VOIES DE RADIOMARQUAGE DES NANOCAPSULES LIPIDIQUES.....	75
I. Etude de la faisabilité de radiomarquages en surface.....	76
I.1. Radiomarquages des nanocapsules lipidiques à l'indium-111.....	76
I.2. Radiomarquages des nanocapsules lipidiques à l'iode-125.....	80
II. Etude de la faisabilité d'un radiomarquage à l'iode-125 au niveau du cœur lipidique des LNC.....	87
II.1. Synthèse des précurseurs lipophiles.....	88
II.2. Radiomarquages des nanocapsules lipidiques.....	89
CHAPITRE 5.CONCLUSION.....	93
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	98
PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	115
I Généralités.....	116
II. Modes opératoires.....	117
II.1. Synthèse des intermédiaires α-amino-ω-O-(carboxy-N-distéaroyl phosphatidyléthanolamine)-poly(éthylène glycols) ou DSPE-PEG _n -NH ₂	117
II.2. Synthèses des agents chélatants.....	126
II.3. Synthèses des haptènes.....	137
II.4. Synthèses des différents "constructs".....	143

II.5. Synthèses des précurseurs lipophiles.	149
--	-----

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le mot “cancer” est employé pour désigner une prolifération anormale des cellules. L’organisme est constitué de milliards de cellules. Les cellules normales se multiplient, se différencient puis meurent. En revanche, les cellules cancéreuses prolifèrent de façon anarchique. Si les tumeurs bénignes restent localisées, les tumeurs cancéreuses envahissent et détruisent les tissus environnants. Elles peuvent également être disséminées par les voies sanguines ou lymphatiques dans d’autres parties de l’organisme, d’où l’apparition de métastases. Ce mode de propagation à distance est l’une des difficultés majeures posées par les maladies cancéreuses car même après ablation de la tumeur initiale, un cancer est susceptible de réapparaître sous forme de métastases. Parmi les différents types de cancers, le cancer du poumon est la forme de cancer la plus fréquente chez l’homme (17%), suivi du cancer colorectal (13%). Chez la femme, le cancer du sein représente 30% des cancers, suivi du cancer colorectal (16%).

Actuellement, trois principales méthodes de traitement du cancer permettent la guérison d’une partie des patients : la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. De nouvelles voies thérapeutiques sont en cours de développement et font l’objet d’études cliniques. Parmi elles, la radioimmunothérapie est une forme de radiothérapie interne qui consiste après injection intraveineuse d’un anticorps porteur d’une forte radioactivité à irradier sélectivement des cellules cancéreuses.

Les cellules tumorales présentent à leur surface des molécules appelées antigènes tumoraux. Ces marqueurs de surface vont être reconnus sélectivement par les anticorps radiomarqués qui se lient à leur antigène. La tumeur devient alors radioactive. En fonction de la nature de l’atome radioactif utilisé et de la quantité de radioactivité injectée, un rayonnement plus ou moins important est émis à partir de la cellule tumorale. Celui-ci a la propriété d’irradier les cellules tumorales voisines dans un rayon de quelques millimètres à partir de la source d’émission et de les détruire.

Actuellement, la radioimmunothérapie a démontré son efficacité pour le traitement des lymphomes après échec de la chimiothérapie. Ce type de tumeur est caractérisé par une grande radiosensibilité. En revanche, pour des tumeurs de plus grande taille moins radiosensibles, des progrès technologiques doivent être réalisés pour améliorer l’efficacité de la radioimmunothérapie. Des résultats encourageants ont été rapportés récemment avec des systèmes de ciblage en plusieurs étapes ou systèmes de préciblage qui permettent de réduire la fixation non spécifique ([Barbet J, et al. 1999](#)). Cependant, la quantité de radioactivité que l’on peut vectoriser constitue un facteur limitant de ce système. Plusieurs études ont été abordées afin d’augmenter l’activité spécifique des molécules vectrices et en particulier, l’utilisation de vecteurs colloïdaux tels que les nanocapsules lipidiques immunospécifiques.

Ce travail de thèse s’articule en plusieurs chapitres. Le premier est divisé en deux parties : la première décrit plus précisément le principe de la radioimmunothérapie, ses applications cliniques et ses limites ; la seconde partie concerne les différents aspects techniques des nanocapsules lipidiques et leurs applications médicales. Ainsi, ce premier chapitre développe l’intérêt de l’utilisation des nanocapsules lipidiques dans un système en deux temps en radioimmunothérapie. Les chapitres suivants décrivent le cheminement du travail expérimental qui a été réalisé au cours de cette thèse pour permettre l’utilisation des nanocapsules lipidiques en tant qu’outils thérapeutiques pour la RIT.

CHAPITRE 1.REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LA RADIOIMMUNOTHERAPIE.

La radioimmunothérapie est une méthode de radiothérapie qui consiste à irradier des petites tumeurs disséminées dans l'organisme après injection intraveineuse d'un anticorps porteur d'une forte radioactivité et qui a la propriété de se fixer sélectivement sur les cellules tumorales. Les dépôts d'énergie dus à l'irradiation vont provoquer des radicaux libres et des peroxydes dans la matière, qui eux-mêmes vont provoquer la mort des cellules ciblées.

1.1. Introduction : l'utilisation des anticorps pour le traitement des tumeurs.

Cette propriété des anticorps monoclonaux (AcM) à reconnaître spécifiquement des antigènes membranaires ou cytoplasmiques, dont la densité est plus élevée dans les cellules tumorales que dans les cellules normales ou pathologiques bénignes, a permis le développement de nombreuses applications pour le traitement des tumeurs (Douillard JY, *et al.* 1998).

Certains anticorps ont été utilisés comme effecteurs immunitaires. Les anticorps injectés seuls peuvent impliquer différents mécanismes dont la finalité est la destruction de la cible (Figure 1). Ainsi, une fois l'anticorps sur sa cible antigénique, il peut être responsable de l'activation de signaux qui vont placer la cellule dans une phase d'apoptose (Figure 1A). L'anticorps forme un complexe immun antigène-anticorps qui va induire une cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC). En effet, ce complexe va être reconnu par les effecteurs cellulaires du système immunitaire, essentiellement les éléments mononucléés (lymphocytes, monocytes, cellules *natural killer*, macrophages) mais aussi dans certaines situations les polynucléaires (Figure 1B). Un mécanisme de cascade du complément peut également être induit quand, le plus souvent, plusieurs immunoglobulines ou IgG sont proches les unes des autres. L'afflux des protéines du complément peut soit induire une action directe sur la cellule par lyse de la membrane ; soit induire un mécanisme indirect par attraction des cellules immunitaires (Figure 1C). La mise en contact de la cible cellulaire tumorale et de l'effecteur immunitaire, par le biais de l'anticorps, va aboutir à la destruction de la cible. Un autre mode d'action peut aussi être associé à l'injection d'anticorps par inhibition des facteurs angiogéniques qui initient la néovascularisation autour de la tumeur. Cette neutralisation des facteurs angiogéniques va alors empêcher l'apport en nutriments et par conséquent le développement de la tumeur (Figure 1D).

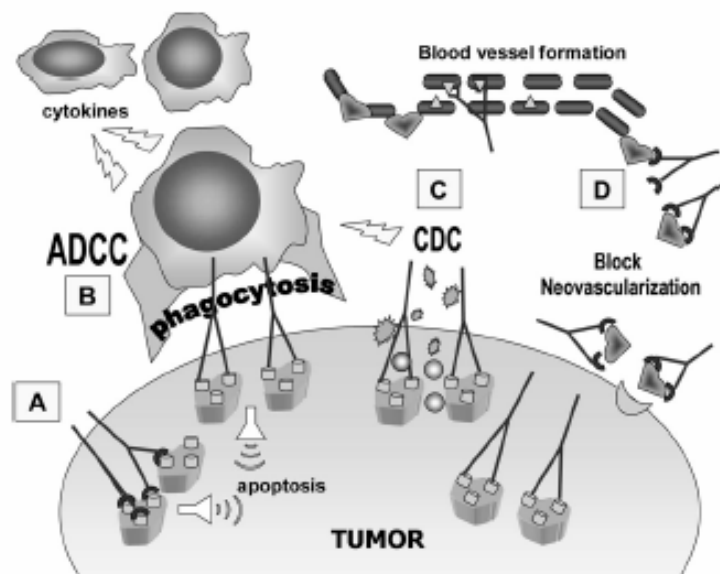


Figure 1. Mécanismes d'action associés à l'AcM. (A) L'AcM peut activer les signaux apoptotiques en se liant à deux antigènes. (B) Les cellules immunitaires peuvent attaquer le complexe anticorps-antigène présent à la surface de la tumeur par phagocytose par exemple ; et/ou peuvent libérer des cytokines pour attirer d'autres cellules cytotoxiques. (C) Si deux anticorps sont rapprochés, ils peuvent initier la cascade du complément qui peut perturber la membrane ou attirer les cellules immunitaires. (D) La tumeur peut produire des facteurs angiogéniques qui initient la néovascularisation. Les anticorps peuvent neutraliser ces facteurs angiogéniques en se liant à eux, empêchant ainsi le développement de la tumeur. (Sharkey RM, *et al.* 2006).

Le domaine le plus étudié dans ce cas est le traitement d'adénocarcinomes colorectaux. Les résultats des études cliniques ont été décevants chez les malades avec un cancer colorectal au stade métastatique avancé et beaucoup plus favorables dans la situation de maladie microscopique résiduelle. Une telle immunisation est peu efficace pour des masses antigéniques importantes.

Les anticorps monoclonaux ont été aussi utilisés comme vecteurs d'agents cytotoxiques. De nombreux agents antimétaboliques ont été couplés à des anticorps monoclonaux (adriamycine, bléomycine, mitomycine, méthotrexate, 5-FU, vindésine...). La difficulté de cette méthode réside dans la vectorisation d'un très grand nombre de molécules (jusqu'à $2 \cdot 10^7$ par cellule) pour obtenir une activité cytotoxique. Cela est sans aucun doute un fait limitant d'autant plus que la vectorisation *in vivo* est rendue complexe du fait de problèmes d'accessibilité vasculaire et d'hétérogénéité de l'expression antigénique. De plus, il est nécessaire que la molécule soit internalisée pour exercer son activité.

Le principal avantage potentiel des radioanticorps (radionucléides couplés aux anticorps) par rapport aux toxines et aux agents médicamenteux est qu'ils peuvent irradier efficacement des cellules tumorales voisines de celles sur lesquelles ils sont fixés mais qui n'expriment pas l'antigène tumoral reconnu par l'anticorps radiomarqué selon le principe dit du "feu croisé". En effet, l'expression d'un antigène associé à un type particulier de tumeur est très hétérogène et varie d'une cellule à l'autre dans une même tumeur. Certaines cellules ont une densité importante de molécules d'antigène à leur surface et peuvent donc fixer les molécules d'immunoconjugué. D'autres cellules n'en possèdent pas. Une toxine ou une drogue médicamenteuse doit être "internalisée" dans la cellule tumorale pour y produire son action cytotoxique. Elle doit auparavant être fixée à la surface de la cellule par l'intermédiaire de la molécule d'immunoconjugué. Quand la cellule tumorale n'exprime pas l'antigène, elle ne peut fixer l'immunoconjugué et la toxine ou la drogue ne peut avoir aucune action sur cette cellule qui va poursuivre sa prolifération. Ce n'est pas le cas du radionucléide qui, à partir de sa source

d'émission (molécule de radioimmunoconjugué fixée sur l'antigène surfacique d'une cellule tumorale), peut irradier des cellules voisines n'exprimant pas l'antigène, sur une distance qui correspond au parcours maximal de son rayonnement particulaire (1,1 mm pour l'iode-131 et 6,8 mm pour l'yttrium-90 plus énergétique).

Il est à noter également qu'une étude sur le traitement de lymphomes a été réalisée en injectant une forte quantité d'anticorps non radiomarqué et en injectant dans un deuxième temps une quantité moindre d'anticorps radiomarqué à l'iode-131 (Kaminski MS, *et al.* 1996). La dose d'anticorps froid a une activité biologique propre et peut induire une cytotoxicité par ADCC et par apoptose. Ainsi, l'efficacité globale de cette radioimmunothérapie résulte d'une action combinée de l'activité propre de l'anticorps pouvant induire une cytotoxicité par apoptose et de l'irradiation à bas débit de dose apportée par le radioélément.

L'utilisation d'anticorps radiomarqués dans le traitement de tumeurs, en comparaison à une radiothérapie classique, permet à dose équivalente de diminuer significativement la toxicité et ainsi d'augmenter la dose injectée permettant de diminuer le pourcentage de survie des cellules tumorales (Figure 2).

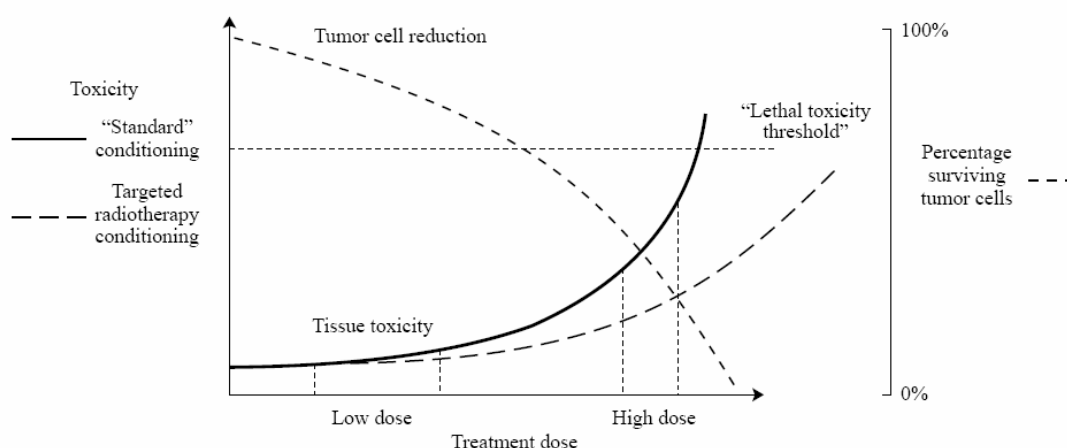


Figure 2. Courbes Thérapie / Toxicité / mort tumorale. (d'après Orchard K, *et al.* 2004).

Cette dose maximum tolérée du radioimmunoconjugué est fonction de la nature de l'AcM, du type de radionucléide, du type d'injection et du traitement que le patient a reçu avant la RIT (Milenic DE, 2000).

Cependant, compte tenu des faibles parcours dans les tissus des rayonnements particuliers, les cibles idéales pour la RIT sont les tumeurs de petites tailles, voire provenant de maladie résiduelle, qui sont disséminées dans l'organisme et qui sont peu ou pas accessibles à l'irradiation externe ou à la chirurgie.

1.2. Le radioimmunoconjugué.

1.2.1 Structure et caractéristiques des immunoglobulines.

Les anticorps (Ac) ou immunoglobulines (Ig) sont des glycoprotéines synthétisées et sécrétées par les lymphocytes B en réponse à une stimulation de molécules étrangères dites immunogènes (antigènes). Ces immunoglobulines

présentent des sites de fixation spécifiques vis-à-vis de l'antigène, permettant ainsi la formation de complexes immuns antigène-anticorps qui seront reconnus par la cascade d'effecteurs cellulaires du système immunitaire (lymphocytes, monocytes, cellules *natural killer*, macrophages).

Il existe 5 classes d'immunoglobulines ayant chacune des fonctions particulières (Tableau 1). Les anticorps utilisés pour l'immunociblage sont majoritairement d'isotype IgG.

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Poids moléculaire (kDa)	150	170	900	175	195
½ vie plasmatique (h)		24	6	5	3 2,3

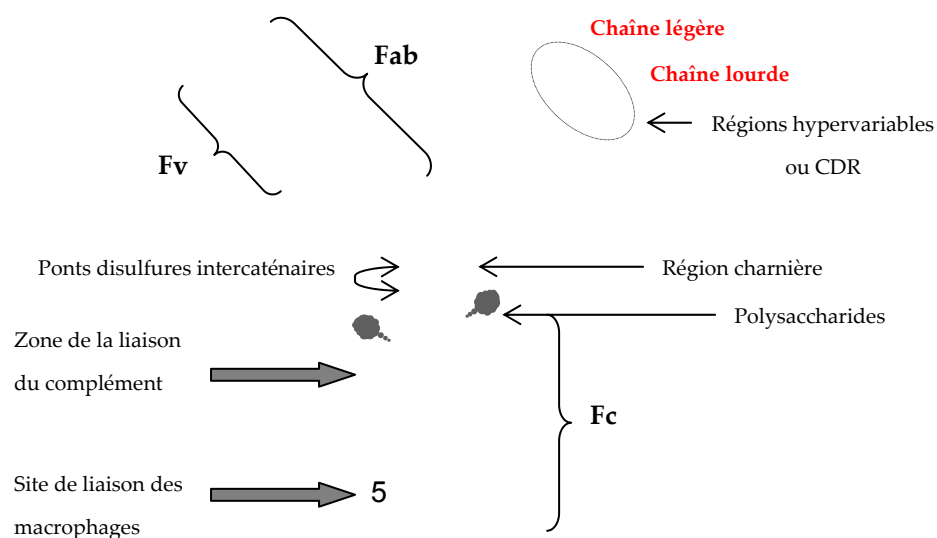
Tableau 1. Caractéristiques des différentes classes d'immunoglobulines. (Sharkey RM, *et al.* 2005)

Ces anticorps sont constitués d'un enchaînement d'acides aminés liés par liaisons peptidiques. La structure de base des Ig (Figure 3) se compose de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes légères (L ou Light) de 25 kDa constituées chacune d'environ 220 acides aminés et de deux chaînes lourdes (H ou Heavy) de 50 kDa constituées chacune d'environ 440 acides aminés. Les chaînes H et L sont liées entre elles par des ponts disulfures dits "intercaténaires", dont la réduction chimique n'altère généralement ni l'organisation de la molécule ni son activité. Il en est tout autrement des ponts "intracaténaires", internes à chaque chaîne, extrêmement difficiles à réduire, mais essentiels au repliement et à l'activité des Ig.

Trois régions distinctes caractérisent un anticorps :

- ♦ une partie contenant trois "segments hypervariables" qui forme le site de fixation à l'antigène. Les régions hypervariables sont appelées aussi régions déterminant la complémentarité (CDR), car elles déterminent la spécificité des anticorps.
- ♦ une zone charnière qui permet une variation rapide de l'angle délimité par les deux fragments Fab.
- ♦ une partie constante incluant le fragment Fc (Fragment cristallisable), appelée ainsi pour sa tendance à cristalliser *in vitro*.

Parmi les cinq types d'immunoglobulines, la différence se trouve essentiellement selon le type de chaîne lourde (γ pour les IgG, α pour les IgA, μ pour les IgM, δ pour les IgD, ϵ pour les IgE). Les chaînes légères sont identiques pour toutes les classes.



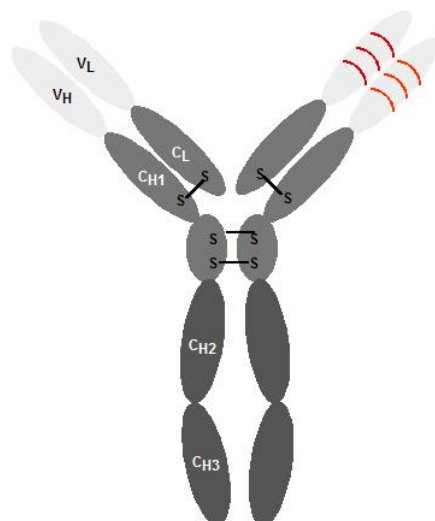


Figure 3. Structure d'un anticorps (IgG).

Les premiers anticorps ont été extraits de sérums de mammifères immunisés. Les Ac ainsi produits étaient dirigés contre différents épitopes de l'Ag à l'origine de l'immunisation. Ils étaient donc composés d'une population hétérogène d'anticorps (Ac polyclonaux) dont l'affinité et la spécificité pouvaient varier de façon significative d'une source à l'autre. Depuis la découverte de la technique des hybridomes développée en 1975 par Köhler et Milstein ([Köhler G, et al. 1975](#)), la production sur lignées cellulaires permet d'obtenir des Ac monoclonaux (AcM) en quantité pratiquement illimitée (Figure 4). Cette méthode consiste à isoler les lymphocytes présents dans la rate de souris immunisées avec un antigène tumoral humain. Ces lymphocytes sont ensuite fusionnés avec des cellules de myélome murin (cellules cancéreuses de souris). Ces AcM sont homogènes car ils sont synthétisés par une population de cellules identiques (clones).

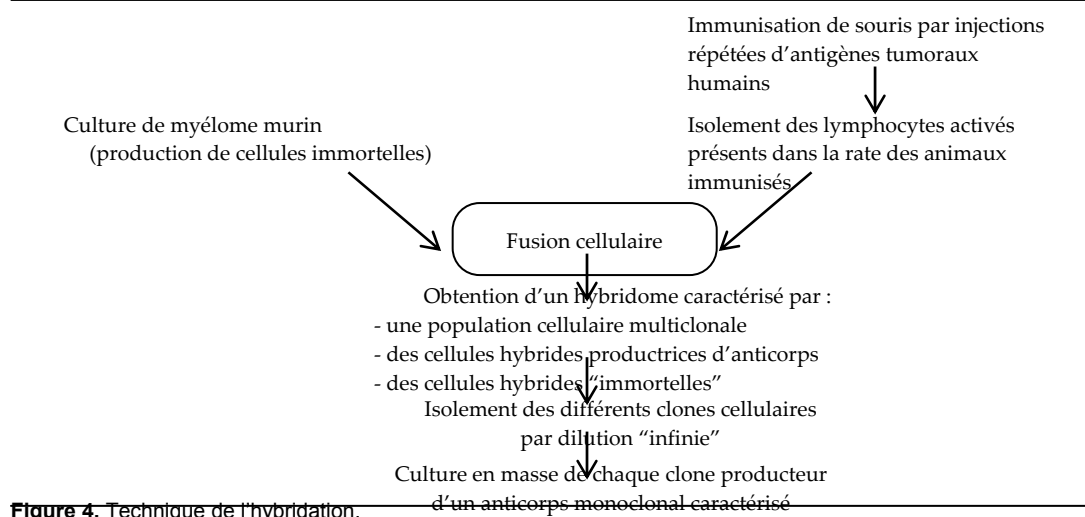


Figure 4. Technique de l'hybridation.

I.2.2 Les anticorps utilisés en RIT

A la fin du 19^{ème} siècle, Paul Ehrlich a créé le concept de "*magic bullets*" qui serait capable de cibler des molécules et ainsi d'éradiquer des maladies ([Ehrlich P, et al. 1904](#)). Mais ce n'est qu'à partir des années 50 que cette idée a été effectivement explorée avec un anticorps couplé à un radionucléide ([Pressman D, et](#)

al. 1948). Dans les années 60, les premières applications des AcM ont été réalisées afin de délivrer sélectivement des doses thérapeutiques d'irradiation à la tumeur (Bale WF, *et al.* 1960).

Les chercheurs ont alors mis en évidence les différents problèmes engendrés par l'utilisation d'AcM en radioimmunothérapie. Les doses d'irradiation délivrée à la tumeur chez le patient avec un AcM sont en effet insuffisantes pour avoir un effet significatif sur la croissance des cellules tumorales. Le temps de circulation trop élevé dans le sang des AcM radiomarqués engendre également de sérieuses complications sur les tissus sains (McCardle RJ, *et al.* 1966). Suite à des études précliniques et cliniques, il est apparu que les principales barrières qui empêchaient une bonne utilisation des AcM radiomarqués étaient les suivantes :

- le développement d'Ac anti-anticorps de souris (HAMA : Human Anti-Murine Antibody).
- des doses d'irradiation délivrées à la tumeur inadéquates pour un effet thérapeutique.
- une clairance lente des AcM radiomarqués ou "radioimmunoconjugué" de la circulation sanguine entraînant une radiotoxicité importante par irradiation des tissus sains (principalement la moelle osseuse).
- une pénétration des AcM dans le tissu tumoral insuffisante.

Un des problèmes majeurs de l'utilisation des AcM murins pour la RIT est le développement chez le patient de réponse immunitaire HAMA. Ces anticorps apparaissent surtout en cas d'injection de quantité d'AcM murins supérieure au milligramme. La quantité d'anticorps qui doit normalement être vectorisée vers les tissus tumoraux est alors compromise après la seconde injection. Cette réponse immunitaire des HAMA est dirigée dans un premier temps contre le fragment Fc de l'AcM. Après plusieurs injections répétées d'AcM, la réponse immunitaire des HAMA change et se dirige plus spécifiquement vers la région hypervariable ou CDR de l'AcM. Une première approche pour pallier à cette réponse immunitaire HAMA est d'inclure dans les protocoles RIT des immunomodulateurs tels que la cyclosporine A, la deoxyspergualine ou la cyclophosphamide (Milenic DE, 2000).

La modification des AcM permet également de diminuer cette réponse immunitaire notamment en enlevant le fragment Fc de l'AcM. Les chercheurs se sont alors focalisés sur le développement de nouvelles molécules de synthèse à partir des AcM connus afin d'améliorer la biodistribution des Ac et de diminuer l'immunogénicité. Les premières approches de modification des AcM ont été faites par des techniques chimiques ou biochimiques et plus récemment par l'utilisation du génie génétique afin de générer des fragments d'Ac.

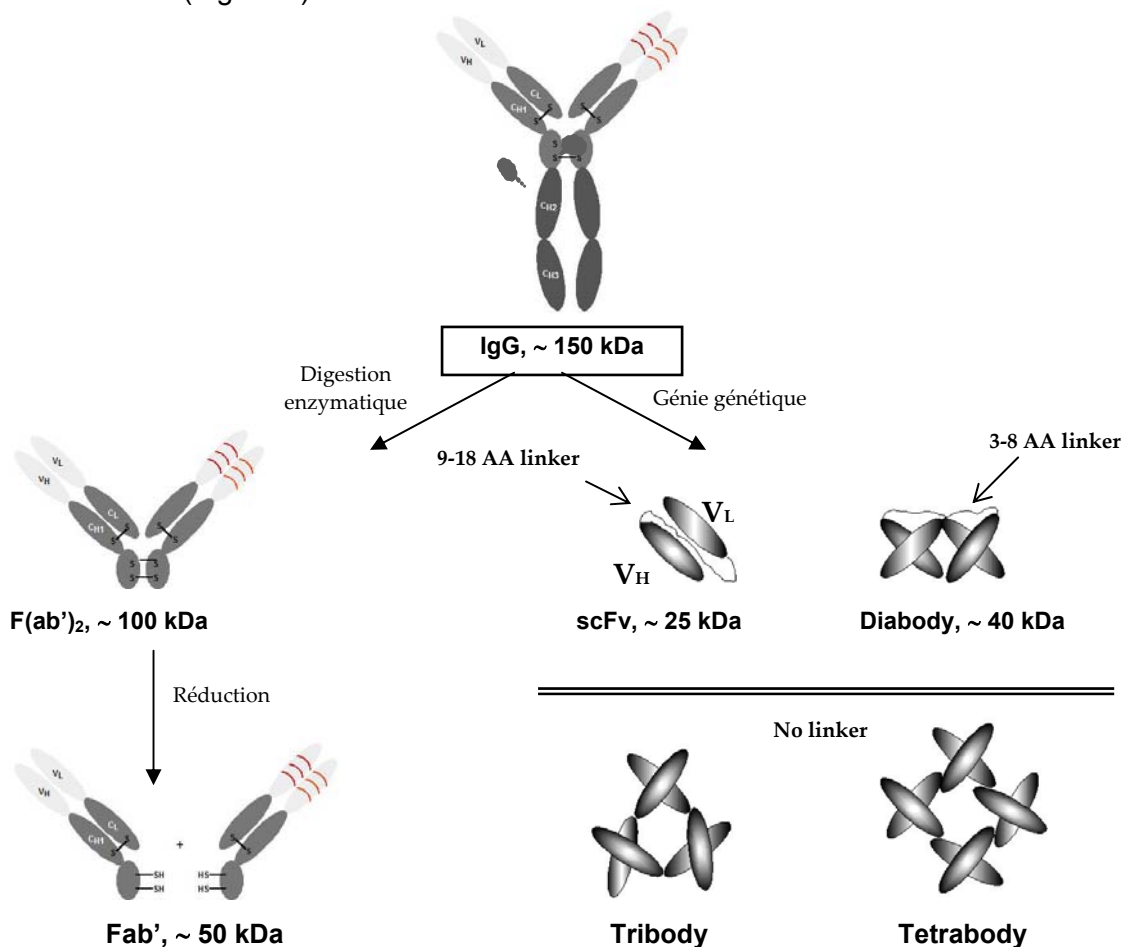
1.2.2.1. Ingénierie des anticorps : les fragments d'anticorps.

La forme de l'AcM, immunoglobuline (IgG) entière ou fragmentée, modifie son comportement dans l'organisme et son accès à la tumeur. Afin d'augmenter leur clairance, plusieurs fragments et sous-fragments d'Ac radiomarqués ont été envisagés (Figure 5). (Milenic DE, 2000 ; Huhlov A, *et al.* 2004) Les fragments bivalents $F(ab')_2$ et monovalents Fab' (pour "antigen binding"), obtenus par digestion enzymatique, soit par la pepsine ou la papaïne, sur un Ac entier IgG, ont une excellente pénétration tumorale. L'avantage des fragments $F(ab')_2$ par rapport à une IgG entière est la diminution de l'immunogénicité due à la partie Fc, une diffusion plus rapide vers la tumeur avec un pouvoir pénétrant amélioré. Les fragments Fab' conservent leur capacité de reconnaissance vis-à-vis de l'antigène mais présente une cinétique rapide de dissociation de l'interaction antigène-anticorps. Ils sont donc

plutôt préconisés à des fins diagnostiques plus que thérapeutiques où une rétention maximale au niveau de la cible est requise.

Une autre étape dans la dissociation des AcM a conduit au fragment Fv par technologie recombinante (Milenic DE, 2000). Une grande variété de ce fragment Fv est produite à partir de *E. Coli* (Pluckthun A, 1994) ou de cellules de myélome (Reichmann L, et al. 1988). Le fragment Fv est constitué des domaines variables V_L et V_H de l'AcM. L'association entre les deux domaines est non-covalente et par conséquent fragile. Le fragment Fv se dissocie en présence de protéines et est instable à température physiologique. Pour obtenir des fragments Fv stables, des modifications chimiques ont été faites en additionnant un cross-linker entre les domaines V_L et V_H . L'addition d'un linker peptidique a permis d'obtenir une forme appelée scFv, *single chain Fv*. Ce fragment d'anticorps scFv a démontré plusieurs avantages par rapport aux IgG entières, $F(ab')_2$ et Fab'. La pharmacocinétique des scFv et leur clairance des tissus normaux sont rapides. Pour des applications thérapeutiques, une clairance rapide diminue l'exposition aux radiations des tissus normaux. Les scFv diffusent également plus rapidement au niveau de la tumeur, plus profondément et avec une distribution plus homogène ce qui permet de délivrer une dose d'irradiation plus importante et d'engendrer une lésion au niveau de la tumeur. Néanmoins, en raison de sa rapide pharmacocinétique, la quantité totale qui va s'accumuler au niveau de la tumeur est plus faible. Ce fragment scFv est un candidat intéressant pour la RIT utilisant des radionucléides avec des temps de demi-vie courts, notamment avec les émetteurs alpha (McDevitt MR, 1998).

L'isolement du fragment scFv et sa stabilisation par des linkers peptiques ont permis la construction de différentes molécules : bi-scFv ou "diabodies", "tribodies", "tetrabodies" (Figure 5).



~ 80 kDa

~ 105 kDa

Figure 5. Représentation schématique de différentes formes d'anticorps préparés par digestion enzymatique ou par génie génétique.

Les propriétés pharmacocinétiques des principaux fragments d'Ac sont résumées dans le Tableau 2. Contrairement aux fragments $F(ab')_2$ et Fab' qui ont été fréquemment utilisés chez les patients, peu de résultats cliniques ont été obtenus pour les fragments synthétisés par ingénierie moléculaire. Par conséquent, les résultats de biodistribution et de ciblage cités dans le Tableau 2 reflètent les résultats obtenus sur des modèles animaux.

	IgG	$F(ab')_2$	Fab'	Diabody	ScFv
Poids moléculaire (kDa)	150	100	50	40	25
$\frac{1}{2}$ vie plasmatique	2-3 j	1 j	heures	heures	heure
Voie d'élimination principale	Foie	Foie	Rein	Rein	Rein
Intensité de la capture tumorale (1 = élevée, 4 = plus faible)	1	2	3	3	4
Durée de la capture tumorale (1 = plus longue, 4 = plus courte)	1	2	3	3	4

Tableau 2. Propriétés pharmacocinétiques des Ac et des fragments (d'après Sharkey RM, *et al.* 2005 ; Goldenberg DM, *et al.* 2006).

Du fait de leur plus faible taille, les fragments permettent, grâce à une meilleure pénétration tumorale et à une cinétique plasmatique plus rapide, d'augmenter le contraste au niveau de la tumeur et de diminuer le caractère immunogène dû au fragment Fc de l'IgG. Cependant, leur utilisation présente des inconvénients. Le temps de résidence tumoral, qui est primordial pour délivrer une dose thérapeutique, décroît avec la taille du fragment de l'IgG. De plus, le problème majeur que l'on retrouve lors de l'utilisation de fragments d'AcM, et plus particulièrement ceux qui ont un poids moléculaire < 50 000 Da, est une toxicité rénale importante (Sharkey RM, 2005). Cette rétention rénale est due à une réadsorption des fragments d'AcM après filtration glomérulaire (Yokota T, *et al.* 1993). Après dégradation du radioimmunoconjugué, les métabolites sont soit excrétés (dans le cas de l'iode) ou soit retenus dans les lysosomes des cellules rénales (dans le cas des métaux lourds tels que ^{90}Y et ^{177}Lu). L'administration d'acides aminés basiques tels que la lysine ou l'arginine avant ou avec le fragment d'AcM est une méthode efficace qui permet d'améliorer l'excrétion rénale des radioimmunoconjugués (Milenic DE, 2000).

1.2.2.2. Ingénierie des anticorps : les anticorps chimériques ou humanisés.

Le problème majeur rencontré en clinique après injection d'AcM murins est l'apparition chez le patient d'anticorps anti-souris HAMA ("Human Anti-Mouse Antibodies"). Quand ils sont produits, les anticorps humains anti-souris HAMA sont présents dans la circulation sanguine, parfois à haute concentration, et forment des immuns complexes avec les anticorps murins s'ils sont réinjectés. Ces immuns complexes sont éliminés par le système réticulo-endothélial (foie principalement) et limitent ainsi considérablement le ciblage des tumeurs par les anticorps radiomarqués. En pratique, la radioimmunothérapie est le plus souvent limitée à une

seule injection alors qu'il serait nécessaire de multiplier ces injections pour délivrer une dose tumorale cumulée qui puisse être tumoricide.

Afin de réduire cette production de HAMA, des techniques récentes d'ingénierie des anticorps permettent de remplacer les régions constantes des molécules d'anticorps de souris par des régions constantes d'origine humaine. On obtient ainsi par des technologies d'ADN recombinant des anticorps chimériques (Figure 6) (65% d'origine humaine et 35% d'origine murine) dont l'immunogénicité est substantiellement réduite par rapport à celle des AcM d'origine murine.

Il est également possible de produire des anticorps dits "humanisés" (Figure 6) qui sont composés des régions hypervariables des anticorps de souris (sites de reconnaissance) intégrées dans la structure d'un anticorps humain.

L'immunogénicité de ces anticorps humanisés est encore réduite par rapport à celle des anticorps chimériques, mais parfois au prix d'une perte significative d'affinité.

(Morrison SL, *et al.* 1984 ; Jones PT, *et al.* 1986 ; Qu Z, *et al.* 2005)

Des avancées plus récentes ont permis le développement d'AcM entièrement humains (Figure 6) qui sont actuellement inclus dans des essais cliniques. (Moroney S, *et al.* 2005) La production de ces anticorps est rendue possible à l'aide de deux technologies : l'utilisation de souris transgéniques dont les gènes codent pour une grande partie du répertoire des IgG humaines ; ou bien, par la méthode du "phage-display" qui consiste à exprimer un répertoire d'anticorps à la surface de phages filamenteux et à sélectionner des fragments en fonction de leur affinité pour un antigène.

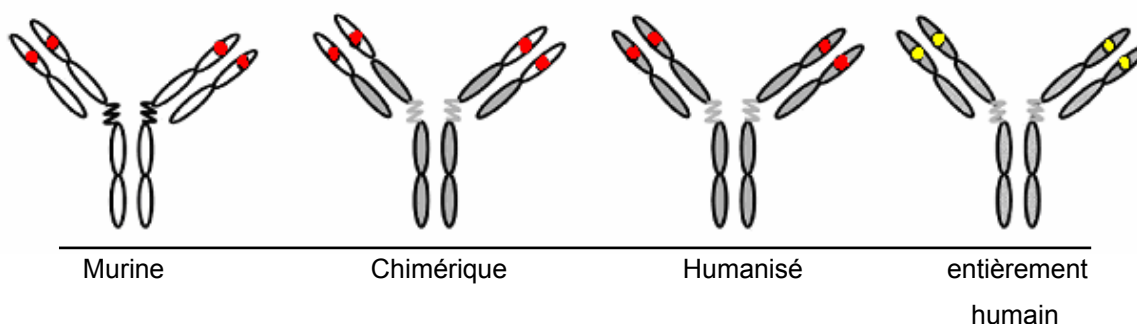


Figure 6. Représentation schématique de l'ingénierie des AcM.

1.2.2.3. Ingénierie des anticorps : les anticorps monoclonaux bispécifiques.

Les AcM bispécifiques (bsmAb : bispecific monoclonal antibody) sont des immunoglobulines de synthèse qui possèdent deux spécificités sur deux sites distincts. (Cao Y, *et al.* 1998 ; Carter P. 1995 ; Carter P. 2001) Ils doivent être suffisamment petits pour pénétrer dans la tumeur, mais de taille suffisante pour avoir une demi-vie biologique satisfaisante. En RIT, les bsmAb sont utilisés dans des systèmes de ciblage en deux temps qui seront décrit ultérieurement.

Il existe différents moyens de production de ces anticorps bispécifiques. Ils ont été générés dans un premier temps en 1961 par des méthodes chimiques. (Nisonoff A, *et al.* 1961 ; Cook AG, *et al.* 1994) Ceci implique la dissociation de deux anticorps différents puis la réassociation de deux moitiés distinctes. Dans un premier temps, le fragment $F(ab')_2$ est obtenu par digestion enzymatique (pepsine) d'une IgG intact. Ce fragment $F(ab')_2$ est ensuite réduit par action de la cystéamine sur les ponts disulfures pour conduire à l'obtention du fragment Fab'. Enfin, les fragments Fab'

provenant de deux anticorps différents sont couplés chimiquement par l'intermédiaire du bismaléimide. Chacune de ces étapes nécessite des étapes de purification. La production d'anticorps bispécifiques par voie chimique est relativement longue et offre de très faibles rendements. La synthèse sur support solide permet d'améliorer ces rendements et d'éviter des étapes de purifications fastidieuses (Glennie MJ, *et al.* 1987 ; DeSilva BS, *et al.* 2000 ; DeSilva BS, *et al.* 1995). Le principal inconvénient de cette méthode est la dénaturation des protéines qui peut conduire à une perte d'immunoréactivité.

Une autre méthode de production des bsmAb par hybridation somatique consiste à fusionner deux hybridomes. Cette méthode d'hybridation somatique est apparue en 1973. (Cotton RG, *et al.* 1973) Elle consiste à fusionner deux hybridomes pour former un hybridome hybride ou quadrome. L'anticorps bispécifique est ensuite synthétisé, assemblé et sécrété de la même manière qu'une IgG native. Les bsmAb produits biologiquement présentent des caractéristiques similaires qu'une IgG native en termes de stabilité et de pharmacocinétique. (Songsivilai S, *et al.* 1990 ; Suresh MR, *et al.* 1986 ; Segal DM, *et al.* 2001 ; Chatal JF, *et al.* 1995) L'anticorps est séparé des anticorps monoclonaux parents par des méthodes chromatographiques relativement lourdes.

L'assemblage chimique ou la méthode par fusion cellulaire génèrent un mélange hétérogène ce qui implique des méthodes de séparations relativement lourdes pour isoler la forme bispécifique des autres agrégats. Les techniques d'ingénierie génétique peuvent pallier ce problème. (Pluckthun A, *et al.* 1997) Les formes de bsmAb ainsi générés les plus prometteuses sont sous forme de "scFv" et de "diabodies". (Holliger P, *et al.* 1993)

Pour que des IgG ou des fragments d'IgG soient considérés comme "radioimmunoconjugué", cela nécessite la fixation de radionucléide, soit directement soit par l'intermédiaire d'agents chélatants. Ce point important est développé dans le paragraphe suivant.

I.2.3. Couplage du radionucléide à l'anticorps.

Les anticorps étant constitués par un enchaînement d'acides aminés, ils possèdent de nombreuses fonctions organiques libres. Suivant la nature et la réactivité de ces fonctions, des réactions de couplage anticorps / structures chélatantes peuvent être envisagées. Les groupements amines, thiols et acides sont les fonctions les plus nombreuses. Afin d'éviter un relargage prématuré du radionucléide, la liaison radionucléide / anticorps doit être la plus solide possible. De nombreux bras de liaison ont ainsi été testés (Tableau 3).

Fonction sur l'anticorps	Fonction réactionnelle du ligand	Liaison obtenue	Stabilité de la liaison	Utilisation en pratique courante
Ac-COOH	- Alcool - Amine	Ac-COO-R Ac-CO-NH-R	faible bonne	exception
Ac-NH₂	- Aldéhyde - Anhydride - Bromoacétamide - Chlorure d'acide - Ion diazonium - Ester activé (NHS) - Sulfonique - Isothiocyanate	Ac-N=CH-R Ac-NH-CO-R Ac-NH-CH ₂ -CO-R Ac-NH-CO-R Ac-NH-N=N-R Ac-NH-CO-R Ac-NH-SO ₂ -R Ac-NH-CS-NH-R	faible bonne bonne bonne faible bonne bonne bonne	exception utilisé utilisé peu utilisé plus utilisé très utilisé exception très utilisé

Ac-NH-CO-R (modification de NH ₂ ; R = maléimide)	- Thiol	Ac-thioéther-R	bonne	très utilisé
Ac-SH (cystéine, réduction ou modification des NH ₂)	- Anhydride - Bromoacétamide - Disulfure - Double liaison activée : maléimide	Ac-S-CO-R Ac-S-CH ₂ -CO-R Ac-S-S-R Ac-thioéther-R	faible bonne faible bonne	peu utilisé peu utilisé peu utilisé utilisé
Ac-CHO (modification des OH par le périodate)	- Amine - Semicarbazide - Thiosemicarbazide	Ac-CH ₂ -NH-R Ac-CH=N-NH-CO-R Ac-CH=N-NH-CS-R	bonne bonne bonne	peu utilisé peu utilisé peu utilisé

Tableau 3. Principales fonctions de couplage, naturelles ou modifiées chimiquement, présentes sur un anticorps.

Toutefois, la stabilité de la liaison anticorps-ligand peut s'avérer être un problème, lorsque la pharmacocinétique du vecteur est à l'origine d'une fixation importante de la radioactivité dans le système réticulo-endothélial (notamment le foie). En effet, après injection intraveineuse, les anticorps radiomarqués sont captés en forte quantité (10 à 20% ID/g) et de façon non spécifique au niveau hépatique. (Boyle CC, *et al.* 1992 ; Thédrez P, *et al.* 1989) Si la majeure partie de cette fixation est associée à un pool extravasculaire, une partie non négligeable de cette fixation est due à une internalisation des anticorps, qui sont ainsi exposés aux enzymes intracellulaires. (Thédrez P, *et al.* 1989)

Compte tenu de ce phénomène, un concept a été développé pour diminuer cette fixation hépatique qui limite la localisation des tumeurs situées dans cette zone en immunoscintigraphie et les doses administrables par voie systémique en radioimmunothérapie.

Ce concept consiste à introduire entre l'anticorps et le ligand bifonctionnel permettant l'introduction du radioisotope d'intérêt, un chaînon métabolisable ou "linker", qui puisse être la cible d'enzymes hépatiques (Figure 7).

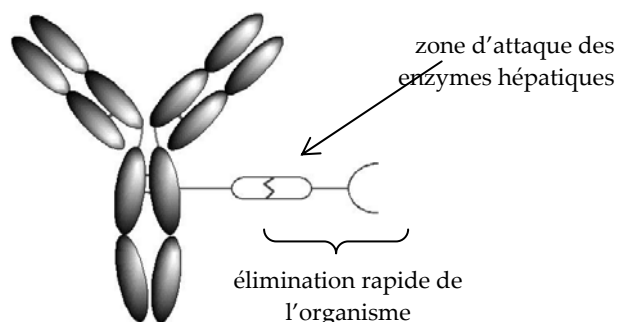


Figure 7. Principe de réduction de la fixation non spécifique des anticorps radiomarqués par introduction de chaînons métabolisables.

Les résultats obtenus ont montré des diminutions significatives de la radioactivité hépatique par rapport aux mêmes cages chélatantes mais dépourvues de chaînons intermédiaires métabolisables (Haseman MK, *et al.* 1986 ; Meares CF, *et al.* 1988 ; Gestin JF, *et al.* 1993).

Les principaux chaînons bifonctionnels qui ont été utilisés dans ce but sont représentés dans le schéma suivant (Figure 8). (Haseman MK, *et al.* 1986 ; Paik CH, *et al.* 1989 ; Arano Y, *et al.* 1991)

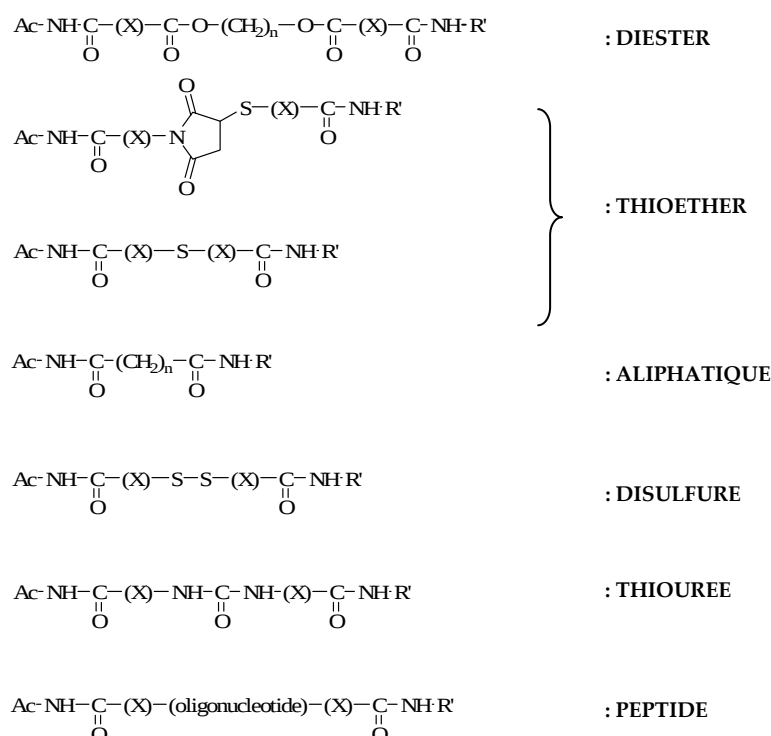


Figure 8. Structure des principaux chaînons métabolisables par les enzymes hépatiques.

1.3. La cible antigénique.

Idéalement, l'Ag ciblé doit être non sécrété, exprimé fortement, de façon constante et homogène à la surface des cellules cancéreuses, à l'exclusion d'autres tissus. En fait, les Ag, sauf exceptions, ne sont pas spécifiques d'une tumeur. Ils peuvent être exprimés de façon physiologique par certains tissus ou au cours de processus pathologiques variés. Toutefois, la cellule cancéreuse peut les exprimer en concentration beaucoup plus importante. Il s'agit donc d'une spécificité "quantitative" la plupart du temps. De plus, l'expression varie entre les cellules d'une même tumeur et entre deux masses tumorales chez un même individu, par exemple, la tumeur primitive et une métastase.

Différentes classes d'Ag tumoraux ont été étudiés pour la RIT :

- des Ag oncofœtaux comme l'Ag carcino-embryonnaire (ACE) ou l'alphafoetoprotéine (AFP) ;
- des récepteurs de facteurs de croissance comme HER2/neu ;
- des marqueurs de différenciation des carcinomes comme MUC-1 ;
- des marqueurs de différenciation des leucocytes comme CD20 ou le CD22...

La localisation de l'Ag doit être prise en considération, notamment pour le choix du radionucléide. En effet, s'il se situe au niveau du noyau cellulaire, un émetteur avec un petit parcours est adapté pour obtenir un dépôt d'énergie maximal au niveau du noyau. Mais, dans ce cas, se pose le problème de l'accessibilité de l'Ag. Au contraire, si l'Ag est exprimé sur la membrane cellulaire, un émetteur avec un parcours plus long semble préférable. La quantité d'Ag présente dans la circulation

peut aussi théoriquement modifier le comportement pharmacocinétique de l'AcM et l'efficacité de la RIT.

La capacité du complexe Ag-AcM à induire une endocytose est également à prendre en compte. Les AcM internalisés sont dégradés en petits peptides ou en acides aminés qui sont sécrétés par la cellule. Mais au cours de cette dégradation, les métaux et les radionucléides chargés restent piégés dans le milieu intra-cellulaire (cas de ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{225}Ac ...). Ce n'est pas le cas de l'iode qui est sécrété sous la forme d'iodo-tyrosine et qui subit une deshalogénéation in vivo. Le temps de rétention et la dose dans la tumeur sont alors moindres. Ainsi, un AcM marqué à l'yttrium-90 subira une dégradation enzymatique intra-cellulaire, mais contrairement à l'iode, il restera dans la cellule.

1.4. Choix du radionucléide.

Les radioéléments utilisés pour le ciblage des tumeurs peuvent être classés en deux grandes familles : les halogènes et les métaux. La Figure 9 fait apparaître les principaux éléments de la classification périodique ayant un potentiel intéressant pour la médecine nucléaire.

Les effets de la RIT dépendent des propriétés physiques (nature du rayonnement, énergie, parcours, période physique), de la structure chimique et du comportement biologique du radionucléide. Ces paramètres modifient la biodistribution et déterminent les doses d'irradiation (quantités d'énergie déposées par gramme de tissu). Le choix du radioélément doit être discuté en fonction du contexte global de la thérapie, notamment la nature, la situation et les dimensions de la cible à détruire, le type de vecteur utilisé, la fixation absolue du radiotraceur sur la cible et le rapport de fixation cible sur organes sains ([Bardiès M, et al. 1998](#)). Selon Mausner, ([Mausner LF, et al. 1993](#)) la sélection des radionucléides peut se faire en fonction de critères physico-chimiques, du mode de production et des paramètres biologiques relatifs à l'utilisation.

The periodic table shows the following decay types for various elements:

- Beta decay (solid black):** Sc, Y, La, Ac, Tc, Rh, Pd, Cu, In, Tl, Pb, Bi, At, Dy, Ho, Yb, Lu.
- Positron decay (dotted):** C, N, O, F, P.
- Gamma decay (diagonal lines):** Cu, In, At.
- Alpha decay (cross-hatch):** Rb, Sr, Ac.

Legend:

- bêta
- positon
- gamma
- alpha

Figure 9. Principaux radioéléments de la classification périodique. (modifications apportées au tableau de Jurisson S, *et al.* 1993)

I.4.1. Critères de sélection physico-chimiques.

1.4.1.1. Période physique.

Il faut que la période physique du radioélément soit en rapport avec la cinétique de fixation et de rétention du vecteur utilisé. Autrement dit, la période physique du radioélément et le temps nécessaire au vecteur pour avoir une concentration maximale au sein de la tumeur doivent être compatibles afin d'optimiser leur action. Une période trop courte entraînera un nombre élevé de désintégrations à l'extérieur de la cible, avant que le vecteur radiomarqué n'ait pu se fixer sur sa cible, et donc conduira à un rapport tumeur sur tissus sains défavorable. A l'inverse, une période trop longue conduira à une activité spécifique faible, et donc pour une même activité injectée, à un débit de dose plus faible que celui délivré par un radioélément dont la période physique est plus courte. Une grande partie de la dose injectée sera éliminée par le corps avant même d'avoir irradié la cible. Pour un anticorps marqué, une période physique supérieure à la demi-vie de distribution (T_{α}) mais inférieure à la demi-vie d'élimination (T_{β}) semble être un bon compromis (entre 12 heures et 3 jours) (Mausner LF, *et al.* 1993).

1.4.1.2. Type de rayonnements utilisés pour la RIT.

✖ Emissions particulières.

L'efficacité de la RIT provient essentiellement des rayonnements particuliers émis par les radionucléides fixés sur le vecteur. Ces rayonnements transfèrent de l'énergie à la matière sur toute la distance qu'ils parcourent (TEL ou transfert d'énergie linéique). Selon leur nature, les TEL sont variables et généralement plus fort en fin de parcours. Les radioéléments sont classés en trois familles.

♦ **Les émetteurs Auger** (radioéléments qui se désintègrent par capture électronique ou conversion interne) ont un transfert d'énergie linéique (TEL) élevé sur les premiers nanomètres de leur trajectoire (Sastry KSR. 1992). Leur effet tumoricide dépend donc de la proximité du rayonnement vis-à-vis de l'ADN de la cible. A distance du point d'émission, le comportement des émetteurs Auger rejoint celui des émetteurs β^- , à faible TEL. Par contre, si la vectorisation utilisée permet leur internalisation au sein de la molécule d'ADN de la cible, la toxicité sera alors importante et l'efficacité maximale. L'utilisation de tels radioéléments ne se conçoit donc que s'il y a internalisation du radioconjugué, ce qui n'est pas toujours le cas quand le vecteur est un anticorps.

♦ **Les émetteurs alpha (α).** Ce sont les rayonnements possédant le plus grand TEL. Autrement dit, ces éléments possèdent un rayonnement très ionisant mais peu pénétrant. Ils délivrent une dose importante de radioactivité sur une faible distance, de l'ordre de 6 à 7 MeV sur 40 à 80 μm . Cette forte énergie délivrée permet d'utiliser les radioéléments émetteurs alpha à des doses plus faibles que leurs homologues bêta, pour un même effet thérapeutique.

Toutefois, dans le cas d'une distribution hétérogène du vecteur, le faible pouvoir pénétrant des émetteurs α entraînera une forte hétérogénéité de la dose délivrée à la cible. L'implication immédiate est que la distribution de tels radioéléments doit être hautement homogène pour irradier l'ensemble des cellules cibles (Wheldon TE, *et al.* 1993), ce qui limite leur utilisation à des cibles de très petite taille voire aux cellules isolées, à condition que l'on soit capable de cibler l'ensemble des cellules à détruire (Chatal JF, *et al.* 1999). Les AcM radiomarqués avec des émetteurs alpha pourraient permettre de cibler les cellules tumorales de petite taille en limitant l'irradiation des cellules saines. Mais leur toxicité est importante et le radiomarquage des Ac avec les émetteurs alpha est délicat, la quantité d'énergie émise lors de leur désintégration pouvant entraîner la radiolyse du radioimmunoconjugué. Pour ces raisons, seuls quelques émetteurs α ont été proposés comme candidats pour la RIT et leur utilisation est encore au stade de la recherche (Couturier O. *et al.* 2005).

♦ **Les émetteurs bêta (β^-).** Leur transfert d'énergie linéique est plus faible que pour les particules alpha mais leur pouvoir pénétrant est plus important (de 100 μm à quelques mm). Les émetteurs β de différentes énergies peuvent être classés en trois catégories selon le parcours moyen des particules β qu'ils émettent :

- émetteurs β de faible énergie : parcours moyen < 200 μm ,
- émetteurs β de moyenne énergie : 200 μm < parcours moyen < 1 mm,
- émetteurs β de forte énergie : parcours moyen > 1 mm.

Ils offrent la possibilité de "tirs croisés", c'est-à-dire qu'il est possible d'envisager la destruction d'une cellule non ciblée par le vecteur radiomarqué du fait des émissions provenant de cellules adjacentes radiomarquées. Ce phénomène permet d'envisager l'augmentation de l'efficacité d'un traitement puisque seul, le ciblage d'un nombre suffisant de cellules permet l'irradiation de la zone à détruire. La diversité des radionucléides β disponibles permet alors d'orienter le choix en fonction des caractéristiques de la tumeur, et en particulier de sa taille.

✖ Emissions électromagnétiques associées.

Les émissions gamma (γ), associées à un grand nombre de désintégrations, ont un TEL faible. Le long parcours des photons gamma dans les tissus biologiques permet l'imagerie, quand les photons émis ont une énergie compatible avec la détection (100 à 400 keV, avec un maximum d'efficacité vers 150 keV). Toutefois l'existence d'une composante gamma, du fait de son pouvoir plus pénétrant, entraîne le dépôt à distance du point d'émission d'une fraction de l'énergie émise. Cela va diminuer l'effet thérapeutique et augmenter sensiblement l'irradiation des tissus sains (irradiation non-spécifique), réduisant par la même l'effet recherché par la vectorisation.

✖ Les isotopes de décroissance.

Il peut arriver que la désintégration de certains radioéléments conduise à un noyau fils instable et lui-même émetteur alpha ou bêta. L'instabilité de ce noyau fils peut provoquer des irradiations non voulues et incontrôlables. Elles peuvent notamment conduire à la rupture de la liaison vecteur-radioélément, augmentant par là-même la dose non-spécifique. En conséquence, seuls les radioéléments possédant un isotope de décroissance stable (non radioactif) ou ayant une très grande période physique peuvent être utilisés en radioimmunothérapie.

1.4.1.3. Critères chimiques.

Parmi les critères chimiques, on peut relever ceux se rapportant au radioélément et ceux relatifs au marquage du vecteur.

✖ Critères propres au radioélément.

L'activité spécifique du radioélément (MBq/mg) dépend de la méthode de production. Le mode de production est un critère primordial qui détermine non seulement la disponibilité au meilleur coût de l'isotope recherché, mais aussi sa pureté radiochimique et son activité spécifique. Ces deux derniers critères dépendent notamment du degré de pureté de l'élément dans la cible irradiée ainsi que des réactifs utilisés à tous les stades de production. Une contamination du radioélément par des ions métalliques entraînera des étapes de purification longues et souvent coûteuses afin d'éviter ultérieurement toutes compétitions pour les sites de complexation des ligands.

La méthode directe de production des radioéléments ne permet pas de séparer la cible du produit obtenu qui sont chimiquement identiques. Une telle méthode entraîne une faible activité spécifique non compatible avec une utilisation en radioimmunothérapie. En effet, dans le cadre d'une utilisation thérapeutique, on considère généralement qu'il faut pouvoir injecter un vecteur radiomarké dont l'activité est au moins égale à 1,8 GBq par traitement, ce qui implique qu'il faut atteindre des activités spécifiques de l'ordre de 100 GBq/mg (Mausner LF, *et al.* 1993).

La production des radioéléments est faite essentiellement par activation indirecte. Le bombardement d'une cible métallique pure par des protons, deutérons, particules alpha, conduit à la production d'un radioélément dont les propriétés chimiques sont différentes de celles du métal bombardé. Il est possible dans ces

conditions de séparer le radioélément de sa cible, le plus souvent par des systèmes d'extraction ou de chromatographies sur colonnes échangeuses d'ions. Ces réactions permettent l'obtention de produits sans entraîneur (No Carrier Added ou NCA) et permettent l'obtention de grande activité spécifique.

Quatre modes de production de radionucléides sont actuellement utilisés :

1. Le bombardement au moyen de particules électriquement neutres.

Ces particules électriquement neutres ou neutrons sont produites dans des réacteurs nucléaires. Ils ont une énergie très variable (de 0,05 eV pour les neutrons thermiques à 14 MeV pour les neutrons rapides) et induisent différents types de réactions nucléaires dans la production des radionucléides.

2. La séparation isotopique des produits issus de la fission de l'uranium.

Le bombardement de l'uranium-235 par des neutrons thermiques conduit par différentes chaînes de réactions successives à la formation de plus de 200 radionucléides. Certains de ces radionucléides comme le molybdène-99, l'iode-131 ou le xénon-133 sont isolés après plusieurs étapes de purification avec de très hautes activités spécifiques.

3. Le bombardement au moyen de particules chargées électriquement.

Les particules chargées sont accélérées par passages successifs dans des champs électromagnétiques linéaires (accélérateurs linéaires) ou circulaires (cyclotron).

4. La réalisation de générateurs isotopiques.

Certains radionucléides (isotopes père) conduisent par décroissance à d'autres radionucléides appelés isotopes fils. Le principe du générateur est de séparer l'isotope père de l'isotope fils sur une colonne chromatographique. L'isotope père fixé sur la colonne décroît en son isotope fils qui peut être élué dans des conditions appropriées. Ce mode de production permet d'obtenir des radionucléides sans entraîneur et permet l'utilisation de radionucléides de courte période.

✘ Critères chimiques relatifs au marquage du vecteur.

Les propriétés physico-chimiques des radioéléments sont étroitement corrélées à leur place dans le tableau périodique des éléments. Ces propriétés vont conditionner non seulement le mode de purification du radioélément mais aussi le radiomarquage du vecteur. Parmi les propriétés les plus importantes, on trouvera le caractère acide (dur ou mou), les rayons ioniques et covalents, les propriétés oxydo-réductrices.

L'introduction d'un radioélément dans l'organisme ne doit pas influencer les propriétés de reconnaissance du vecteur vis-à-vis des antigènes. Le nombre d'atomes radioactifs sur le vecteur devra distribuer une dose radioactive suffisante tout en évitant d'altérer les propriétés de reconnaissance du vecteur.

La stabilité est un autre point important. Il est primordial que le radioélément possède des propriétés chimiques lui permettant de se lier de manière stable au vecteur via une structure chélatante adaptée.

Récapitulatif des critères nécessaires :

 émetteur α , β^- ou Auger avec une composante γ assez faible

-  $T_{1/2}$ compris entre 10h et 3j
-  énergie élevée
-  isotope de décroissance stable
-  production facile et peu coûteuse
-  pureté radiochimique élevée et une activité spécifique de l'ordre de 100 GBq/mg.

Le tableau ci-dessous dresse une liste des caractéristiques physiques des radioéléments ayant un potentiel thérapeutique intéressant. (Schubiger PA, *et al.* 1996 ; McDevitt MR, *et al.* 1998)

Radionucléides	$T_{1/2}$	Type de radiation (énergie max. en MeV)	Pouvoir pénétrant maximal (mm)
⁶⁷ Ga	3,26 j	Auger, γ (0,09)	10
⁴⁷ Sc ^b	3,4 j	β^- (0,6) ; γ (0,159)	
⁶⁷ Cu ^b	2,58 j	β^- (0,54) ; γ (0,185)	1,8
¹⁵³ Sm ^a	1,95 j	β^- (0,8) ; γ (0,103)	3
¹⁰⁵ Rh	1,5 j	β^- (0,57) ; γ (0,319)	1,9
¹³¹ I ^a	8,02 j	β^- (0,6) ; γ (0,364)	2
⁷⁷ As	1,62 j	β^- (0,68) ; γ (0,239)	2,5
¹⁶⁶ Ho	1,1 j	β^- (1,6) ; γ (0,81)	2,2
¹⁷⁷ Lu ^a	6,71 j	β^- (0,497) ; γ (0,208)	1,5
⁹⁰ Y ^c	2,67 j	β^- (2,28)	12
¹⁸⁶ Re ^a	3,77 j	β^- (1,08) ; γ (0,131)	5
¹⁸⁸ Re ^d	16,95 h	β^- (2,13) ; γ (0,155)	11
²¹¹ At ^b	7,2 h	α (5,87) ; γ (0,08) ;	0,08
²²⁵ Ac ^e	10 j	α (6)	
²¹² Bi	1 h	α (6) ; β^- (0,492)	0,09
²¹³ Bi ^f	47 min	α (>6) ; β^- (0,444) ; γ (0,440)	< 0,1

Tableau 4. Propriétés physiques des radioéléments à potentiel thérapeutique. (d'après Volkert WA, *et al.* 1999)

^aRadionucléides produits par réacteur nucléaire. ^bRadionucléides produits par accélérateurs de particules. ^c Produit NCA à partir du générateur ⁹⁰Sr/⁹⁰Y. ^dProduit NCA à partir du générateur ¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re. ^eProduction à partir du générateur ²²⁹Th/²²⁵Ac. ^fProduction à partir du générateur ²²⁵Ac/²¹³Bi.

I.4.2. Les radionucléides utilisés en RIT.

émetteurs β^-

Les deux radioéléments les plus utilisés actuellement en RIT sont l'iode-131 et l'yttrium-90.

L'**iode-131** est le premier radioélément à avoir été utilisé dans le domaine de la radiothérapie métabolique et jusqu'à des temps assez récents, était le seul candidat disponible. Sa période physique est de 8 jours. Il possède une composante gamma très énergétique qui ne permet pas une imagerie de bonne qualité. Cette émission de photons γ entraîne le dépôt à distance des deux tiers de l'énergie émise par ce radioélément et oblige les patients à être soumis à des règles très strictes de radioprotection. Toutefois, sa grande disponibilité, à des prix raisonnables, des activités spécifiques satisfaisantes et la relative facilité de marquage en font tout de même une référence. Quand il est dissocié du vecteur, sa clairance rénale et

hépatique est généralement plus rapide que celle des métaux. Le marquage des Ac à l'iode-131 est le plus souvent réalisé de façon directe mais il pose des problèmes de désionisation *in vivo*, à l'origine d'une irradiation tumorale insuffisante lorsque l'Ag cible est internalisé.

L'**yttrium-90** est un émetteur β^- pur de forte énergie, ce qui implique moins de contraintes pour le patient. Sa production est réalisée à partir d'un générateur ($^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$). La période physique du ^{90}Sr est de 29 ans ce qui permet une utilisation à vie d'un tel générateur. Il décroît en zirconium-90 avec une période de 2,7 j. Son énergie est plus élevée que celle de l'iode-131 et 90 % de l'énergie est absorbée dans une sphère de 5,3 mm de diamètre (Wagner HN, *et al.* 2002). Ce parcours correspond à 100-200 diamètres cellulaires, ce qui permet à l'yttrium-90 d'atteindre les cellules non directement ciblées par le phénomène de "feu croisé". La liaison de l'yttrium-90 à l'AcM doit être solide car l'yttrium libre possède un fort tropisme pour l'os, ce qui peut entraîner une toxicité médullaire. Le marquage est effectué de façon indirecte par l'intermédiaire d'un agent chélatant bifonctionnel. Différents auteurs ont montré que le DOTA (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododecane-*N,N',N'',N'''*-tétraacétique) était l'agent chélatant macrocyclique le plus approprié et permettait d'obtenir les chélates les plus stables *in vitro* et *in vivo* avec l'yttrium-90, comparativement au DTPA (acide diéthylènetriamine pentaacétique) ou ses dérivés (Griffiths GL, *et al.* 2003).

Deux isotopes du **rhénium** (^{186}Re et ^{188}Re) ont également été testés en RIT. La chimie du rhénium est très proche de celle du technétium. Le rhénium-186 est un émetteur bêta de moyenne énergie avec une composante gamma en faible proportion (9,7%). (Breitz H, *et al.* 1992) Sa période de 3,8 jours est adaptée à la RIT. Son principal inconvénient est son mode de production par réaction (n, γ) qui impose un flux de neutrons particulièrement élevé pour obtenir une bonne activité spécifique. Le rhénium-188 peut être produit à partir d'un générateur ($^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$), ce qui permet d'obtenir des activités spécifiques élevées. C'est un émetteur bêta de forte énergie qui possède également une émission gamma permettant l'imagerie. Sa période relativement courte (17h) limite cependant son utilisation à des applications où la fixation du vecteur radiomarké peut être réalisée rapidement.

Le **cuivre-67** est un émetteur bêta ($T_{1/2} = 2,6$ j) de moyenne énergie avec une composante gamma permettant l'imagerie. (Deshpande SV, *et al.* 1988) Un des avantages de cet émetteur par rapport aux autres radiométaux est que le cuivre seul, dans le cas d'une dissociation avec le ligand, n'a pas de tropisme pour un organe particulier. Cependant, son coût de production est assez élevé. Le cuivre-67 peut être produit avec une bonne pureté radiochimique et une activité spécifique de l'ordre de 200 GBq/mg.

Quant au **lutétium-177**, si sa chimie se rapproche de celle de l'yttrium-90, sa période physique (6,7 j) est plus proche de celle de l'iode-131. Comme toutes les terres rares, il a tendance à se localiser dans l'os quand il est relargué dans la circulation. (Brouwers A, *et al.* 2002)

Enfin, le **samarium-153**, utilisé actuellement dans le cadre des traitements palliatifs des métastases osseuses, pourrait aussi être utilisé en RIT. C'est un émetteur bêta/gamma dont l'énergie bêta est comparable à celle de l'iode-131, mais dont la composante gamma, moins énergétique peut permettre l'imagerie. Le samarium-153 est une terre rare, qui peut être facilement complexée, mais la stabilité *in vivo* des complexes n'est pas bonne, ce qui entraîne une fixation non spécifique du samarium sur l'os, à proximité de la moelle osseuse (Bardiès M, *et al.* 1998).

✘ émetteurs alpha

Ils font l'objet de nombreuses recherches et sont prometteurs pour l'avenir. (Mulford DA, *et al.* 2005 ; McDevitt MR, *et al.* 1998 ; Chérel M, *et al.* 2006) Pourtant, seuls quelques émetteurs alpha ont été proposés comme candidats pour la RIT. (Wilbur DS. 1990 ; Macklis RM, *et al.* 1989. Zalutsky MR, *et al.* 2004) Ceci est dû principalement au faible nombre de ces émetteurs dont la désintégration conduit à un noyau fils stable. En effet, dans le cas où le noyau fils est instable et lui-même émetteur alpha ou bêta, ce qui se rencontre fréquemment pour les noyaux lourds ($Z > 82$), il est possible que la désintégration conduise à la rupture de la liaison vecteur-radioélément, permettant ainsi au noyau fils de diffuser librement dans l'organisme (redistribution), augmentant la dose non-spécifique.

Des essais ont été effectués avec deux isotopes du bismuth, le bismuth-212 et le bismuth-213 obtenus respectivement à partir d'un générateur de thorium-228 et d'actinium-225. Leur principal inconvénient est leur période physique très courte ainsi que l'émission d'un rayonnement gamma énergétique qui nécessite un blindage important du générateur. L'astate-211, produit de cyclotron, a été testé en RIT (Zalutsky MR. 2005). L'astate-211 est couplé aux AcM et aux fragments d'AcM par une méthode de marquage en deux temps via l'ester 3-(triméthylstannyl)-benzoate de *N*-hydroxysuccinimidyle. (Zalutsky MR, *et al.* 1989)

1.5. Applications cliniques.

Compte tenu des faibles parcours dans les tissus des rayonnements particuliers et de l'hétérogénéité de distribution de l'Ac radiomarqué dans la tumeur en fonction de sa taille, de sa vascularisation et de l'expression variable de l'antigène ciblé, les cibles idéales pour la RIT sont les tumeurs de petites tailles, voire des cellules isolées (maladie résiduelle), qui sont disséminées dans l'organisme et qui sont peu ou pas accessibles à l'irradiation externe ou à la chirurgie.

Par rapport aux tumeurs de grande taille, les cibles microscopiques ont la caractéristique de fixer une proportion d'anticorps radiomarqués beaucoup plus élevée (parfois d'un facteur de 10 à 20). Le niveau de fixation particulièrement élevé des microtumeurs est expliqué en partie par une néovascularisation relativement plus homogène que dans les tumeurs de grande taille.

Les évaluations cliniques réalisées avec de nombreux anticorps (Tableau 5), de nombreux radionucléides et dans de nombreuses indications ont conduit à des résultats contrastés, parfois prometteurs voire impressionnants comme dans le cas de tumeurs hématologiques, et en particulier les lymphomes malins non hodgkiniens (LMNH) réfractaires à la chimiothérapie. La RIT est en cours d'évaluation clinique pour le traitement de certaines tumeurs solides radiosensibles, comme les cancers bronchiques à petite cellule, ou à forte expression antigénique comme le cancer médullaire de la thyroïde. Des études pré-cliniques sont également en cours pour étudier l'efficacité de la RIT lorsqu'une administration locale est possible, comme la voie intrapéritonéale dans les cancers de l'ovaire ou la voie intrathécale dans les méningites carcinomateuses.

Generic Name	Trade Name	Agent/ Target	Cancer Indication	Approval
Unconjugated				
Rituximab	Rituxan	Chimeric anti-CD20 IgG ₁	B-cell lymphoma	1997
Trastuzumab	Herceptin	Humanized anti-HER2 IgG ₁	Breast	1996
Alemtuzumab	Campath-1H	Humanized anti-CD52	CLL†	2001
Cetuximab	Erbix	Chimeric anti-EGFR	Colorectal	2004

Bevacizumab	Avastin	Chimeric anti-VEGF	Head/Neck	2006
Radioconjugates			Colorectal	2004
Satumomab pendetide	OncoScint [*]	¹¹¹ In-murine anti-TAG-72 IgG	Colorectal, ovarian	1992
Nofetumomab merpentan	Verluma [*]	^{99m} Tc-murine anti-EGP-1 Fab [†]	SCLC‡	1996
Arcitumomab	CEA-Scan [*]	^{99m} Tc-murine anti-CEA Fab [†]	Colorectal	1996
Capromab pendetide	ProstaScint	¹¹¹ In-murine anti-PSMA	Prostate	1996
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	⁹⁰ Y-murine anti-CD20 IgG + rituximab	B-cell Lymphoma	2002
Tositumomab	Bexxar	¹³¹ I-murine anti-CD20 IgG + tositumomab	B-cell Lymphoma	2003

^{*}No longer commercially available.

[†]CLL = chronic lymphocytic leukemia.

[‡]SCLC = small cell lung cancer.

Tableau 5. Anticorps commerciaux utilisés dans la détection et le traitement des tumeurs. (Sharkey RM, *et al.* 2006).

I.5.1. Résultats dans les lymphomes malins non hodgkiniens (LMNH).

Le lymphome malin non hodgkinien (LMNH) est une application particulièrement intéressante de la RIT en raison de l'expression d'antigènes de différenciation bien caractérisés et d'une radiosensibilité élevée.

Deux principales formes médicamenteuses d'anticorps sont actuellement commercialisées et sont indiquées dans les formes réfractaires et résistantes de LMNH de bas grades folliculaires : ¹³¹I-tositumomab (Bexxar[®]) et ⁹⁰Y-ibritumomab (Zevalin[®]) (Brevets : Bexxar[®], 2002 et Zevalin[®], 2003). Ils comportent un Ac murin anti-CD20, antigène exprimé fortement à la surface des lymphocytes B normaux et malins.

Bexxar[®] utilise une IgG2a murine froide (non radiomarkée) associée au même AcM radiomarké à l'iode-131 par couplage direct du radionucléide à une tyrosine de l'IgG. Après injection, l'Ac est dégradé et il se produit une deshalogénéation de l'Ac, sous forme de ¹³¹I-iodotyrosine, ce qui va induire une accumulation au niveau thyroïdien, gastrique puis une élimination par voie rénale. (Dillman R. 2002)

Zevalin[®] est un anticorps murin radiomarké à l'yttrium-90 utilisé en association avec un Ac chimérique froid, le rituximab. Le marquage de l'Ac est réalisé par l'intermédiaire d'un agent chélatant dérivé du benzyl-DTPA, le tiuxetan. Très peu d'activité se retrouve dans les urines. (Dillman R. 2002)

La première injection d'anticorps froid est destinée à saturer rapidement les sites antigéniques CD20 des tissus normaux, en particulier ceux très accessibles et nombreux de la rate (organe très vascularisé). Lors de l'injection de l'AcM radiomarké, les sites antigéniques non tumoraux ne sont donc plus disponibles pour fixer les molécules de radioimmunoconjugué qui sont lentement et préférentiellement fixés par les sites tumoraux. Par ailleurs, la dose d'anticorps froid a une activité biologique propre et peut avoir une cytotoxicité par CMC (complement mediated cytotoxicity), ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) et par apoptose. (Goldenberg DM, *et al.* 1991. Buchsbaum DJ, *et al.* 1992. Kaminski MS, *et al.* 1993. Maloney DG, *et al.* 1994. Jazirehi AR, *et al.* 2005.)

Le **Bexxar[®]** a donné des taux de réponse globale de 65 à 71% (contre 28% pour la chimiothérapie) avec des activités non myélosuppressives ; et 86% avec des activités myélosuppressives qui ont nécessité la greffe autologue de cellules souches (Kaminski MS, *et al.* 2000). Les taux de réponse complète sont de 30 à 34%. Quant au **Zevalin[®]**, un taux de réponse objective de 80% et 30% de réponse complète ont été obtenues. (Witzig TE, *et al.* 2002)

I.5.2. Les effets indésirables.

Dans les deux cas, une toxicité dose-dépendante principalement au niveau de la moelle osseuse apparaît, entraînant ainsi une sévère myélosuppression, généralement réversible. La plupart des patients traités par Bexxar® et Zevalin® ont recours à une transfusion plaquettaire (respectivement 22% et 15%), d'érythropoïétine (respectivement 8% et 7%), ou de filgrastim (13% et 12%). (Sharkey RM, et al. 2005) Lorsque des doses myéloablatives sont utilisées, des greffes de moelle osseuse ou de cellules souches périphériques doivent être pratiquées. Les effets secondaires peuvent également apparaître à long terme. La probabilité de développer une leucémie myéloïde et/ou un syndrome myélodysplasique chez des patients atteints de LMNH et traités avec des doses myélosuppressives d'Ac radiomarqués est de 7,6% à 8 ans contre 8,6% à 7 ans pour la chimiothérapie à forte dose.

L'apparition de différents anticorps anti-souris (HAMA Human Anti-Mouse Antibodies / HACA Human Anti-Chimeric Antibodies / HAAHA Human Anti-Humanized Antibodies) après injection d'AcM peut dépasser 50%. Ce taux varie selon la nature de l'AcM (murin, chimérique ou humanisé), la forme (AcM entier ou fragmenté) et du nombre d'injections. Si la présence de ces Ac dans le sérum n'a pas à ce jour entraîné de manifestations cliniques décelables, elle a cependant trois inconvénients. Elle peut interférer dans les dosages immunologiques permettant le suivi du patient. Mais également, elle entraîne une modification de la biodistribution et du ciblage de l'Ac radiomarqué, rendant la possibilité d'injections répétées difficiles et l'efficacité du traitement incertaine.

I.5.3. Résultats dans les tumeurs solides.

I.5.3.1. Immunociblage direct

Plusieurs antigènes associés aux carcinomes de types histologiques variés ont été ciblés par des anticorps sous forme entière ou de fragments F(ab')₂. Cliniquement, différentes tentatives ont été réalisées sur les pathologies suivantes : cancers colorectaux, ovariens, pulmonaires à petites cellules, cancer médullaire de la thyroïde (CMT), adénomes prostatiques et cancers cérébraux. En termes d'efficacité, les réponses objectives ont été rares. Des résultats un peu plus encourageants ont été obtenus avec un anticorps anti-ACE (antigène carcino-embryonnaire) dans le traitement des récidives de cancer médullaire de la thyroïde. Mais actuellement aucun Ac radiomarqué n'a montré une efficacité suffisante pour traiter les tumeurs solides ou leurs métastases à un stade avancé. Ces résultats s'expliquent probablement par la taille importante des masses tumorales traitées (hétérogénéité de la biodistribution de l'AcM) et la radorésistance élevée de ces tumeurs. Dans tous les cas, ce sont encore les micrométastases qui représentent la cible privilégiée de la RIT.

1.5.3.1. Immunociblage indirect

Parallèlement à la nécessité de délivrer une dose tumorale élevée pour le traitement des tumeurs solides, il est également important de réduire au minimum la radiotoxicité des tissus normaux, en particulier celle de la moelle osseuse. Différentes techniques de ciblage en deux ou trois temps ont été développées afin de réduire l'accumulation de radioactivité dans les tissus normaux, tout en gardant la même spécificité qu'avec la technique conventionnelle en un temps. Ces techniques consistent alors à dissocier la pharmacocinétique de l'AcM de celle du radionucléide. (Boerman OC, *et al.* 2003 ; Sharkey RM, *et al.* 2005)

♦ Système avidine-biotine

Hnatowich en 1987 est le premier à introduire ce modèle. Ce système apparaît adéquate pour un préciblage du fait du couplage de 4 biotines par avidine avec une très haute affinité avidine-biotine (10^{-15} mol/L comparée à 10^{-8} mol/L pour l'affinité Ag-mAb). Deux approches ont été envisagées.

Dans la première méthode, ciblage en deux temps (Figure 10 (A)), la streptavidine [streptavidine (= avidine d'origine bactérienne et non glycosylée) et l'avidine (provient d'œuf de poule et glycosylée)] est couplée à une IgG, formant ainsi un immunoconjugué streptavidine-IgG d'environ 210 kDa. L'immunoconjugué streptavidine-IgG non radiomarké est ainsi injecté dans un premier temps. Pour une élimination rapide de l'excès d'immunoconjugué streptavidine-IgG circulant, une chasse est appliquée par injection d'un conjugué albumine-biotine avec un motif galactose. La présence de ce galactose va permettre une reconnaissance par les hépatocytes et par conséquent, une élimination rapide du sang de l'immunoconjugué en excès. Dans une seconde étape, une biotine radiomarkée est administrée. Des essais cliniques ont été expérimentés avec l'Ac NR-LU-10 dans le cancer colorectal et dans le cancer de la prostate. Des activités élevées de biotine marquée à l'yttrium-90 ont été injectées (jusqu'à 5,18 GBq/m²), sans avoir recours à la greffe de moelle, mais une toxicité intestinale et rénale importante a été observée (Breitz HB, *et al.* 2000).

Quant à la deuxième approche (Figure 10 (B)), elle consiste en une variation du système streptavidine-biotine en trois temps. Dans une première étape, un Ac biotinylé non radiomarké est injecté. Pour une élimination rapide de l'Ac biotinylé circulant, de l'avidine est injectée et parce que l'avidine est naturellement glycosylée, le complexe IgG-Biotine-avidine va être reconnu par les hépatocytes. Dans un deuxième temps, la streptavidine (= avidine non glycosylée) est injectée pour venir se fixer sur l'immunoconjugué biotinylé. Après un laps de temps adéquat pour une élimination de la streptavidine libre dans le sang, de la biotine radiomarkée est administrée dans un troisième temps. Grâce à la multivalence de la streptavidine, un complexe IgG-biotine-streptavidine-biotine⁺ va pouvoir se former. Cette technique a été testée chez des patients atteints de gliomes de haut grade avec de l'⁹⁰Y-DOTA-biotine et un Ac anti-ténascine biotinylé en injection locorégionale (Paganelli G, *et al.* 1999). Le taux de réponse objective est de 25% après 2 traitements, sans toxicité hématologique mais une neurotoxicité dose-dépendante a été observée. Les rapports tumeur/tissus sains sont satisfaisants (Paganelli G, *et al.* 2003).

A

"2-step" streptavidin-biotin pretargeting

Biotinylated,
galactose-conjugated carrier

Step 1
Pretarget
StAv-IgG

All injections given

Clearing-Blocking
24

Removed by

Step 2
Radiolabeled
Biotin

Filtered by

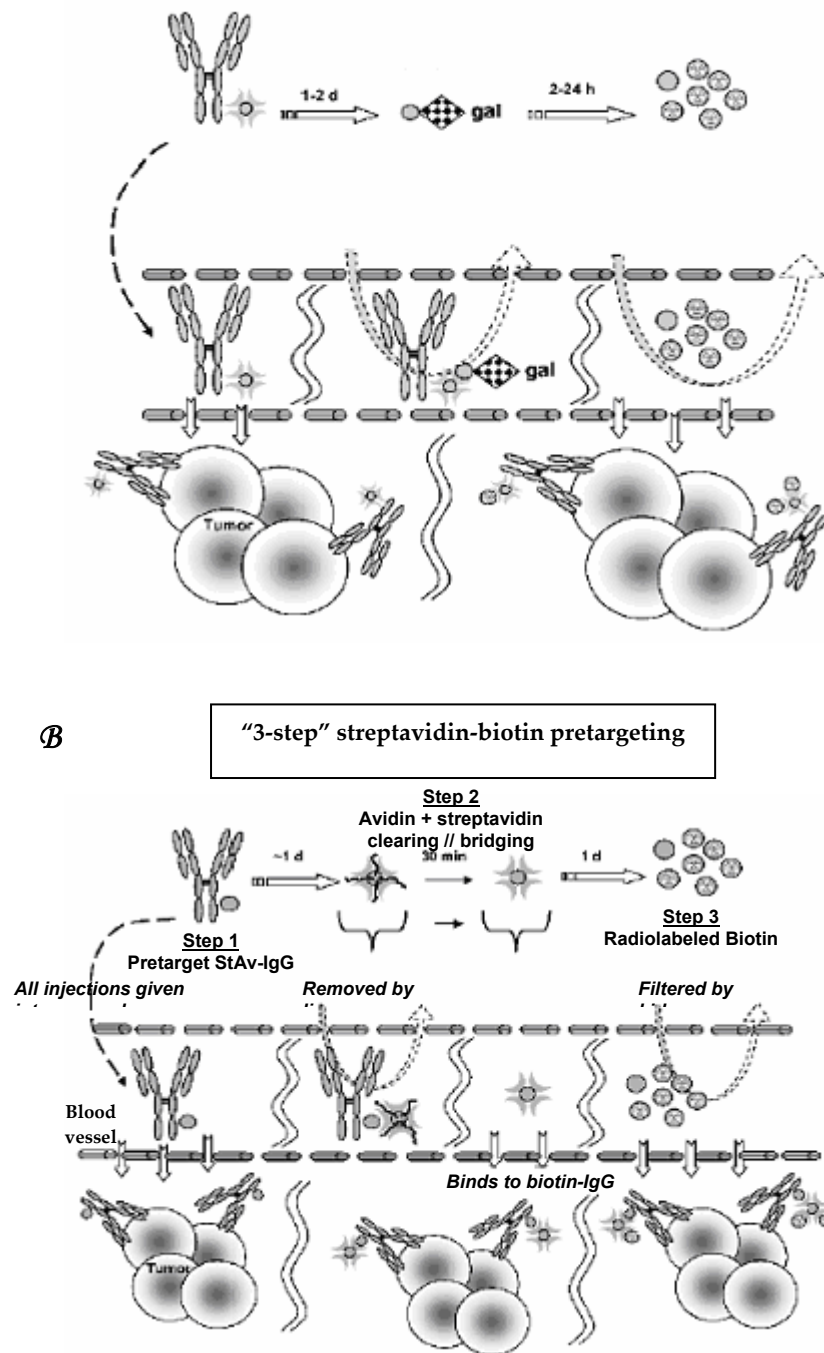


Figure 10. Représentation schématique des systèmes de préciblages avidine-biotine. **A.** Méthode de préciblage en "deux temps" formant le complexe IgG-streptavidine-biotine. **B.** Méthode de préciblage en "trois temps" avec le système IgG-biotine-streptavidine-biotine.

◆ Système AES (Affinity Enhancement System)

Ce modèle repose sur l'utilisation d'un haptène bivalent radiomarqué et d'anticorps bispécifiques (bsmAb) dont un bras reconnaît un antigène exprimé par les cellules tumorales et l'autre une molécule de bas poids moléculaire (haptène). Reardan a été le premier à introduire ce concept en utilisant un bsmAb anti-tumeur/anti-métal chélaté (Reardan DT, et al. 1985). Par la suite, d'autres haptènes ont été développés en particulier sous forme de peptides. Il a également été démontré qu'une bivalence de l'haptène permet par une liaison sur deux AcM

prélocalisés d'augmenter la stabilité du complexe (Figure 11 & 12). (Le Doussal JM, *et al.* 1989) Ainsi, dans un premier temps, le bsmAb est injecté et se fixe sur la cible par son site de liaison anti-Ag tumoral. Après un délai suffisant pour que les AcM non fixés soient éliminés de la circulation sanguine et des tissus sains, l'haptène radiomarqué est injecté. Du fait de sa petite taille, il va diffuser très rapidement vers sa cible, le bsmAb prélocalisé sur la tumeur (Figure 11).

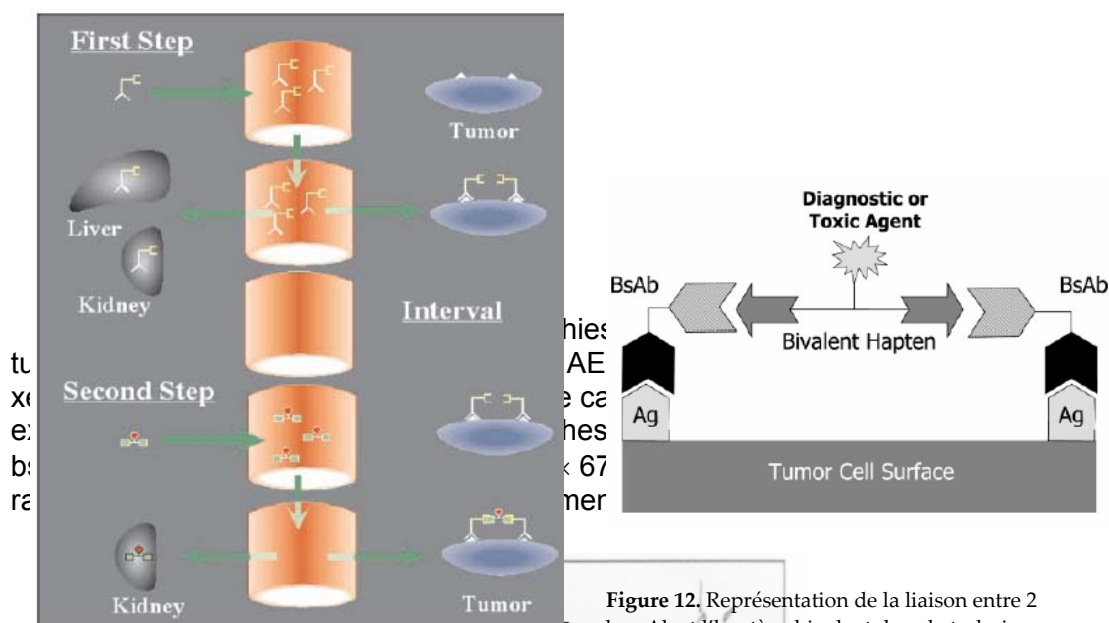


Figure 11. Protocole du système en deux temps utilisant un bsmAb et un haptène bivalent (dessin de P. Thédrez).

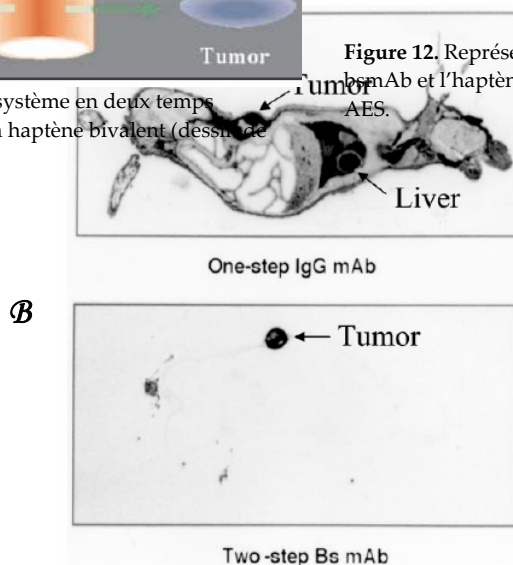


Figure 13. Autoradiographies d'une souris ayant une tumeur NCI-H69 obtenues 48h après injection soit d'un marquage direct d'un AcM (^{125}I) N1KNBL1 (A) ; soit par un système en deux temps (B) : injection du bsmAb N1KNBL1 $\times$ 679 puis de l'haptène bivalent radiomarqué (^{125}I) di-HSG.

La technique AES a également été testée lors de plusieurs études cliniques dans le cancer pulmonaire à petites cellules et dans le cancer médullaire de la thyroïde (CMT) grâce au système bsmAb anti-ACE $\times$ anti-DTPA- ^{111}In (F6 $\times$ 734) et l'haptène bivalent di-DTPA-tyrosine-lysine marqué à l'indium-111 pour le diagnostic et à l'iode-131 pour la thérapie (Barbet J, *et al.* 1999 ; Vuillez JP, *et al.* 1999 ; Kraeber-Bodéré F, *et al.* 1999). Les résultats de ces essais sont encourageants. On observe une stabilisation des marqueurs biologiques et de la croissance tumorale. La toxicité est essentiellement hématologique.

I.5.4. Limites de la RIT dans les tumeurs solides et intérêt des vecteurs colloïdaux.

L'avenir de la RIT dans les tumeurs solides peut être assuré par des thérapies utilisant des systèmes à multi-étapes qui diminuent fortement la toxicité du traitement. Toutefois, la RIT se limite pour l'instant aux cibles de petite taille. Les techniques de préciblage comme l'AES ont démontré un effet positif quant à l'irradiation des tissus sains mais sans accroître la fixation tumorale par rapport à un ciblage direct (Gautherot E, *et al.* 2000). La quantité que l'on peut fixer par haptène (activité spécifique ≈ 70 MBq/nmol) constitue un des facteurs limitants du système AES.

L'utilisation de vecteurs colloïdaux, tels que les liposomes ou les nanocapsules lipidiques, permettrait de vectoriser de plus fortes activités de radionucléides soit par inclusion dans la membrane lipidique soit par encapsulation interne. En ce qui concerne les liposomes, vecteurs colloïdaux à cœur hydrophile, la recherche est plus avancée. Différents travaux ont été effectués sur l'encapsulation de radionucléides essentiellement à des fins diagnostiques (Proffitt RT, *et al.* 1983 ; Phillips WT, *et al.* 1999 ; Harrington KJ, *et al.* 2002). Un système analogue à l'AES a été développé par Cao et Suresh (Cao Y, *et al.* 2000) en utilisant un bsmAb 174H.64 $\times$ anti-biotin, les liposomes présentant à leur surface de la biotine et étant marqué par le complexe ^{99m}Tc -DTPA. Actuellement, des méthodes de marquages à des fins thérapeutiques (Mougin-Degraef M, *et al.* 2006) et des travaux de ciblage utilisant le bsmAb anti-ACE $\times$ anti-DTPA- ^{111}In (hMN14 $\times$ 734 ; Fab' $\times$ Fab') sont en cours d'optimisation et semblent donner des résultats encourageants.

Concernant les nanocapsules lipidiques, vecteurs colloïdaux à cœur lipidique, la recherche est plus récente. Ces nanocapsules lipidiques ont été développées récemment par l'équipe du Professeur Jean-Pierre Benoît (Heurtault B, *et al.* 2000 ; 2002a ; 2002b ; 2003a ; 2003b). Quelques travaux de radiomarquages par incorporation de complexes lipophiles au ^{99m}Tc pour l'imagerie et au ^{188}Re pour la thérapie ont montré la faisabilité de ce type de marquage (Cahouet A, *et al.* 2002 ; Ballot S, *et al.* 2006). Comme pour les liposomes, il serait envisageable d'utiliser les nanocapsules lipidiques à visée thérapeutique et de les inclure dans un système de ciblage en deux temps. L'intérêt de l'utilisation des nanocapsules lipidiques en plus des liposomes pour la RIT est de se servir d'un outil aux propriétés différentes (formulations ; incorporation de radionucléides ; comportement *in vivo*) ce qui permettra ainsi de comparer les deux radiopharmaceutiques et de définir lequel serait le mieux adapté dans telle ou telle pathologie.

II. LES NANOCAPSULES LIPIDIQUES

Les nanocapsules lipidiques (LNC : lipidic nanocapsule) ont été élaborées afin de pallier au problème d'utilisation de solvants organiques dans la formulation de vecteurs colloïdaux qui à l'état de trace peuvent être toxiques lors de l'administration chez l'homme. Elles possèdent une structure hybride entre les nanocapsules polymériques et les liposomes, du fait de son cœur lipidique enrobé par un tensioactif qui confère à la membrane une certaine rigidité.

II.1. Préparation des nanocapsules lipidiques.

Le procédé breveté de la formulation des nanocapsules lipidiques consiste en une transformation, provoquée par plusieurs cycles de chauffage, d'une émulsion initiale huile/eau (o/w) en une émulsion eau/huile (w/o) via une zone dite d'inversion de phase (PIZ : phase inversion zone).

II.1.1. Constitution des nanocapsules lipidiques.

Les nanocapsules lipidiques sont constitués de trois composants essentiels illustrés Figure 14 :

- Labrafac® WL 1349, une huile composée de triglycérides à chaîne moyenne d'acides caprylique et caprique (C_8 et C_{10}).
- Lipoïd® S75-3, provenant de lécithine de soja. Il est constitué d'environ 69% de 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DSPC) et de 9% de 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl éthanolamine (DSPE). Ce constituant est un tensioactif lipophile et le seul solide dans la formulation à température ambiante et à 37°C.
- Solutol® HS-15, est un 12-hydroxystéarate de PEG-660 qui joue le rôle de tensioactif hydrophile non ionique.

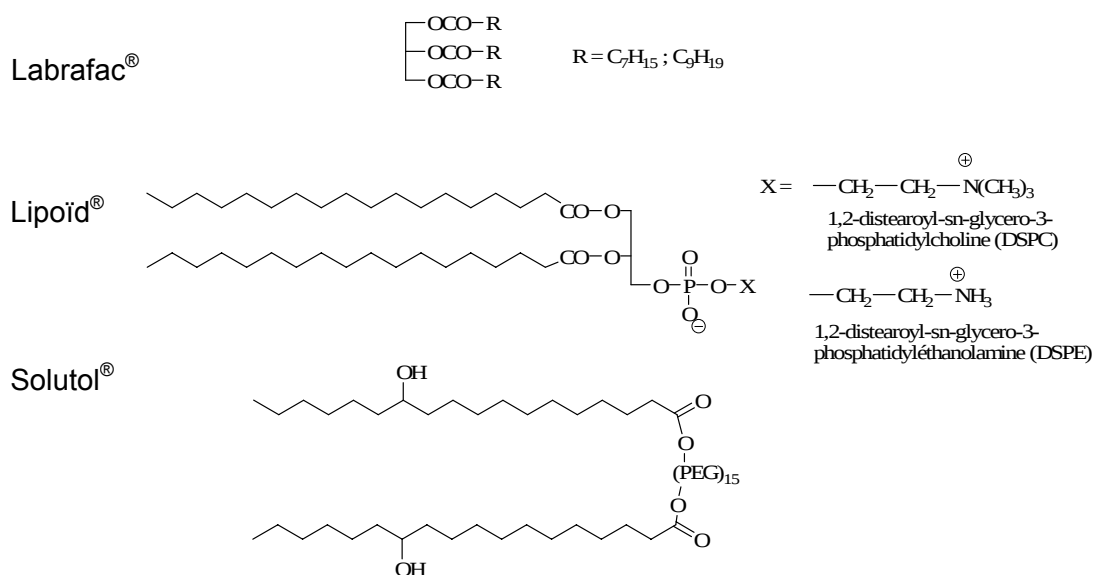


Figure 14. Structures des différents constituants des nanocapsules lipidiques.

II.1.2. Formulation des nanocapsules lipidiques.

Le procédé de formulation (Figure 15) a été établi en fonction de la quantité des différents constituants et des températures devant être appliquées pour obtenir des nanocapsules stables. Ainsi, le procédé a été défini en deux étapes. La première étape consiste à appliquer très précisément un cycle de température sur une mixture prédéfinie. Le mélange est obtenu par addition de quantités exactes des différents composants Labrafac®/Lipoid®/Solutol®/H₂O/NaCl. Ainsi, par agitation magnétique, la mixture est chauffée jusqu'à une température de 85°C puis progressivement refroidie à 60°C. Trois cycles de température (85-60-85-60-85°C) sont appliqués à la mixture permettant d'obtenir un processus d'inversion de phase. Cette inversion de phase se visualise par l'annulation de la conductivité de la formulation lorsque l'émulsion w/o se forme et se traduit visuellement par un changement d'aspect du système initial (du blanc opaque au blanc translucide).

La seconde étape consiste à refroidir progressivement la température de 85°C jusqu'à une température appelée T_{cd} (cd : cooling dilution), qui se trouve à 1 à 3°C du commencement de la zone de transition de phase ou PIZ (ie $\approx 72^\circ\text{C}$). A cette température, un choc de température irréversible est appliqué par addition d'un volume précis d'eau à $\approx 0^\circ\text{C}$. Après quelques minutes d'agitation permettant une stabilisation de la température, une suspension de nanocapsules lipidiques stables est alors obtenue.

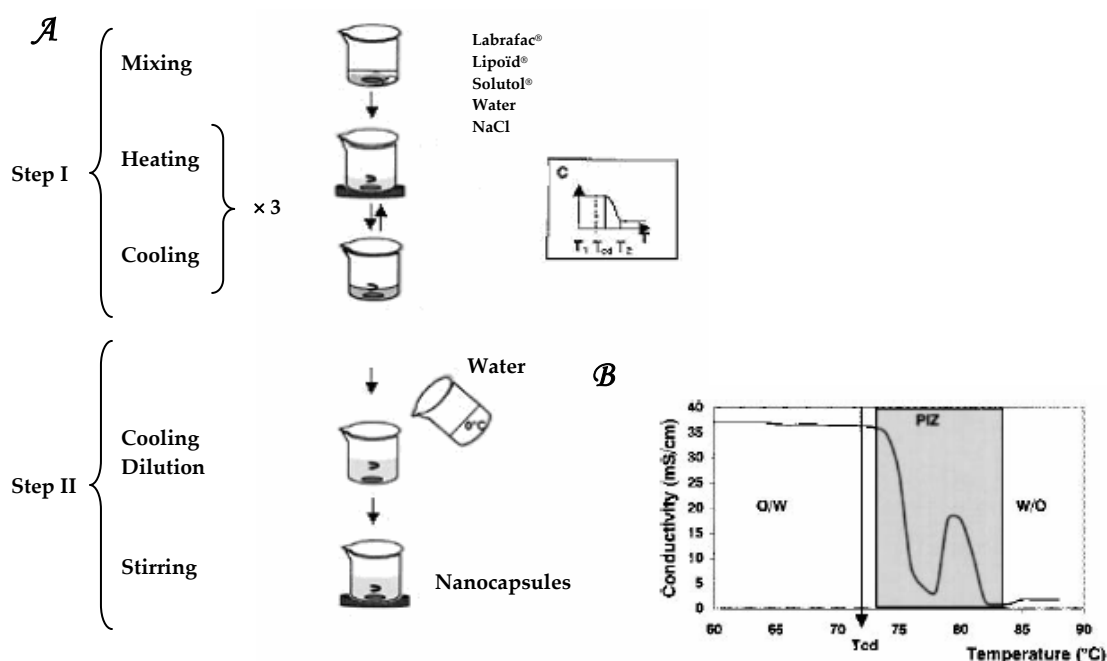


Figure 15. A. Procédé de formulation des nanocapsules lipidiques. Step I : trois cycles de chauffage autour de la température d'inversion de phase (TIP) ; Step II : Application de la tremp (ie diminution rapide de la température) à une température donnée (T_{cd}) par addition d'eau à 0°C . **B.** Mesure de la conductivité mettant en évidence la zone de transition de phase (PIZ). (Heurtault B, *et al.* 2002a)

II.1.3. Caractérisation des nanocapsules lipidiques.

Une étude DSC (differential scanning calorimetry), évaluant la différence de comportements (de l'enthalpie et de température de transition de phase) des différents constituants seuls et associés, a permis de définir la structure des nanocapsules lipidiques (Figure 16) (Heurtault B, *et al.* 2002a ; 2003b). Le système est constitué d'un cœur lipophile, correspondant au Labrafac® libre, enrobé d'une coque rigide de tensioactifs, mélange de Lipoid® et d'une partie de Solutol®. La majeure partie de Solutol® est orientée vers la phase aqueuse sur la couche externe des nanocapsules lipidiques.

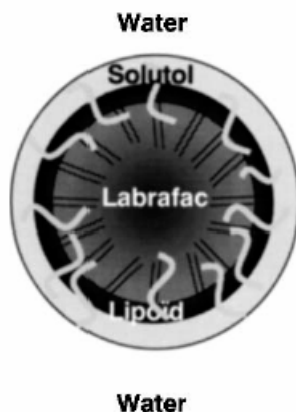


Figure 16. Représentation schématique des nanocapsules lipidiques constituées d'un mélange labrafac®/Lipoid®/Solutol®/eau/NaCl.

Les mesures de taille et d'indice de polydispersité des nanocapsules lipidiques ont été effectuées à l'aide d'un appareil à spectroscopie à corrélation photonique. Celles-ci ont montré une taille moyenne des nanocapsules lipidiques de 50 nm avec un indice de polydispersité $< 0,15$.

L'influence de la composition des nanocapsules sur la taille des particules a été étudiée par Heurtault (Heurtault B, *et al.* 2003b). En fonction des différents facteurs de composition (concentration en tensioactif, ration eau / huile...), une population monodisperse de nanocapsules lipidiques peut être prédite à l'avance. Le facteur ayant le plus d'influence est le tensioactif hydrophile, le Solutol®. La taille des LNC diminue quand la concentration en tensioactif augmente. Par contre, par addition croissante de Labrafac®, la taille des LNC augmente. La concentration en chlorure de sodium agit également sur le procédé de formulation. Ainsi, quand la concentration en NaCl augmente, la température d'inversion de phase diminue. En conséquence, pour une formulation donnée, il est possible de prédire la structure des nanocapsules lipidiques.

II.2. Biocompatibilité des nanocapsules lipidiques.

II.2.1. Comportement des vecteurs colloïdaux en général.

Plusieurs études ont mis en évidence une élimination rapide de colloïdes (CDDS : colloidal drug delivery systems) après leur injection dans la circulation sanguine résultant d'une réponse immunitaire par interaction avec le MPS (mononuclear phagocyte system) (Puisieux F, *et al.* 1994 ; Stolnik S, *et al.* 1995) ou

avec le système du complément (Passirani C, *et al.* 1998 ; 2005). Les colloïdes vont ainsi être rapidement éliminés de la circulation sanguine par capture par des macrophages principalement situés au niveau du foie, de la rate, des poumons et de la moelle osseuse. Les CDDS sont reconnus par des opsonines, protéines plasmatiques qui facilitent la phagocytose, telles que les protéines du complément C3b, des IgG et IgM, des fibronectines et apolipoprotéines ou par les récepteurs spécifiques ou non-spécifiques présents à la surface des macrophages.

Plusieurs facteurs physicochimiques des particules peuvent influencer cette activation du système immunitaire (Vonarbourg A, *et al.* 2006b) :

♦ **La nature des constituants.** Les CDDS sont pour la majeure partie constitués de polymères synthétiques, tels que du poly-*D,L*-lactide (PLA), du poly-*D,L*-co-glycolide (PLGA), polystyrène (Pst), polyméthylméthacrylate (PMMA) ou du polyalkylcyanoacrylate (PACA), dont certains ne sont pas biocompatibles. La présence de groupements à la surface des CDDS peut également être un facteur d'activation : les NH_2 sont connus pour activer les protéines du complément C_4 ; et les OH, les protéines C_3 .

♦ **La taille** est un facteur important à prendre en compte. La Figure 17 schématise le comportement de chaînes polymériques présentes à la surface de CDDS de petite et de grande taille. Ainsi, sur un CDDS de petite taille, les chaînes polymériques présentent un plus grand angle d'incurvation et par conséquent une meilleure mobilité, ce qui va empêcher la fixation de protéines du complément du type C_3 .

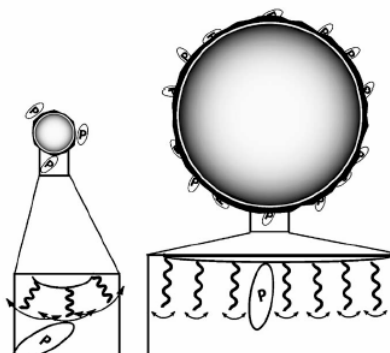


Figure 17. Représentation schématique de l'influence de la taille des CDDS. 'P' = protéine ; les flèches représentent l'angle d'incurvation des chaînes polymériques (d'après Vonarbourg A, *et al.* 2006b).

♦ **La charge électrique apparente.** L'utilisation de CDDS ayant une surface neutre ou légèrement chargée permet de minimiser l'adsorption des protéines à la surface des particules.

♦ **L'hydrophilie.** "If you want to be invisible, look like water" (Allen TM. 1994). Les molécules du système immunitaire ont une grande avidité pour les surfaces hydrophobes. Ainsi, pour augmenter l'hydrophilie du système, l'introduction à la surface de polymères à chaînes hydrophiles peut être envisagée. De plus, l'hydrophilie du système va être d'autant plus élevée que la taille des chaînes est grande comme le montre la Figure 18.

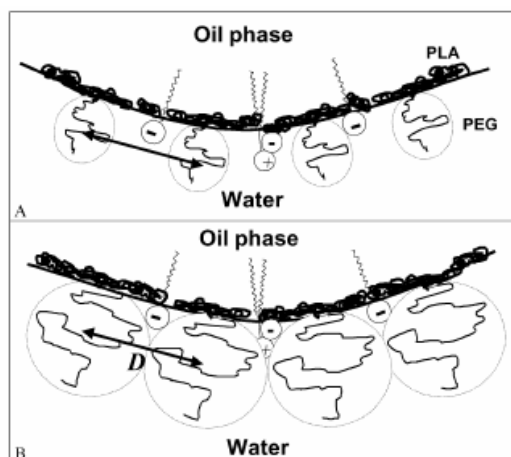


Figure 18. Représentation schématique de la surface de vésicules présentant des chaînes polymériques hydrophiles de tailles différentes. (d'après Mosqueira VCF, *et al.* 2001)

♦ **Les caractéristiques du coating.** L'insertion de chaînes polymériques à la surface des CDDS peut influencer l'activation du système immunitaire selon leur poids moléculaire (plus les chaînes sont longues, plus les molécules immunitaires sont répulsées) ; leur densité (Figure 19 **B**) ; leur configuration spatiale (Figure 19 **A/C**).

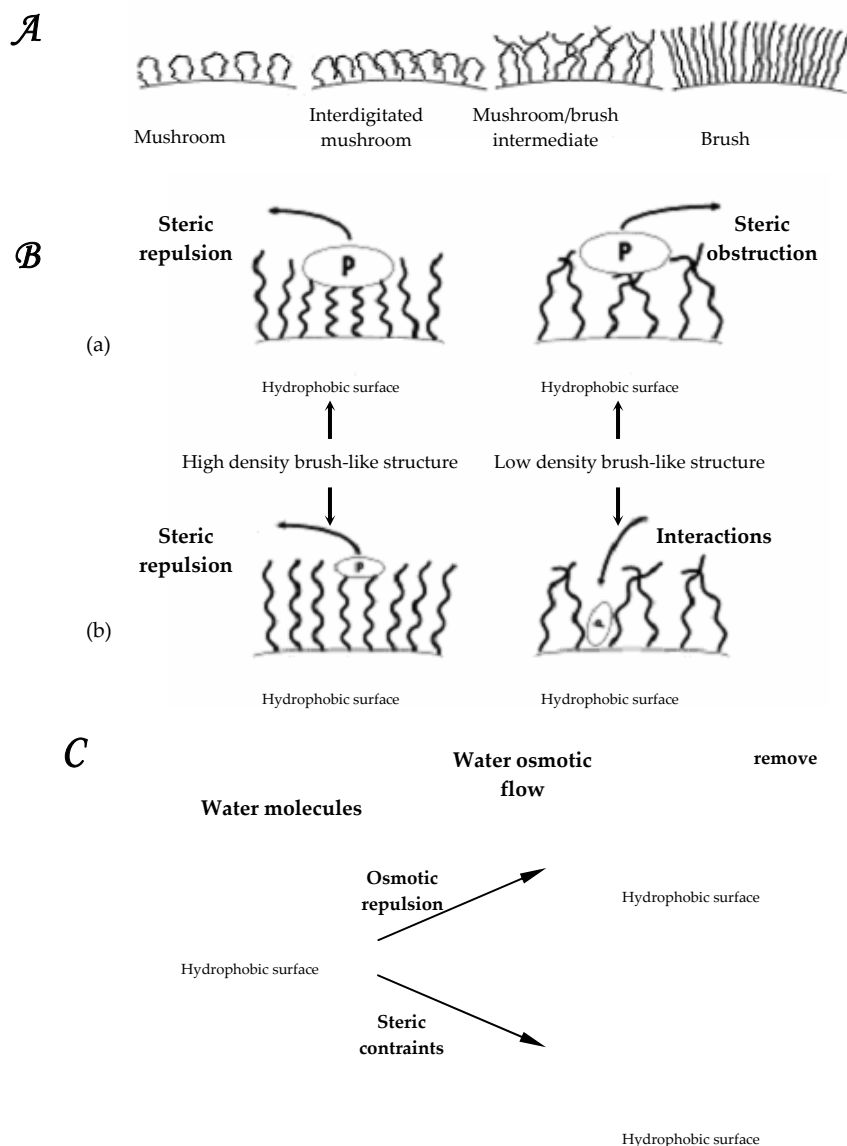




Figure 19. Représentation schématique de la surface du colloïde. **A.** Différentes conformations possibles du coating à la surface du colloïde. **B.** Influence de la densité des chaînes polymériques sur de grosses protéines (a) petites protéines (b). **C.** Influence de la flexibilité des chaînes polymériques. (d'après Vonarbourg A, *et al.* 2006b)

II.2.2. Résultats obtenus sur les nanocapsules lipidiques.

Des études *in vitro* ont été menées afin de comprendre le comportement des nanocapsules lipidiques envers le système immunitaire (Vonarbourg A, *et al.* 2006a) selon la technique du CH50. L'activation du système du complément est testée dans du sérum humain en mesurant la capacité d'hémolyse des molécules du complément résiduelles après avoir été mise en contact au préalable avec des nanocapsules lipidiques (Figure 20). Cette technique consiste alors à déterminer la quantité de sérum humain capable de lyser 50% d'une quantité fixe d'érythrocytes de moutons sensibilisés (CH50). Ce test a montré une très faible activation du système du complément par les nanocapsules lipidiques.

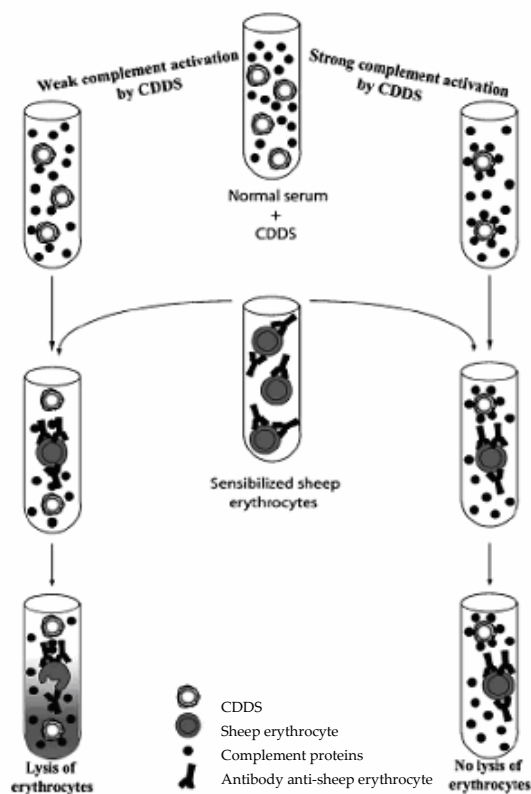


Figure 20. Représentation schématique de la technique du CH50 mesurant l'activation du système du complément. (d'après Vonarbourg A, *et al.* 2006b)

Plusieurs facteurs cités précédemment, en rapport avec la structure de nanocapsules lipidiques, peuvent expliquer les résultats obtenus par le CH50. En effet, la présence du tensioactif hydrophile non-ionique, le Solutol[®], à la surface des nanocapsules lipidiques rend la vésicule hydrophile et par conséquent, les protéines du complément sont peu avides. La densité élevée de la couche de PEG-660 permet également une protection contre le processus d'opsonisation.

La taille des différentes nanocapsules lipidiques étudiées (20, 50, 100 nm) n'influent que très peu sur la réponse du complément.

II.3. Utilisation des nanocapsules lipidiques à visée médicale.

II.3.1. Vectorisation de médicaments.

Des études sur différents vecteurs colloïdaux ont été menées depuis ces trente dernières années pour l'administration médicamenteuse. L'encapsulation de médicament permet une protection efficace contre le MPS. En effet, après injection intraveineuse de drogues seules, l'organisme réagit grâce à son système immunitaire et peut également provoquer une résistance (MDR : multi-drug resistance) vis-à-vis du médicament ce qui diminue l'efficacité du traitement. L'encapsulation peut également permettre une meilleure biodistribution du médicament et d'accéder aux organes auxquels il n'a pas accès seul, comme le cerveau où la barrière hémato-encéphalique stoppe la plupart des drogues qui ne sont pas suffisamment lipophiles (Kreuter J. 2001 ; Fournier E, *et al.* 2003).

En ce qui concerne les nanocapsules lipidiques, des travaux ont été réalisés (Lamprecht A, *et al.* 2002) sur l'encapsulation d'un anti-arythmique/anti-angoreux, l'amiodarone, qui possède également une liste assez longue d'effets secondaires sérieux (accumulation dans la thyroïde ; phlébite...). L'encapsulation dans ce cas pourrait permettre une diminution de ces effets indésirables liés à l'injection d'amiodarone. L'encapsulation du principe actif a été réalisée en solubilisant l'amiodarone dans un premier temps dans la phase huileuse puis en appliquant les différents cycles de température décrits précédemment. Cette étude a montré un taux d'encapsulation supérieur à 90% sans relargage précoce du principe actif.

Une étude plus récente a été menée sur l'animal avec des nanocapsules lipidiques contenant de l'ibuprofène dans le traitement de la douleur (Lamprecht A, *et al.* 2004). Les LNC ont montré un fort taux d'encapsulation (94-98%). Plusieurs voies d'administration (orale et intraveineuse) ont été testées chez le rat et ont montré un effet prolongé comparé au médicament seul. Ainsi, il a été démontré que l'encapsulation de médicaments suffisamment lipophiles pour être solubilisé dans le Labrafac[®] est possible et permet un relargage lent et tardif de la molécule induisant un effet prolongé (ibuprofène seul effet < 1h ; ibuprofène encapsulé effet > 2h).

II.3.2. Ciblage médicamenteux des tumeurs solides.

II.3.2.1. Ciblage des tumeurs solides par la chimiothérapie : données générales obtenues par les vecteurs colloïdaux.

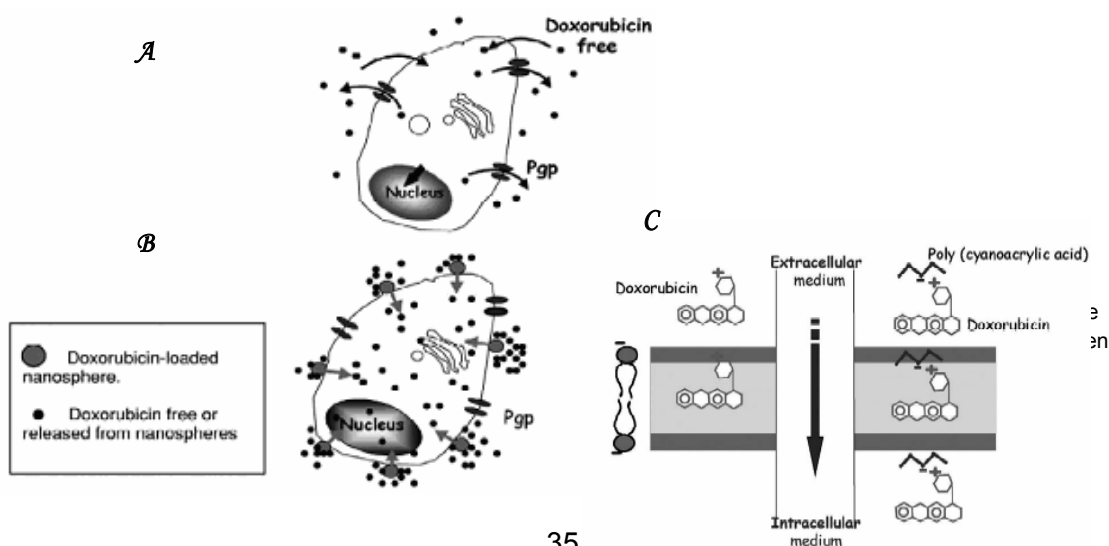
L'intérêt majeur des vecteurs colloïdaux réside dans l'administration d'agents anticancéreux pour le traitement des tumeurs solides (Drummond DC, *et al.* 1999 ; Moghimi SM, *et al.* 2001 ; Brigger I, *et al.* 2002). Il a été clairement établi qu'il existe un ciblage passif vers des tumeurs solides après administration intraveineuse de particules possédant les deux caractéristiques suivantes :

- un temps de résidence plasmatique suffisamment long,
- une taille adéquate pour une extravasation optimale des sites tumoraux (50-200 nm).

En effet, des nanoparticules de petites tailles (< 50 nm) sont rapidement éliminées par filtration glomérulaire ou par captation via une extravasation non-spécifique au niveau du foie ; tandis que des particules de plus grande taille (> 200 nm) sont rapidement éliminées par filtration splénique (Ishida O, *et al.* 1999 ; Moghimi SM, *et al.* 2001).

Les vecteurs colloïdaux assurent également une protection des principes actifs anticancéreux contre le mécanisme de résistance aux drogues ou MDR. Cette résistance est essentiellement induite par l'action d'une protéine, la P-glycoprotéine (P-gp), qui est surexprimée sur les cellules tumorales (Figure 21). La P-gp est capable de sécréter hors de la cellule les xénobiotiques, généralement chargés positivement. Cette protéine assure normalement le rôle de détoxification cellulaire contre des agents pathogènes exogènes. Par contre, lors de traitement, la P-gp va être un obstacle majeur pour l'efficacité du traitement, créant une chimiorésistance. Ainsi, les nanoparticules vont permettre de masquer la charge du principe actif et d'augmenter sa concentration intracellulaire afin d'assurer l'efficacité du traitement.

La Figure 21 schématise le processus de rejet hors de la cellule tumorale de la doxorubicine administrée seule (A) et l'amélioration apportée par l'encapsulation de la doxorubicine (B & C).



Il a été démontré sur des liposomes présentant les deux caractéristiques citées précédemment que l'encapsulation d'un anticancéreux, la doxorubicine, permettait une accumulation au niveau de la tumeur 15 fois supérieure au taux retrouvé avec la doxorubicine seule (Moghimi SM, *et al.* 2001).

II.3.2.2. Ciblage des tumeurs solides en chimiothérapie : cas des nanocapsules lipidiques.

Concernant les nanocapsules lipidiques, la recherche s'est également axée sur le traitement des tumeurs et a récemment fait l'objet de plusieurs publications (Garcion E, *et al.* 2006 ; Lamprecht A, *et al.* 2006 ; Peltier S, *et al.* 2006). Afin de visualiser le comportement des nanocapsules lipidiques vis-à-vis de la pompe P-gp responsable de MDR lors de l'injection d'anticancéreux, une étude préliminaire a été menée (Benoît JP, *et al.* 2004) sur des nanocapsules lipidiques encapsulant du ^{99m}Tc -methoxyisobutylisonitrile (^{99m}Tc -MIBI), molécule lipophile chargée positivement qui sert de substrat à la P-gp. Cette étude permettant le suivi des nanocapsules lipidiques a été réalisée *in vitro* et *in vivo* sur des cellules de gliome exprimant fortement la P-gp. Il a pu être mis en évidence la capacité des LNC à inhiber l'activité ATPase de la P-gp.

Il a ensuite été montré lors d'études récentes *in vitro* que l'encapsulation d'étoposide, anticancéreux dont l'efficacité du traitement est altérée à cause du phénomène de résistance et notamment par action de la P-gp, a permis une diminution significative de la croissance cellulaire sur les lignées cellulaires de glioblastome (Lamprecht A, *et al.* 2006). De plus, l'effet de cytotoxicité est dépendant de la taille des nanocapsules lipidiques (la cytotoxicité est d'autant plus importante que les LNC sont petites).

En parallèle, une étude sur l'encapsulation de paclitaxel a été menée permettant d'une part la protection du principe actif envers le MDR, et d'autre part une administration *per os* du principe actif pour pallier aux problèmes liés à l'administration intraveineuse (IV) des formes commerciales (Taxol[®], Paxene[®]). En effet, différents effets indésirables associés à l'administration IV elle-même apparaissent tels que des infections liées aux cathéters, de potentielles thromboses..., mais également des effets secondaires d'origine allergique liés à l'injection des produits commerciaux (réactions sévères d'hypersensibilité, vasodilatation, hypoventilations, hypotension). Il a été démontré que la présence de l'excipient Cremophor[®] EL (dérivés d'huile de castor polyoxyéthylée) contribue largement à la toxicité associée à l'injection du produit (Szebeni J, *et al.* 1998). Une administration *per os* du paclitaxel serait intéressante dans la mesure où les effets indésirables d'une IV sont importants. Des essais d'administration *per os* de paclitaxel ont donné des résultats peu probants (biodisponibilité < 10%). Ces mauvais résultats sont liés d'une part à la faible solubilité aqueuse du paclitaxel mais également à une activité importante des pompes à P-gp présentes abondamment au niveau du tractus intestinal. Par conséquent, une optimisation de la formulation a été envisagée par l'utilisation des nanocapsules lipidiques pour permettre une administration orale. L'encapsulation du paclitaxel a été obtenue avec un rendement quasi-quantitatif (99,9%) et a permis d'augmenter chez le rat d'un facteur 3 la biodisponibilité du principe actif (Peltier S, *et al.* 2006).

II.3.3. Utilisation des nanocapsules lipidiques radiomarquées pour un ciblage des tumeurs.

La particularité des vecteurs colloïdaux à se fixer sur les tumeurs solides est un point relativement intéressant qui permettrait d'améliorer le traitement en radiothérapie ou en radioimmunothérapie. Actuellement, le développement d'un nouvel outil radiopharmaceutique pour la radiothérapie a été initié que très récemment. Des premiers travaux ont été effectués et ont montré la faisabilité du radiomarquage des nanocapsules lipidiques par incorporation de complexes lipophiles marqués au ^{99m}Tc ou au ^{188}Re (Cahouet A, *et al.* 2002 ; Ballot S, *et al.* 2006). Les complexes lipophiles ont été incorporés dans la mixture avant l'application des cycles de chauffage. L'incorporation des complexes lipophiles ^{99m}Tc -SSS ou ^{188}Re -SSS dans le cœur de triglycérides des nanocapsules lipidiques est quantitative avec une faible variation de la taille. Les $\frac{1}{2}$ vies plasmatiques des nanocapsules lipidiques ainsi radiomarquées ont pu être évaluées chez le rat à 21 minutes.

Pour une utilisation future en radioimmunothérapie dans un système en deux temps similaire à ce qui a été réalisé avec les liposomes par Cao et Suresh (Cao Y, *et al.* 2000) en utilisant un bsmAb 174H.64 $\times$ anti-biotin, il faut absolument augmenter le temps de résidence des nanocapsules lipidiques pour une meilleure biodisponibilité vers la tumeur en additionnant dans la formulation des LNC des polymères de longue chaîne.

OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif de ce travail de thèse est le développement d'un nouvel outil thérapeutique pour la radioimmunothérapie par l'utilisation de nanocapsules lipidiques, réservoir de radionucléides, capables de cibler les cellules tumorales spécifiquement.

L'efficacité de la radioimmunothérapie a été démontrée dans le traitement des lymphomes. Les problèmes de toxicité de la RIT, liés à l'utilisation de AcM radiomarqués, ont été résolus en grande partie par la dissociation de la pharmacocinétique de l'AcM de celle du radionucléide par la création de systèmes de préciblage. Cette méthode en deux temps est une des voies envisageables pour l'optimisation de la radioimmunothérapie dans le traitement des cancers et en particuliers pour le traitement des tumeurs de grandes tailles. En effet, en ce qui concerne les tumeurs solides, les résultats sont encore insuffisants : l'efficacité de la RIT est limitée surtout par la faible quantité de radioactivité véhiculée, que ce soit aussi bien par les AcM radiomarqués ou par les haptènes radiomarqués dans un système de préciblage.

Pour résoudre ce problème, l'utilisation de nanocapsules lipidiques immunospécifiques radiomarquées dans un système de préciblage peut être envisagée. Ceci permettrait d'augmenter ainsi la quantité de radioactivité vectorisée vers la tumeur, tout en diminuant la toxicité engendrée par une exposition trop longue à la radioactivité circulante.

Les nanocapsules lipidiques sont susceptibles de remplir les différents critères permettant leur utilisation dans un système de préciblage de la RIT similaire à la technique AES. Les LNC sont capables de véhiculer de plus fortes activités comparées à celles couplées aux AcM ou haptènes. En effet, les nanocapsules lipidiques peuvent transporter la radioactivité soit par encapsulation des radionucléides dans le cœur lipidique, soit par insertion au niveau de la membrane. En ce qui concerne le système de préciblage, la spécificité du ciblage peut être assurée par l'inclusion d'haptènes couplés au niveau de la membrane et par l'utilisation lors du processus de RIT d'anticorps bispécifique (bsAcM), anti-Ag tumoral/anti-haptène. La Figure 22 schématise le système tumeur/bsAcM/nanocapsule. De plus, il a été démontré auparavant que les vecteurs colloïdaux ont la capacité de se fixer sur les tumeurs solides de façon significative. Ainsi, en plus de cette propriété particulièrement intéressante, l'insertion du système nanocapsule/radionucléides dans une méthode de préciblage permettrait une efficacité d'autant plus grande du traitement.

Afin d'optimiser la quantité de nanocapsules lipidiques radiomarquées délivrées à la tumeur, celles-ci doivent pouvoir circuler plus longtemps dans le flux sanguin. Pour cela, des modifications de leur formulation sont nécessaires qui permettraient d'ajouter à leur surface des structures polymériques amphiphiles connues pour prolonger le temps de résidence des vecteurs colloïdaux. Ces structures polymériques empêchant la reconnaissance par le MPS peuvent également diminuer l'immunoréactivité AcM/haptène et par conséquent rendre le préciblage inefficace. Pour pallier à ce problème, les haptènes doivent impérativement être situés à l'extrémité hydrophile des chaînes polymériques. Il en est de même pour l'insertion au niveau de la membrane d'agents chélatants puisque la présence du solutol[®], qui forme une couche protectrice à la surface, peut empêcher l'accès des radionucléides à leur cage chélatante. Ainsi, pour faciliter cet accès, les agents chélatants doivent être placés en bout de chaîne polymérique (Figure 22).



Figure 22. Système de préciblage des nanocapsules lipidiques utilisant des bsAcM.

Ce travail de thèse va donc s'articuler selon différents chapitres :

1. **Modifications de la formulation des nanocapsules lipidiques** par insertion des polymères amphiphiles de différentes tailles. Pour cela, nous allons définir quel type de polymère est le plus approprié. Celui-ci sera utilisé par la suite. Il sera également intéressant d'étudier l'influence de la longueur des chaînes polymériques sur la formulation.
2. **Synthèses des différents "constructs" polymériques** permettant l'insertion des haptènes et agents chélatants.
3. **Etude de faisabilité des différents radiomarquages :**
 - ✗ soit par insertion au niveau de la membrane des nanocapsules lipidiques de "constructs" amphiphiles contenant des agents chélatants permettant les radiomarquages avec des radionucléides chargés positivement et les métaux tels que ^{111}In , ^{90}Y , $^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$..., mais également à l'aide de précurseurs pour des radiomarquages en surface à l'iode-125 pour une utilisation future en radiothérapie à l'iode-131 ;
 - ✗ soit par incorporation dans le cœur lipidique des molécules lipophiles. Sur ce principe, on peut ainsi insérer des complexes lipophiles au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SSS (développés dans le chapitre 2) qui ont les mêmes comportement que leurs analogues au $^{188/186}\text{Re}$ pour la radiothérapie. D'autres molécules lipophiles ont également été testées. Des précurseurs aromatiques ont été radiomarqués à l'iode-125 et testés pour leur faculté d'incorporation au sein des LNC.

CHAPITRE 2.MODIFICATIONS DE LA FORMULATION DES NANOCAPSULES LIPIDIQUES.

I. OPTIMISATION DE LA FORMULATION DES NANOCAPSULES LIPIDIQUES : QUEL TYPE DE POLYMERES UTILISER ?

La reconnaissance rapide après injection intraveineuse des vecteurs colloïdaux et leur capture, essentiellement par les cellules de Kupffer du foie, a suscité le développement de “stealth” ou “long-circulating” nanovecteurs. Ainsi, des polymères amphiphiles d’origine naturelle ou synthétique ont été développés afin d’augmenter la longévité et la stabilité des colloïdes dans le sang. Ces polymères ont la propriété d’une part de s’incorporer facilement à la surface des nanoparticules grâce à leur partie hydrophobe et d’autre part de pouvoir interagir avec la solution aqueuse par leur partie hydrophile ce qui permet une certaine furtivité de la nanoparticule vis-à-vis de son environnement plasmatique (cf Figure 18).

Ainsi, pour que le choix du type de polymère à utiliser par la suite soit judicieux, nous avons dû suivre un cheminement logique et dû répondre à plusieurs interrogations :

✕ **Quels sont les critères physiques que doit avoir le polymère ?**

Le candidat polymérique idéal pour l’obtention de “stealth” nanovecteurs doit être **non-ionique**, **flexible**, **compatible avec l’eau** et possédant **une forte capacité à s’hydrater**. Ces différentes composantes permettent ainsi une bonne protection contre l’adsorption des composés du milieu sanguin à leur surface. Selon la nature du “coating” des nanoparticules formé par une couche de polymères, celles-ci vont être plus ou moins furtives et auront une activation variable des molécules du MPS.

Ainsi, une liste non exhaustive de polymères a fait l’objet de recherches pour l’enrobage de nanoparticules biodégradables, telles que les liposomes et des polyesters, ou non dégradables, telles que les particules de polystyrène et de poly(méthyl méthacrylate). Le Tableau 6 récapitule ainsi les différents vecteurs colloïdaux qui ont fait l’objet d’études *in vivo*.

Nanoparticules	“coating”	Taille des particules (nm)	Résultats in vivo*
Liposomes	Poly(ethylene glycol) (PEG), monosialoganglioside (GM ₁), phosphatidylinositol (PI), sulphatides, dextran, pullulan		+
Polystyrène	Poloxamère-184	60	n.r
	-188	60	+
	-237	60	n.r
		800	-
	-238	60	n.r
		1000	n.r
	-338	60	+
		75	+
		100	+
		800	+
	-407	60	+
		150	+
		1000	n.r
	Poloxamine-908	60	+
		100	+
		250	+
Poly(methyl methacrylate)	Poloxamère-184	130	+
	-188	130	+
	-338	130	+
	-407	130	+
	Poloxamine-904	130	+
	-908	130	+
	-1508	130	+
	Polysorbate-80	130	+
	Polyxyethylene (23) lauryl ether (Brij 35)	130	-
	Hydroxylpropyl cellulose (Klucel F)	130	-
	Ethoxyl di(nonyl)phenol (Antarox DM 970)	130	-
Poly(butyl 2-cyanoacrylate)	Poloxamère-338	130	+
	Poloxamine-908	130	+

Poly(β -malic acid-co-benzyl malate)	Poloxamère-188 / -407	< 200	n.r
	Divers poloxamines (-304, -504, 704, -904, -908, -1504)	< 200	n.r
Poly(β -hydroxybutyrate)	Poloxamère-338 + -407	< 250	n.r
	Poloxamine-908	< 250	n.r
	Nonylphénols ethoxylés (Antarox CO 970, Antarox CO 990, Antarox DM 970, Gafac RE 960)	< 250	n.r
	Glycérols ethoxylés (SH EO 75, SH EO 100)	< 250	n.r
	Cf coating des particules au poly(β -hydroxybutyrate)		
Poly(lactic acid)	Cf coating des particules au poly(β -hydroxybutyrate)		
Poly(lactic acid-co-glycolic acid)	PEG	140	+
Émulsion o/w	Poloxamine-908	250	+

Tableau 6. Récapitulatif des vecteurs colloïdaux et de leurs types de “coating” étudiés *in vivo*. (d’après Storm G, et al. 1995). +, protection contre le MPS observée ; -, protection contre le MPS non observée ; n.r (not reported).

D’après la littérature, les résultats les plus probants sont obtenus avec des vecteurs colloïdaux possédant une couche protectrice constituée de poly(éthylène glycol) ou de surfactants poloxamère-407, poloxamine-908 et poloxamine-1508 (Figure 23) (Storm G, et al. 1995).

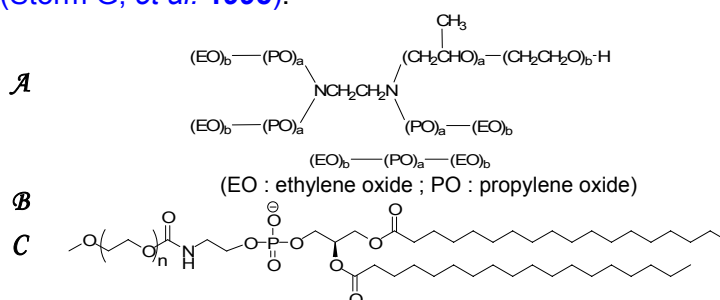


Figure 23. Structures des polymères de “coating” dont les résultats *in vivo* sont les plus probants. **A.** Structure générale des poloxamines ; **B.** Structure générale des poloxamères ; **C.** Poly(éthylène glycol) couplé à un phospholipide.

En effet, ces résultats peuvent s’expliquer grâce aux caractéristiques structurales des molécules. Ces polymères sont essentiellement constitués d’enchaînements éthylène oxyde très flexibles qui peuvent former avec les molécules d’eau des liaisons hydrogène permettant une très bonne hydratation et par conséquent, la formation d’une pellicule d’eau autour de la nanoparticule, essentielle à sa furtivité (Figure 24).

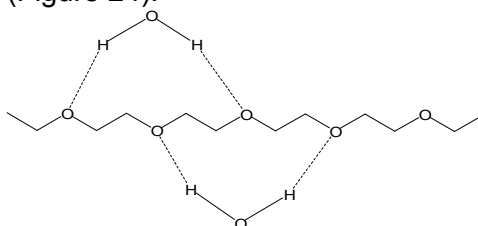


Figure 24. Hydratation de structures du type éthylène oxyde.

✂ Parmi ces types de polymères, quel mode d’enrobage est le plus favorable ?

Pour que la stabilisation stérique liée à la présence de polymères ait une efficacité maximum dans le milieu plasmatique, trois aspects doivent être pris en compte : (1) l’ancrage des polymères doit être suffisamment solide ; (2) la surface de la nanoparticule doit être entièrement recouverte ; (3) la couche polymérique doit être suffisamment épaisse (Storm G, et al. 1995).

Les polymères cités précédemment ont deux modes d’enrobage de la particule différents (Storm G, et al. 1995 ; Torchilin VP, et al. 1995). Les surfactants

polymériques, poloxamère et poloxamine, s'accrochent à la surface des colloïdes par adsorption par leur partie centrale hydrophobe (respectivement, polyoxypropylène ou polyoxypropylène éthylène diamine) ; tandis que leur partie hydrophile polyoxyéthylène est dirigée vers la phase aqueuse (Figure 25 A). En ce qui concerne l'accrochage des poly(éthylène glycol), il se fait par l'intermédiaire d'un phospholipide, la phosphatidyléthanolamine (Figure 25 B).

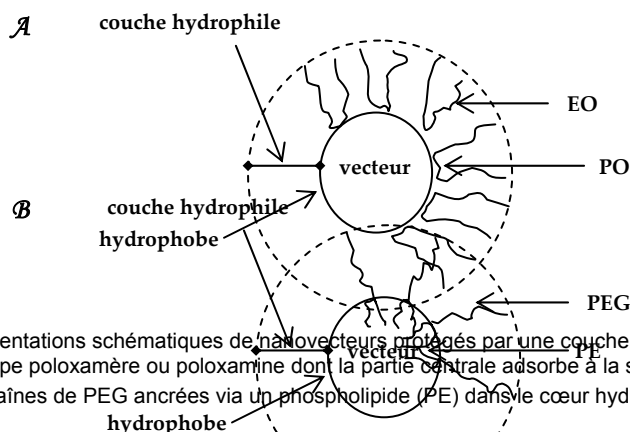


Figure 25. Représentations schématiques de nanovecteurs protégés par une couche polymérique constituée par **A.** un surfactant du type poloxamère ou poloxamine dont la partie centrale adsorbe à la surface du cœur hydrophobe ; soit par **B.** des chaînes de PEG ancrées via un phospholipide (PE) dans le cœur hydrophobe du colloïde.

Les études ont montré que l'ancrage de PEG par un phospholipide était beaucoup plus solide que l'adsorption des surfactants poloxamères ou poloxamines permettant ainsi une circulation beaucoup plus longue (de l'ordre de 20 h pour les PEG-liposomes). La stabilité de l'ancrage des PEG dépend à la fois de la longueur des chaînes alkyle hydrophobes du phospholipide mais également de la longueur de la chaîne polymérique du PEG. En effet, la stabilité est d'autant plus grande que la longueur des chaînes alkyle du phospholipide est grande ; par contre plus la chaîne PEG est longue et plus on observe une fuite du polymère. Par exemple, les chaînes palmitiques d'un phospholipide sont insuffisantes pour fixer un polymère PEG de l'ordre de 12-15 kDa à la surface d'un liposome. Il en résultera alors une perte graduelle de la couche protectrice de ces liposomes et une capture par le foie et la rate. L'importance de ces effets peut être interprétée par un équilibre entre l'énergie engendrée par l'interaction entre l'ancrage hydrophobe avec la membrane et l'énergie engendrée par les mouvements de la chaîne PEG dans le milieu aqueux (Torchilin VP, *et al.* 1994).

✖ Quel type de poly(éthylène glycol) utiliser ?

Des études se sont intéressées sur l'influence de l'insertion de différents types de poly(éthylène glycol) au niveau de la membrane colloïdale (Torchilin VP, *et al.* 1995). Ainsi, il a été démontré sur des liposomes que l'insertion de molécules comportant deux chaînes PEG (PEG₂-PE) induit une efficacité notable par rapport à l'insertion de PEG-PE quand on se place à 3 mol% (respectivement, 140 min et 80 min). Par contre, à partir de 7 mol%, les effets sur la clairance sanguine des liposomes sont pratiquement identiques (230 min).

Ces résultats peuvent s'expliquer par un recouvrement complet de la surface des liposomes par le monoPEG, PEG-PE, à 7 mol% et par l'obtention d'une protection stérique maximale. A cette concentration, il ne reste plus de place pour avoir un effet additionnel de l'excès de PEG contenu sur PEG₂-PE. Par conséquent, l'utilisation de chaînes polymériques ramifiées n'apporte pas un intérêt particulier par rapport à des chaînes linéaires.

En résumé, notre choix de polymère s'est dirigé vers l'insertion de poly(éthylène glycol) linéaires ancrés par un phospholipide, ayant la chaîne hydrophobe la plus longue possible. Il serait intéressant de voir l'influence de la taille des PEG sur le

comportement *in vivo* des nanocapsules lipidiques, par rapport au temps de circulation sanguine ou encore sur l'influence du ciblage. En ce qui concerne le phospholipide à employer, les meilleurs résultats obtenus sur les liposomes ont été engendrés par l'utilisation de la distéaroylphosphatidyléthanolamine ou DSPE (chaîne hydrophobe en C₁₇). Dans un premier temps, les tests de formulation ont ainsi été réalisés en utilisant les produits commerciaux (1,2-distéaroyl-*sn*-glycero-3-phosphoéthanolamine-*n*-[methoxy(polyéthylène glycol)-2000] ou DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe et 1,2-distéaroyl-*sn*-glycero-3-phosphoéthanolamine-*n*-[methoxy(polyéthylène glycol)-5000] ou DSPE-PEG₅₀₀₀-OMe).

II. NOUVELLES FORMULATIONS DES NANOCAPSULES LIPIDIQUES.

II.1. Matériels

Les formulations des nanocapsules lipidiques ont été réalisées à partir de la méthode décrite par Heurtault ([Heurtault B, et al. 2000 et 2002a](#)) et précédemment décrite dans le chapitre 1 (II.1.2). Les trois principaux constituants des nanocapsules lipidiques proviennent des produits commerciaux : Labrafac[®] WL 1349 de Gattefossé S.A. (Saint-Priest, France) ; Lipoïd[®] S75-3 de Lipoïd[®] GmbH (Lubwigshafen, Allemagne) ; Solutol[®] HS15 de BASF (Lubwigshafen, Allemagne). Par la suite, le Lipoïd[®] S75-3 a été remplacé par de la 1,2-distéaroyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DSPC), provenant de Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne), afin d'éviter des interactions avec la 1,2-distéaroyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyléthanolamine (DSPE), présente dans le Lipoïd[®] S75-3, lors des radiomarquages des nanocapsules lipidiques. Les tests de formulation avec les polymères pégylés amphiphiles ont été réalisés avec de la 1,2-distéaroyl-*sn*-glycero-3-phosphoéthanolamine-*n*-[methoxy(polyéthylène glycol)-2000], ou plus couramment DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe, et de la 1,2-distéaroyl-*sn*-glycero-3-phosphoéthanolamine-*n*-[methoxy(polyéthylène glycol)-5000], ou DSPE-PEG₅₀₀₀-OMe. Ces deux polymères ont été fournis par Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA). Les nanocapsules lipidiques ont été caractérisées par mesure de la dispersion de la lumière à l'aide d'un nanosizer HPPS[®] system (Malvern Instrument S.A., UK) avec un angle fixe de 180 degrés.

II.2. Méthode conventionnelle.

II.2.1. Formulation des nanocapsules lipidiques - Résultats.

La première approche pour l'addition de la DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe et de la DSPE-PEG₅₀₀₀-OMe a consisté à utiliser la méthode conventionnelle, c'est-à-dire d'ajouter des quantités croissantes de polymères à la mixture originelle et d'y appliquer les différentes transitions de phase. Pour que la masse de la mixture reste la même, il a

fallu ajuster par une quantité de produits déjà présents dans les nanocapsules lipidiques natives. Nous sommes partis du principe que puisque les polymères amphiphiles DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe et DSPE-PEG₅₀₀₀-OMe sont, du fait de leur structure, un mélange à la fois de Solutol® (constitué de PEG 660) et de Lipoïd® (constitué principalement de DSPC (70%) et de DSPE (9%)), il est alors logique d'utiliser ces deux constituants pour obtenir des nanocapsules lipidiques stables. Les résultats des différentes formulations obtenus sont résumés dans les Tableaux 7 & 8. Il est important de noter que ces deux tableaux respectent l'ordre établi lors de la pesée des composés.

Dans un premier temps, nous avons cherché à modifier uniquement la quantité de Solutol®. Les résultats des formulations ainsi obtenues ont montré une augmentation croissante de la taille des nanocapsules lipidiques jusqu'à ce qu'elles ne se forment plus à partir d'un certain taux de polymère (autour de 7% en masse de DSPE-PEG_n-OMe par rapport à la masse de Solutol®). Que ce soit avec des PEG₂₀₀₀ ou des PEG₅₀₀₀, les résultats suivent le même cheminement. Les tailles sont un peu plus grandes avec les PEG₅₀₀₀. Il est également important de noter que les transitions de phase sont beaucoup moins nettes au fur et à mesure de l'addition croissante des PEG.

Dans un second temps, afin d'augmenter davantage le taux de PEG, un test de formulation a été effectué sur les deux types de polymère en enlevant complètement le Lipoïd® S 75-3 (LNC 4 et 4') et en compensant à masse égale par de la DSPE-PEG_n-OMe. Les nanocapsules lipidiques se forment mais avec une taille importante et surtout un indice de polydispersité peu satisfaisant.

Au final, en jouant à la fois sur le Solutol® et le Lipoïd®, une formulation a été obtenue donnant des nanocapsules lipidiques de taille de l'ordre de 110 nm et un indice de polydispersité inférieur à 0,2.

Constituants des LNC	LNC natives	LNC 1	LNC 2	LNC 3	LNC 4	LNC 5
Solutol® HS 15 (mg)	423	412,5	406	393	423	415,5
DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe (mg)	Ø	10,5 (2,5%)	16,9 (4 %)	29,6 (7 %)	37,5	30
Lipoïd® S75-3 (mg)	37,5	37,5	37,5	37,5	Ø	15
<i>NaCl (mg)</i>	44,5	44,5	44,5	44,5	44,5	44,5
<i>Labrafac® WL 1349 (mg)</i>	514,5	514,5	514,5	514,5	514,5	514,5
<i>H₂O (ml)</i>	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48
<i>H₂O 0°C (ml)</i>	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25
Tailles (nm)	45,9 ± 0,06	55,2 ± 0,1	63,2 ± 0,2	Ø	171 ± 0,8	110,6 ± 0,1
Indice de polydispersité	0,05	0,08	0,09	Ø	0,69	0,17

Tableau 7. Résultats des formulations de nanocapsules lipidiques modifiées par la DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe.

Constituants des LNC	LNC natives	LNC 1'	LNC 2'	LNC 3'	LNC 4'	LNC 5'
Solutol® HS 15 (mg)	423	412,5	406	393	423	415,5
DSPE-PEG₅₀₀₀-OMe (mg)	Ø	10,5	16,9	29,6	37,5	30

Lipoïd® S75-3 (mg)	37,5	37,5	37,5	37,5	Ø	15
<i>NaCl (mg)</i>	44,5	44,5	44,5	44,5	44,5	44,5
<i>Labrafac® WL 1349 (mg)</i>	514,5	514,5	514,5	514,5	514,5	514,5
<i>H₂O (ml)</i>	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48
<i>H₂O 0°C (ml)</i>	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25
Tailles (nm)	45,9 ± 0,06	59,8 ± 0,34	70,8 ± 0,2	Ø	182 ± 1,0	111,3 ± 0,2
Indice de polydispersité	0,05	0,1	0,11	Ø	0,72	0,15

Tableau 8. Résultats des formulations de nanocapsules lipidiques modifiées par DSPE-PEG₅₀₀₀-OMe

A partir de ces dernières formulations (LNC 5 & 5'), une modification, importante par la suite, a été apportée en substituant le Lipoïd® S75-3 par de la DSPC. Les nanocapsules lipidiques ainsi formées (LNC 6 & 6') ont des tailles inférieures à celles obtenues précédemment (de l'ordre de 80-90 nm). Par la suite, cette modification permettra d'éviter lors de radiomarquages, notamment avec le Bolton-Hunter iodé, des interactions potentielles avec la fonction NH₂ de la DSPE présente dans le Lipoïd® S75-3.

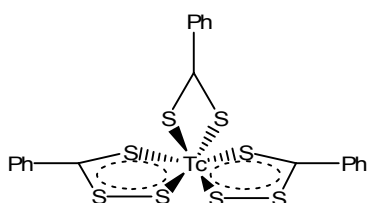
Ces dernières formulations (LNC 6 & 6') ont alors été radiomarquées à l'aide d'un complexe lipophile ^{99m}Tc-SSS afin d'étudier leur stabilité et leur comportement *in vivo*.

II.2.2. Etude des nanocapsules lipidiques modifiées.

II.2.2.1. Radiomarquage des LNC au ^{99m}Tc.

Les nanocapsules lipidiques modifiées LNC 6 & 6' ont été radiomarquées à l'aide du complexe lipophile bis(perthiobenzoato)(dithiobenzoato) de technétium (III) ou plus couramment appelé complexe ^{99m}Tc-SSS (Figure 26 **A**) selon la méthode décrite par Ballot (Ballot S, *et al.* 2006) sur des LNC natives. Ce complexe technétié a été étudié par Mévellec (Mévellec F, *et al.* 1998 ; 2001 ; 2002 ; 2003). Des études cristallographiques (Mévellec F, *et al.* 2002) ont montré que le métal se situe dans un environnement prisme trigonal constitué par les six atomes de soufre des deux ligands perthio- et du ligand dithiobenzoate (Figure 26 **B**).

A



B

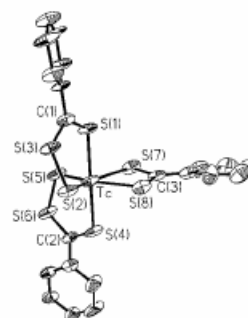


Figure 26. A. Représentation du complexe bis(perthiobenzoato)(dithiobenzoato) de technétium (III). **B.** Structure cristallographique du complexe (d'après Mévellec F, *et al.* 2002). Les atomes d'hydrogène ont été omis pour plus de clarté.

a. Synthèse du complexe lipophile ^{99m}Tc -SSS.

Le complexe technétié "SSS" est préparé à partir de $[\text{}^{99m}\text{Tc}]$ pertechnétate, $[\text{}^{99m}\text{Tc}^{\text{VII}}\text{O}_4]^-$, obtenu par élution du générateur $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ avec une solution de chlorure de sodium. Dans un premier temps, un complexe intermédiaire $[\text{}^{99m}\text{Tc}^{\text{VO}}(\text{gluc})_2]^-$ est généré in situ à l'aide d'un kit $\text{SnCl}_2/\text{gluconate}$ (Cis Bio International-Schering) après 10 minutes d'agitation à température ambiante. L'ajout d'un excès de ligand dithiobenzoate de sodium, PhCS_2Na , conduit au complexe final dont la structure est représentée Figure 26 A, après 30 minutes de chauffage à 100°C .

La pureté radiochimique est ensuite contrôlée par chromatographie sur couche mince (CCM) sur gel de silice éluée par un mélange éther / CH_2Cl_2 : 6/4. Les plaques CCM sont ensuite révélées par un phosphorimager (445SI Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France) (Figure 27). Le complexe migre à un R_f de 0,7 ; tandis que le pertechnétate $[\text{}^{99m}\text{Tc}^{\text{VII}}\text{O}_4]^-$ et l'intermédiaire $[\text{}^{99m}\text{Tc}^{\text{VO}}(\text{gluc})_2]^-$ ne migrent pas.

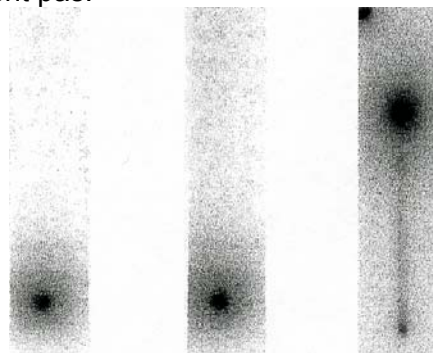


Figure 27. Profils chromatographiques éluant : $\text{Et}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$: 6/4. (a) $[\text{}^{99m}\text{Tc}^{\text{VII}}\text{O}_4]^-$ (b) $[\text{}^{99m}\text{Tc}^{\text{VO}}(\text{gluc})_2]^-$ (c) $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{S}_3\text{CPh})_2(\text{S}_2\text{CPh})]$.

Cette procédure nous a alors permis de faire la synthèse du complexe ^{99m}Tc -SSS avec une activité de 400 MBq.

b. Radiomarquage des nanocapsules lipidiques modifiées.

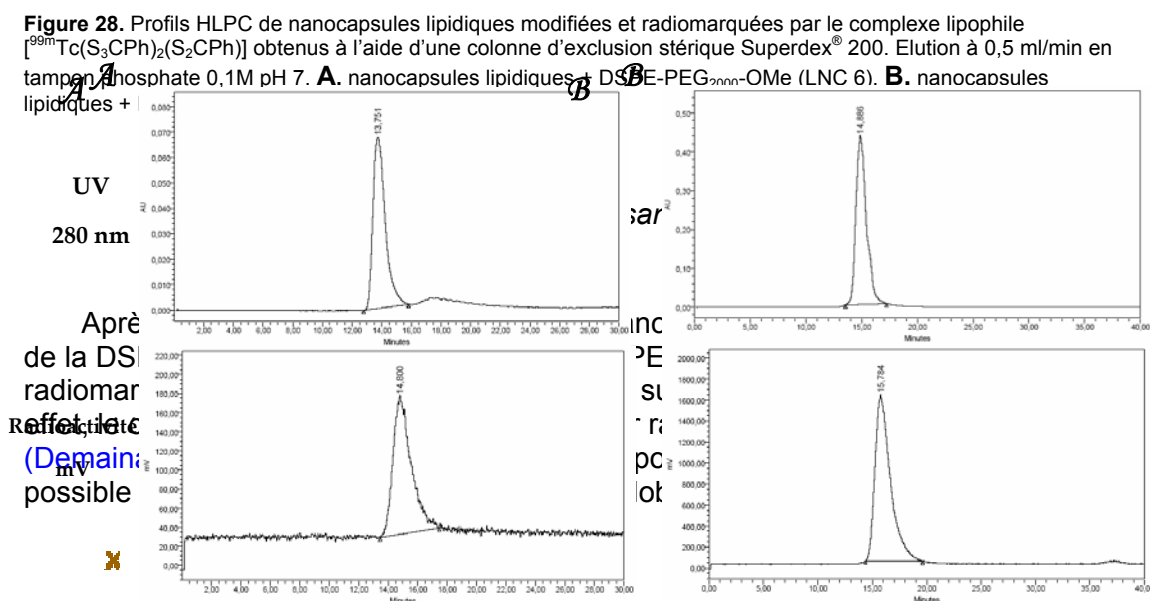
L'incorporation du complexe lipophile $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{S}_3\text{CPh})_2(\text{S}_2\text{CPh})]$ a été réalisée selon la procédure de Ballot (Ballot S, *et al.* 2006), par addition pendant la phase de préparation des nanocapsules lipidiques, en substituant les 1,48 ml d'eau de la formulation originelle par 1,48 ml d'une solution aqueuse du complexe.

Malheureusement, plusieurs expériences consécutives utilisant cette procédure ont montrées une perte d'activité récupérée dans la phase aqueuse. En effet, un précipité se forme au cours de la réaction correspondant au complexe final et reste fixé au flacon. Une partie du complexe reste néanmoins dans la phase aqueuse, correspondant à 30% de l'activité de départ. Afin de résoudre ce problème, une première approche a consisté à faire réagir des nanocapsules lipidiques préformées et de chauffer le mélange à 60°C permettant ainsi une incorporation du complexe lipophile dans le cœur lipidique. Cette méthode a permis une amélioration du rendement de marquage des LNC (60%) mais reste néanmoins insuffisante.

Ainsi, pour une récupération totale de l'activité, la solution finale a été de redissoudre le précipité provenant du complexe $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{S}_3\text{CPh})_2(\text{S}_2\text{CPh})]$ dans du CH_2Cl_2 . La solution organique ainsi récupérée est additionnée aux autres

constituants des nanocapsules lipidiques. L'évaporation du CH_2Cl_2 est considérée comme totale lors de la première phase de chauffage (jusqu'à 85°C). On applique ensuite les différents cycles de chauffage ($85-60-85-60-85^\circ\text{C}$) ; puis entre 75 et 70°C , une baisse brutale de la température est engendrée par addition de $6,25$ ml de H_2O à 0°C .

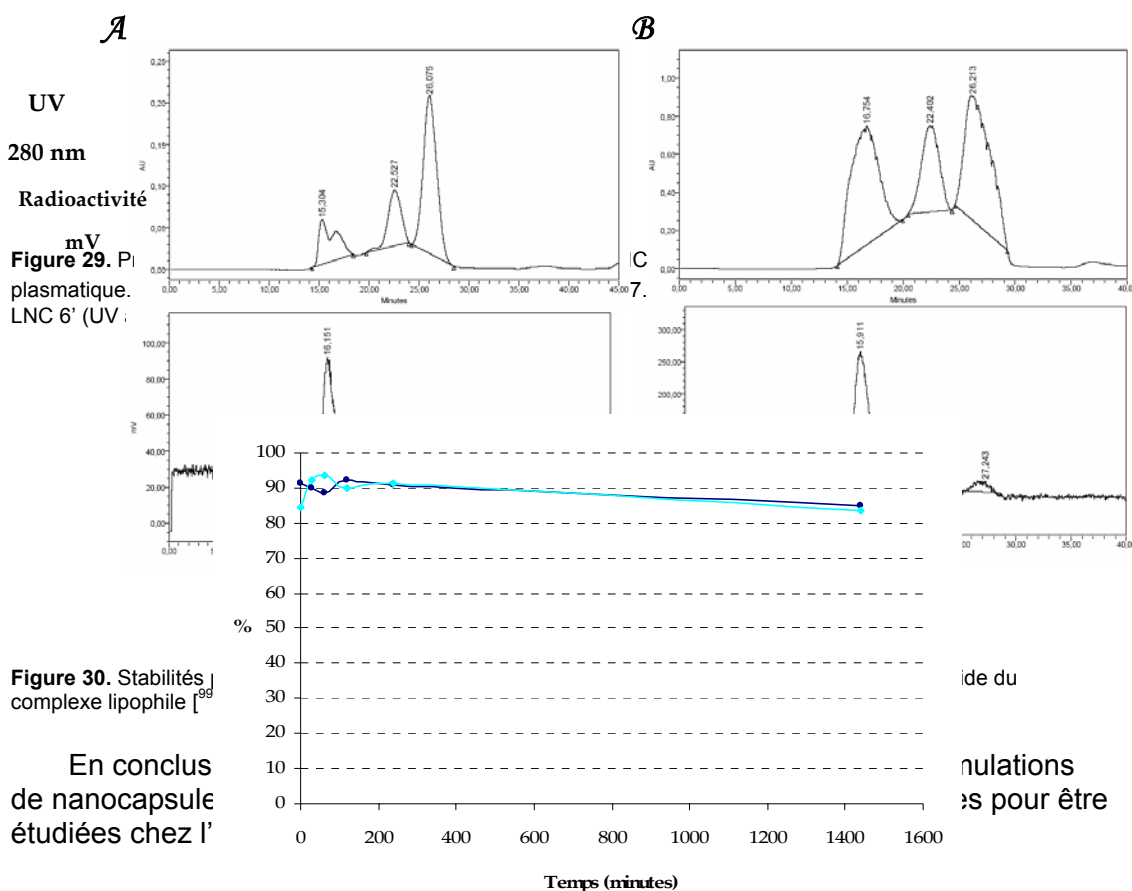
Les nanocapsules lipidiques ainsi formées sont ensuite dialysées pendant 1 heure (Spectra/POR, molecular weight cut-off: $50,000$) permettant au complexe lipophile non encapsulé d'être éliminé. L'activité retrouvée dans le bain de dialyse étant nulle, nous pouvons alors conclure que le complexe est entièrement associé à la nanocapsule lipidique. La Figure 28 montre les profils chromatographiques des nanocapsules lipidiques LNC 6 et LNC 6' radiomarquées au niveau de leur cœur lipidique à l'aide du complexe $[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{S}_3\text{CPh})_2(\text{S}_2\text{CPh})]$. Ces profils HPLC ont été obtenus par colonne chromatographique à exclusion stérique, Superdex® 200 (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France).



Les nanocapsules lipidiques sont ainsi mises en contact avec du sang humain ($50\ \mu\text{l}$ de LNC par ml de sang) dans un tube EDTA pour éviter une coagulation du sang. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C . A chaque temps (t_0 , 30 min, 1 h, 2h, 24h), 1ml de sang est prélevé, centrifugé à 5000 rpm pendant 2 minutes. Le plasma et le culot d'éléments figurés (globules rouges et globules blancs) sont séparés, pesés et la radioactivité associée est comptée à l'aide d'un compteur γ (1480 WIZARD® 3", PerkinElmer, Wallac Oy, Turku, Finland). Le plasma est ensuite filtré sur une membrane de $0,45\ \mu\text{m}$ MILLEX®-HV (Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland). Le plasma est injecté sur une colonne à exclusion stérique Superdex® 200 (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France) et est élué en tampon phosphate $0,1\text{M}$ pH 7. Du fait de la rapide décroissance de l'activité du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ contenue dans chaque échantillon de plasma, les volumes d'injection HPLC de plasma sont variables (de $25\ \mu\text{l}$ à t_0 jusqu'à $200\ \mu\text{l}$ à 24h).

✂ Résultats.

Après centrifugation des échantillons de sang, une faible activité se retrouve associée aux éléments figurés (<10%). Au niveau du plasma, des échanges sont possibles entre le complexe technétié, au niveau du cœur lipidique des nanocapsules, et des molécules complexantes présentes dans le plasma telles que les porphyrines, ou bien par fixation sur des protéines plasmatiques telles que l'albumine. La Figure 29 représente les différents profils chromatographiques des nanocapsules lipidiques LNC 6 et LNC 6' radiomarquées au ^{99m}Tc en milieu plasmatique. Ces profils HPLC ont été obtenus par colonne chromatographique à exclusion stérique, Superdex® 200 (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France), éluée en tampon phosphate 0,1M pH 7. Les résultats de stabilité plasmatique sont résumés par la Figure 30. Ainsi, jusqu'à 24 heures, la majeure partie du radiomarquage est associée aux nanocapsules lipidiques (> 85 %).



II.2.2.3. Résultats des études in vivo.

Les modèles animaux utilisés pour les études de biodistribution dans des systèmes de précipilage sont d'origine murine. Pour évaluer le taux de fixation sur les tumeurs, des cellules cancéreuses sont inoculées à des souris immunodéprimées, les souris *nude*.

Une première expérimentation a été menée à Angers, au tout début de nos travaux de recherche, afin d'évaluer le comportement des nanocapsules lipidiques chez la souris *balb-c* par addition de DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe (2,5% en masse par rapport au solutol® : LNC 1). Ainsi, des nanocapsules lipidiques natives et LNC 1 ont été radiomarquées à l'aide du complexe technétié. 100 µl de LNC dialysées ont été

injectés par souris (3 souris par temps). A chaque temps, les souris sont sacrifiées ; les organes pesés et comptés. Les résultats ainsi obtenus sont retranscrits Figure 31.

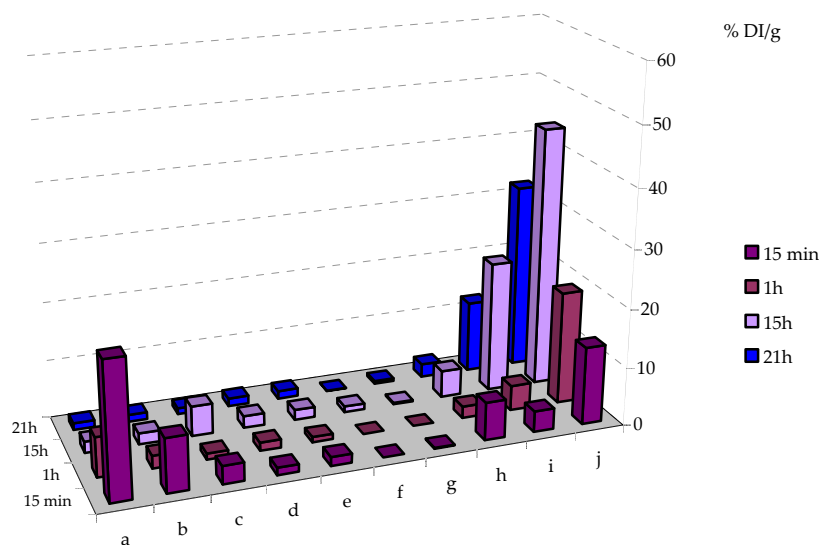
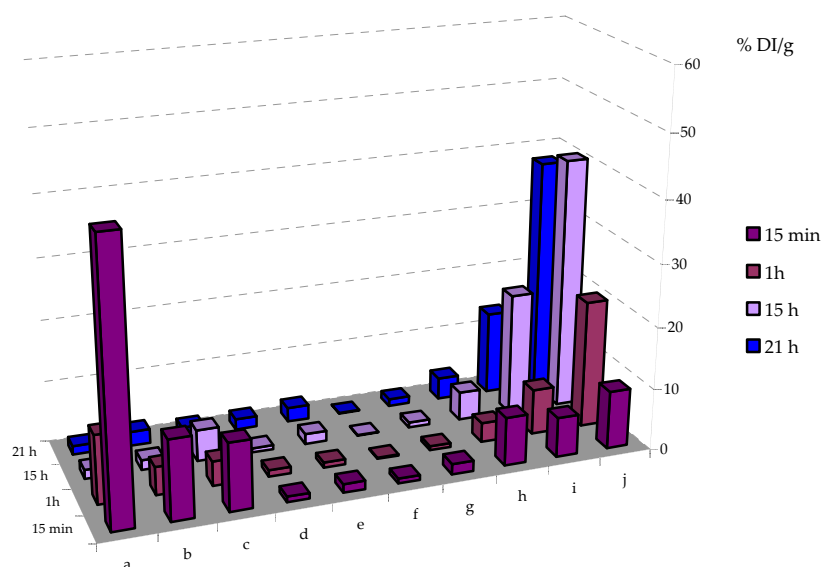
A**B**

Figure 31. Résultats de biodistributions de nanocapsules lipidiques natives (**A**) et modifiées avec 2,5% DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe (**B**) chez la souris balb-c, dans les organes suivants : a : sang ; b : poumons ; c : cœur ; d : estomac ; e : intestin ; f : cerveau ; g : muscle ; h : reins ; i : rate ; j : foie. Les valeurs sont exprimées en % de la dose injectée par gramme d'organe.

Ces premiers résultats *in vivo* montrent une augmentation du temps de circulation au niveau sanguin (à 15 minutes, on a 23% de la dose injectée par g (DI/g) de sang pour les LNC natives contre 44% DI/g de sang pour les LNC modifiées) ; quant aux captures hépatiques et spléniques, elles restent du même ordre de grandeur. Nous pouvons remarquer une fixation non négligeable au niveau de l'intestin qui est légèrement augmentée par addition de DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe dans la formulation.

Ainsi, des études de cinétiques sanguines ont été menées sur des souris *balb-c*, permettant ainsi des prélèvements à chaque temps sur une même souris. Les formulations optimales de nanocapsules lipidiques, contenant de la DSPE-PEG₂₀₀₀-

OMe et de la DSPE-PEG₅₀₀₀-OMe, ont été radiomarquées par la méthode conventionnelle à l'aide du complexe [^{99m}Tc(S₃CPh)₂(S₂CPh)]. 100 µl de ces LNC dialysées sont ensuite injectés aux souris. A chaque temps, le sang des souris est prélevé dans le sinus oculaire. A la fin, les souris sont sacrifiées et exsangues. Les résultats de cinétiques sanguines sont ainsi représentés dans la Figure 32.

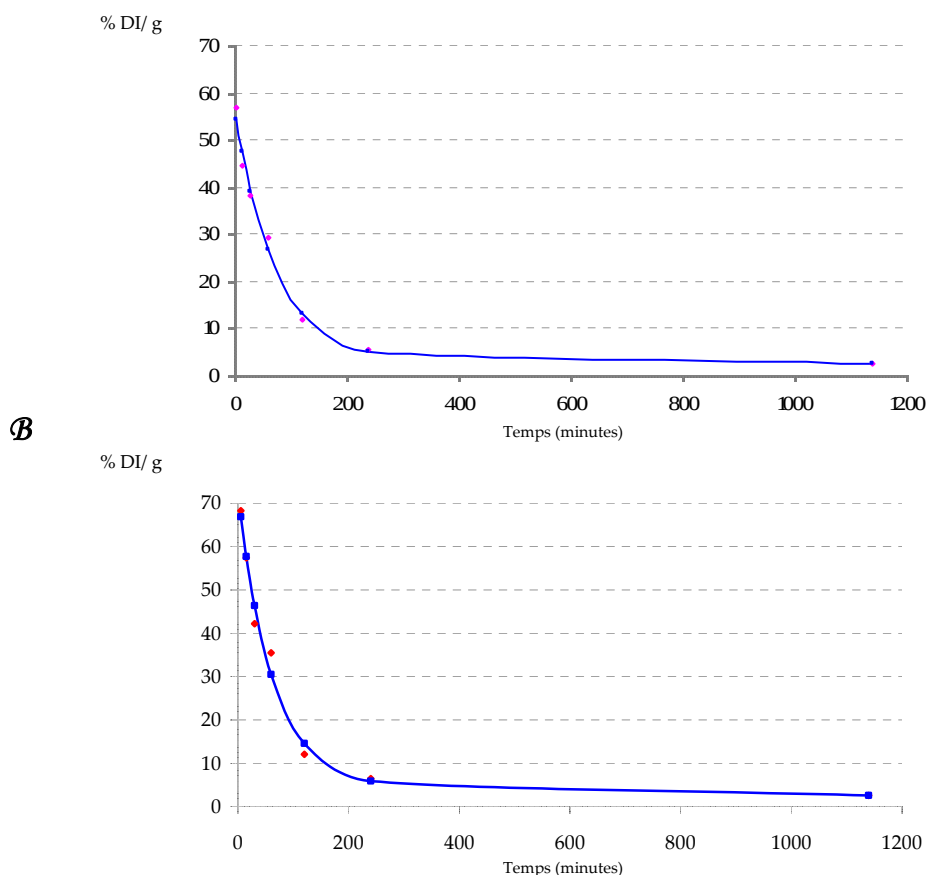


Figure 32. Cinétiques sanguines de nanocapsules lipidiques radiomarquées par [^{99m}Tc(S₃CPh)₂(S₂CPh)] et modifiées (**A**) par de DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe (**B**) par de la DSPE-PEG₅₀₀₀-OMe. Les valeurs sont exprimées en % de la dose injectée par gramme de sang.

Ainsi, les résultats obtenus avec les formulations optimales selon la méthode conventionnelle montrent, après calculs des temps de demi-vies sanguines, une différence significative par rapport aux nanocapsules lipidiques natives (inférieure à 30 minutes pour les natives ; 49 minutes pour les LNC DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe et 43 minutes pour les LNC DSPE-PEG₅₀₀₀-OMe). Les nanocapsules lipidiques contenant de la DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe circulent plus longtemps que la formulation élaborée avec de la DSPE-PEG₅₀₀₀-OMe. Une quantité massique maximale peut être introduite dans la formulation selon la méthode conventionnelle. Du point de vue molaire, on introduit plus de DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe que de DSPE-PEG₅₀₀₀-OMe ce qui va permettre un meilleur recouvrement surfacique des nanocapsules lipidiques. La différence de longueur de poly(éthylène glycol) de la DSPE-PEG₅₀₀₀-OMe ne compense pas ce manque.

Une augmentation du temps de circulation au niveau sanguin est observée par addition de DSPE-PEG_n-OMe mais elle est relativement faible. Ainsi, une autre méthode d'insertion de "constructs" pégylés a été envisagée permettant une amélioration impressionnante du coating.

II.3. Méthode dite de “post-insertion”.

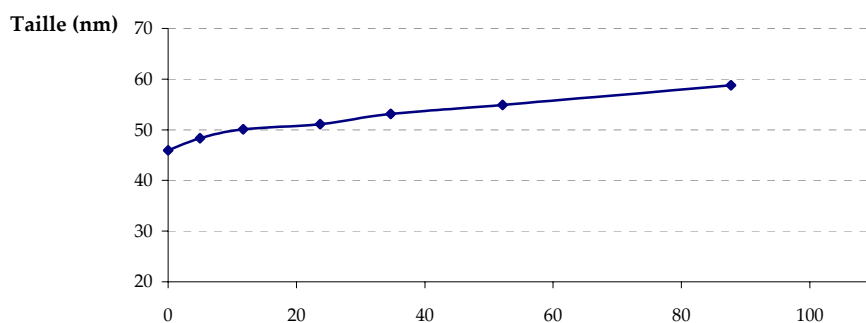
Cette méthode a été décrite surtout sur les liposomes (Uster PS, *et al.* 1996 ; Sou K, *et al.* 2000) et très récemment sur des nanocapsules lipidiques (Hoarau D, *et al.* 2004 ; Khalid MN, *et al.* 2006). Cette nouvelle approche consiste à insérer sur des vésicules préformées une solution micellaire de DSPE-PEG_n-OMe.

II.3.1. Préparation des nanocapsules lipidiques par “post-insertion”.

Cette méthode nécessite plusieurs phases. La quantité désirée de DSPE-PEG_n-OMe est additionnée aux nanocapsules lipidiques. La solution ainsi obtenue est chauffée à 60°C pendant 90 minutes en vortexant toutes les 15 minutes. On procède ensuite à un refroidissement brusque dans un bain de glace pendant 1 minute.

Pour éviter une trop grande dilution des nanocapsules lipidiques, nous avons modifié légèrement la procédure en utilisant non pas une solution micellaire mais les produits sous forme solide. Ainsi, des quantités croissantes de DSPE-PEG_n-OMe ont été placées dans des tubes. 1 ml de nanocapsules lipidiques natives est ensuite ajouté dans chaque tube. Après l'étape de chauffage / refroidissement, des mesures de tailles ont été effectuées. La Figure 33 résume ainsi les données obtenues par cette méthode.

A



B

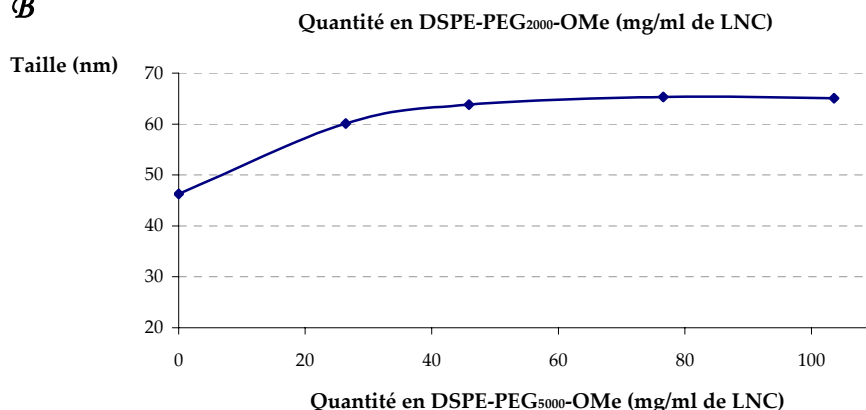


Figure 33. Evolutions de la taille des nanocapsules lipidiques modifiées par “post-insertion” de quantités croissantes de DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe (**A**) et de DSPE-PEG₅₀₀₀-OMe (**B**).

Les résultats obtenus sont très intéressants puisque comparés à la méthode conventionnelle, où l'on obtient une concentration de l'ordre de 3,4 mg / ml de LNC, on améliore largement le taux d'insertion de DSPE-PEG_n-OMe (jusqu'à 26 fois pour la DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe). Toutefois, les résultats sont différents selon la longueur de

la chaîne pégylée. En ce qui concerne la DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe, la taille des nanocapsules lipidiques croît linéairement avec la quantité ajoutée. Par contre, avec la DSPE-PEG₅₀₀₀-OMe, on observe une croissance rapide et une saturation de la taille. A partir du point de saturation, l'excès de DSPE-PEG₅₀₀₀-OMe est insoluble et forme un gel au fond du tube.

Ainsi, un meilleur recouvrement des nanocapsules lipidiques est obtenu avec la DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe. Ceci peut s'expliquer par l'encombrement stérique plus important sur la DSPE-PEG₅₀₀₀-OMe qui est une barrière à l'insertion du "construct". Une autre hypothèse peut également expliquer ce résultat. Etant donné que les PEG sont avides d'eau, l'insertion de chaînes plus longues nécessiterait une dilution des nanocapsules lipidiques plus importante. Dans le cas d'une utilisation en radiothérapie, cette dilution serait en défaveur de l'activité spécifique injectée.

Cependant, les résultats obtenus jusqu'à 30 mg/ml de LNC peuvent contribuer largement à l'amélioration de la cinétique sanguine.

II.3.2. Radiomarquage au ^{99m}Tc – Résultats des stabilités sanguines.

Le radiomarquage à l'aide du complexe lipophile [^{99m}Tc(S₃CPh)₂(S₂CPh)] a été réalisé sur une formulation de nanocapsules lipidiques natives, selon la procédure décrite précédemment (chapitre 2 - II.2.2.1.). Ainsi, 400 MBq du complexe technétié ont été ajoutés à la préparation de nanocapsules lipidiques natives par une dissolution au préalable dans du CH₂Cl₂. Après dialyse des nanocapsules lipidiques durant 1h, 30 mg de DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe et de DSPE-PEG₅₀₀₀-OMe sont ajoutés à 1ml de LNC natives radiomarquées. La procédure de "post-insertion" est appliquée par chauffage à 60°C pendant 90 minutes et 1 minute à 0°C.

Une étude de stabilité sanguine a été menée sur ces nanocapsules lipidiques modifiées de la même manière que précédemment (chapitre 2 – II.2.2.2.). Les résultats de stabilité sont équivalents à ceux obtenus avec la méthode conventionnelle. Ainsi, des études *in vivo* pourront être menées prochainement.

II.4. Conclusion.

De nouvelles formulations de nanocapsules lipidiques ont été mises au point permettant l'insertion d'une quantité importante de longues chaînes poly(éthylène glycol) à la surface des colloïdes en vue de prolonger leur temps de résidence au niveau sanguin. Afin de suivre les nanocapsules lipidiques *in vivo*, celles-ci ont été radiomarquées à l'aide d'un complexe lipophile [^{99m}Tc(S₃CPh)₂(S₂CPh)] synthétisé à partir des réactifs fournis par l'équipe de Nicolas Noiret. Ces nouvelles formulations ont montré une bonne stabilité sanguine et plasmatique jusqu'à 24h. Cette stabilité ainsi établie, des études de cinétiques sanguines chez la souris ont démontré que l'addition de telles structures polymériques en quantité relativement faible engendrait déjà une prolongation significative de la ½ vie sanguine. Des études *in vivo* devront être poursuivies sur des nanocapsules lipidiques avec une concentration plus importante en PEG à leur surface pour ainsi confirmer l'hypothèse d'une nette amélioration de la cinétique sanguine.

CHAPITRE 3.SYNTHESES DES “CONSTRUCTS” .

I. SYNTHÈSE DU “CONSTRUCT” INTERMÉDIAIRE DSPE-PEG_N-NH₂.

I.1. Brève revue bibliographique.

Depuis ces vingt dernières années, de nombreux travaux, plus particulièrement sur les liposomes, ont été réalisés pour rendre immunosécifiques les particules possédant des structures poly(éthylène glycol) (Leserman LD, *et al.* 1980 ; Martin FJ, *et al.* 1981 ; 1982). Une première approche a consisté à fonctionnaliser des lipides membranaires, tels que la 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyléthanolamine ou DSPE, permettant le couplage d'anticorps ou de fragments d'anticorps directement sur la membrane des particules (Figure 34-A). Il a été démontré que la présence de structures poly(éthylène glycol) à la surface de telles immunoparticules inhibe l'interaction antigène-anticorps. Cette inhibition est d'autant plus importante que la chaîne PEG est longue (PEG₅₀₀₀ > PEG₂₀₀₀) (Klibanov AL, *et al.* 1991 ; Maruyama K, 2002). Pour éviter ce problème d'inhibition due à l'encombrement stérique des chaînes PEG, les anticorps ont été placés à l'extrémité hydrophile des poly(éthylène glycol) (Figure 34-B).

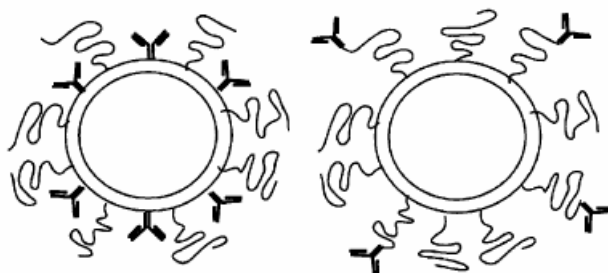


Figure 34. Schématisation d'immunoliposomes pégylés. **A.** Couplage d'anticorps directement sur la membrane des liposomes. **B.** Anticorps à l'extrémité hydrophile des poly(éthylène glycol). (d'après Maruyama K, 2002).

Les structures amphiphiles pégylées utilisées pour rendre furtifs les vecteurs colloïdaux (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*n*-methoxy (poly ethylene glycol) ou mPEG-DSPE) sont inertes à toutes modifications chimiques permettant l'introduction d'anticorps en raison du groupement méthoxy en bout de chaîne. Ainsi, pour rendre le couplage d'anticorps possible, des modifications chimiques à partir de poly(éthylène glycol) (HO-PEG_n-OH) ont été élaborées (Zalipsky S, *et al.* 1995a ; 1995b ; 1996) permettant l'obtention de molécules finales amphiphiles réactives. Ainsi, pour faire le lien à la fois entre la structure polymérique PEG et la partie lipophile (constituée par la 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyléthanolamine ou DSPE), mais également entre le PEG et la fonction de couplage en bout de chaîne, différents “linkers” ont été utilisés. Le Tableau 9 énumère les différentes structures synthétisées par Zalipsky qui ont permis le couplage d'anticorps sur des liposomes.

X—Linker A—PEG—Linker B—DSPE			
X	Linker A	Linker B	Applications

CH ₃ -O	Ø		✖ Utilisé dans les formulations pour prolonger le temps de circulation. ✖ pas de couplage possible.
H ₂ N-	Ø		✖ Rend les particules chargées positivement. ✖ Fonctionnalisation des chaînes PEG par réaction sur l'amine (Zalipsky S, <i>et al.</i> 1994 ; 1995a).
			✖ Couplage de l'hydrazone avec les aldéhydes des résidus carbohydrates présents sur les anticorps (Zalipsky S. 1993 ; 1995a).
			✖ Précurseur du HS-PEG-DSPE qui permet un couplage très efficace de l'extrémité de la chaîne PEG sur les anticorps possédant une fonction maléimide (Allen TM, <i>et al.</i> 1995 ; Zalipsky S. 1995a). ✖ Réaction avec les ligands ayant des -SH pour former une liaison disulfide S-S.
	Ø		✖ Couplage de Fab'-SH à l'extrémité de la chaîne PEG (Zalipsky S. 1995a).
	Ø		✖ Couplage de protéines ou d'anticorps (Maruyama K, <i>et al.</i> 1995).

Tableau 9. Différentes structures PEG-lipides fonctionnalisées en bout de chaînes. (Zalipsky S, *et al.* 1996)

En ce qui concerne le ciblage en deux temps de nanocapsules lipidiques, l'anticorps et le radionucléide doivent être dissociés afin de diminuer la toxicité due à une trop longue circulation de la radioactivité (2 à 3 jours). Le ciblage vers la tumeur sera rendu possible grâce à l'introduction d'un haptène à l'extrémité hydrophile de la chaîne poly(éthylène glycol). Ainsi, parmi les structures décrites dans le Tableau 9, la fonction amine est la plus intéressante du fait de sa forte réactivité vis-à-vis de fonctions du type isothiocyanate ($-N=C=S$), esters activés (*N*-hydroxysuccinimide, anhydride d'acide...) couramment utilisées pour le couplage d'haptènes et d'agents chélatants.

1.2. Stratégie de synthèse.

Pour obtenir l'intermédiaire DSPE-PEG_n-NH₂ (Figure 35), des modifications de la structure poly(éthylène glycol) sont nécessaires. Ces structures poly(éthylène glycol), de formule générale HO-CH₂-(CH₂-O-CH₂)_n-CH₂-OH, sont commercialisées avec des poids moléculaires très variés et une dispersité relativement faible ($M_w/M_n \leq 1,1$). Ainsi, différentes chaînes de PEG peuvent être modifiées pour donner les intermédiaires DSPE-PEG_n-NH₂ correspondants. En ce qui concerne la synthèse des différents “constructs”, deux longueurs de poly(éthylène glycol) ont été choisies pour les études *in vivo* finales des nanocapsules lipidiques : PEG₂₀₀₀ et PEG₅₀₀₀.

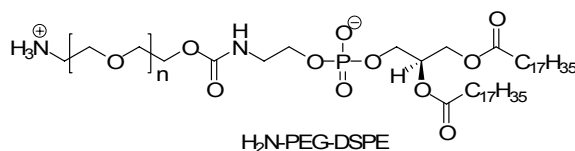


Figure 35. Structure de l'intermédiaire DSPE-PEG_n-NH₂ permettant l'introduction de ligands en bout de chaîne.

La première étape consiste tout d'abord à introduire sélectivement une amine sur une seule position de la chaîne PEG. Pour permettre une activation du groupement hydroxy sur le côté opposé, il est nécessaire de protéger la fonction amine au préalable. Cette activation, généralement réalisée avec de la *N,N*-disuccinimidylcarbonate, permet la création d'une liaison carbamate, stable *in vivo*, entre la fonction OH du PEG et l'amine du lipide, 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-

phosphatidyléthanolamine ou DSPE. L'étape finale dans la synthèse de l'intermédiaire consiste en la déprotection de l'amine, fonction réactive permettant l'introduction de ligands, tels que des haptènes ou des agents chélatants, à l'extrémité hydrophile des PEG. La Figure 36 schématise le principe de la synthèse de l'intermédiaire DSPE-PEG_n-NH₂ à partir de poly(éthylène glycol) non fonctionnalisés de formule générale : HO-CH₂-(CH₂-O-CH₂)_n-CH₂-OH.

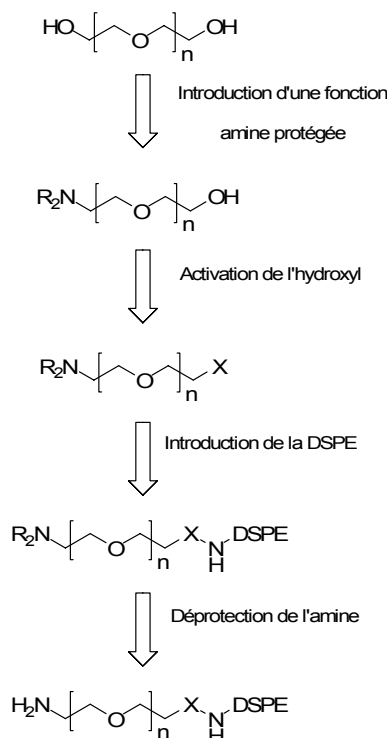


Figure 36. Stratégie de synthèse de l'intermédiaire DSPE-PEG_n-NH₂.

D'après la littérature, Zalipsky a été le précurseur dans la modification de chaînes poly(éthylène glycol) permettant sur ces chaînes amphiphiles de synthèse le couplage d'anticorps ou de protéines (Zalipsky S, *et al.* 1993 ; 1994 ; 1995a ; 1995b ; 1996). Ainsi, il a mis au point une voie de synthèse de l'intermédiaire DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ à partir de α -amino- ω -hydroxy-PEG (Figure 37).

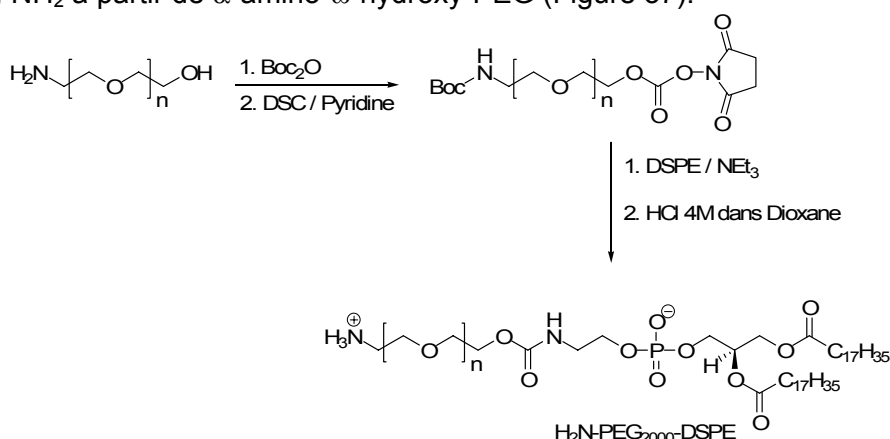


Figure 37. Synthèse de la DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ décrite par Zalipsky (Zalipsky S, *et al.* 1993 ; 1995a) à partir de la α -amino- ω -hydroxy-PEG₂₀₀₀.

L' α -amino- ω -hydroxy-PEG₂₀₀₀ a été obtenu à partir du poly(éthylène glycol)-2000 d'après la synthèse de Furukawa (Furukawa S, *et al.* 1980) schématisée Figure 38. L'introduction de la fonction amine sur la chaîne polymérique a été réalisée par

addition d'un bon groupe partant (ici, tosyl), puis par introduction d'une amine masquée par un groupement phtalimide et déprotection par de l'hydrazine monohydrate. Les produits obtenus de chaque étape sont engagés dans la réaction suivante sans purification. Au final, il en résulte un mélange de PEG indéterminé qui est purifié sur une colonne chromatographique échangeuse de cations.

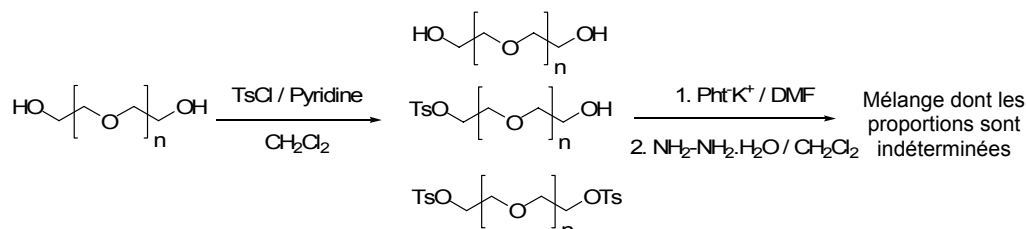


Figure 38. Synthèse de α -amino- ω -hydroxy-PEG (Furukawa S, *et al.* 1980).

Dans un premier temps, il nous a semblé intéressant de refaire cette synthèse décrite par Furukawa et Zalipsky en améliorant étape par étape les conditions de synthèse et les méthodes de purification.

1.3. Optimisation de la synthèse.

1.3.1. Optimisation de la voie de synthèse décrite par Zalipsky.

1.3.1.1. Première étape : synthèse des α -amino- ω -hydroxy-PEGs.

Cette première étape dans la synthèse des "constructs" a été réalisée en parallèle à partir des matières premières disponibles dans le commerce : $\text{HO-PEG}_{2000}\text{-OH}$ et $\text{HO-PEG}_{6000}\text{-OH}$. Ce dernier a été choisi à défaut d'avoir le PEG_{5000} correspondant au polymère amphiphile $\text{DSPE-PEG}_{5000}\text{-OMe}$, commercialisé chez Avanti Polar Lipid Inc. (Alabaster, AL, USA), qui a été précédemment utilisé dans les formulations de nanocapsules lipidiques. De plus, des études de spectrométrie de masse menées sur MALDI-TOF ont montrées une masse moyenne du polymère plus proche de 5500 que de 6000.

Cette première étape mime la synthèse des amines primaires de Gabriel (Ragnarsson U, *et al.* 1991). En effet, la séquence de réactions implique la conversion d'un OH terminal en un groupement tosyl, bon groupement partant, qui permettra l'introduction de l'amine grâce à une substitution nucléophile par un groupement phtalimide suivie d'une déprotection finale par hydrazinolyse.

Il est également important de noter que toutes les réactions concernant les PEG doivent être effectuées dans des conditions anhydres à cause de la forte avidité des PEG pour l'eau ce qui va diminuer les rendements de réactions.

a) Etape de tosylation.

Cette première étape est décisive pour la suite de la synthèse puisqu'il faut activer sélectivement un seul groupement hydroxyle des PEG de départ. Cette étape va

nécessiter une purification optimale pour éviter de se retrouver avec un mélange au final indéterminé et permettre un meilleur rendement global.

La méthode de tosylation utilisée par Furukawa (Figure 38) est relativement lente étant données les conditions appliquées (chlorure de tosylo/pyridine/ CH_2Cl_2 /reflux pendant 22h). D'après la littérature, plusieurs méthodes de tosylation de groupement hydroxyle peuvent augmenter la cinétique de la réaction par rapport à la méthode traditionnelle en présence de pyridine. Ainsi, plusieurs essais de tosylation ont été appliqués sur les PEGs tels que la tosylation en milieu biphasique $\text{H}_2\text{O}/\text{NaOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ décrite par Fishman (Fishman A, *et al.* 2003). Mais la méthode (Figure 39) qui a donné les meilleurs résultats a été rapportée par Yoshida (Yoshida Y, *et al.* 1999). Cette réaction de tosylation est applicable sur des alcools primaires et secondaires. L'avantage de cette méthode est l'augmentation de la cinétique de la réaction tout en utilisant des conditions douces ($0-5^\circ\text{C}$ pendant 2h).

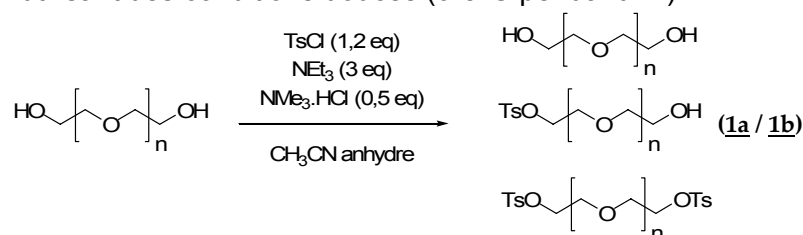


Figure 39. Méthode de tosylation de Yoshida appliquée sur les PEGs.

L'absence du sel de triméthylamine $\text{NMe}_3\cdot\text{HCl}$ diminue fortement la cinétique de la réaction. La dynamique de cette réaction s'explique certainement par un cycle catalytique qui est décrit Figure 40. La triéthylamine NEt_3 neutralise le sel $\text{NMe}_3\cdot\text{HCl}$ pour donner la NMe_3 . Du fait de la plus forte basicité de la NEt_3 par rapport à celle de la NMe_3 , l'équilibre de la réaction (a) est déplacée vers la droite. Ainsi, la NMe_3 générée in situ réagit avec le chlorure de tosylo TsCl pour former le sel $\text{TsN}^+\text{Me}_3\text{Cl}^-$ qui est très réactif.

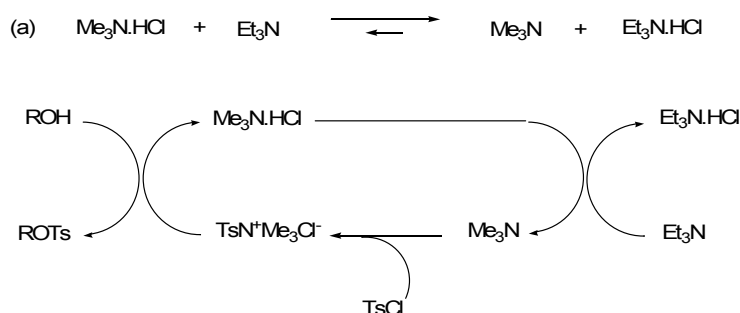


Figure 40. Mécanisme possible du cycle catalytique de tosylation.

La monotosylation a été obtenue à partir des PEG_{2000} et PEG_{6000} , après purification sur colonne chromatographique sur silice (Eluant : CHCl_3 / MeOH : 9/1), avec des rendements respectifs de 55% (**1a**) et 41% (**1b**) ; les produits secondaires étant composés d'une majorité de produits de départ et d'une quantité minime de leurs composés ditosylés respectifs (de l'ordre de 10%). La différence entre les deux composés tosylés est surtout visible en RMN^{13}C (Figure 41).

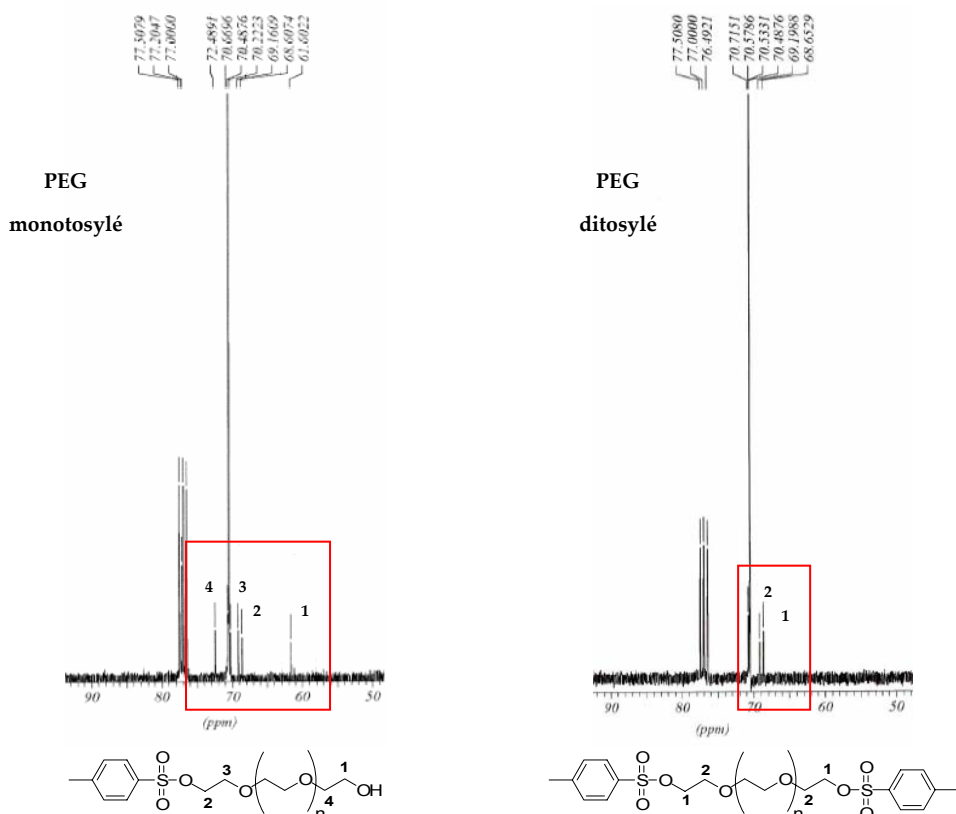


Figure 41. Parties caractéristiques en RMN ^{13}C permettant de distinguer le composé monotosylé du ditosylé.

b) Introduction de l'amine.

✗ Substitution nucléophile de type 2 par un groupement phthalimide.

Les conditions utilisées par Furukawa pour cette étape sont drastiques (120°C dans le DMF) et la cinétique de la réaction est très lente (3 jours). Afin d'augmenter la nucléophilie du groupement phthalimide, une dissociation avec le cation potassium doit être réalisée. Pour cela, un éther couronne (15-crown-5), dont la cavité étant connue pour chélater le cation K^+ , a été utilisé pour favoriser la réaction. Les solvants associés doivent être apolaires et aprotiques. Ainsi, la réaction a été menée dans l'acétonitrile anhydre.

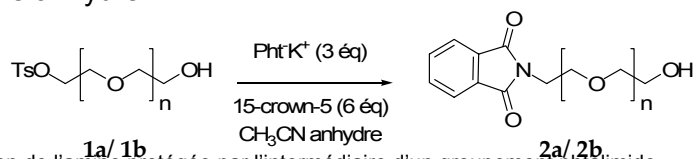


Figure 42. Introduction de l'amine protégée par l'intermédiaire d'un groupement phthalimide.

Ainsi, en se plaçant dans des conditions douces (température ambiante), les produits désirés **2a** et **2b** ont été obtenus dans les deux cas quasi-quantitativement après 1h de réaction.

✗ Déprotection de l'amine par hydrazinolyse.

L'étape finale dans la modification de poly(éthylène glycol) en α -amino- ω -hydroxy-PEG **3a** et **3b** est la déprotection du groupement phthalimide par hydrazinolyse (Figure 43).

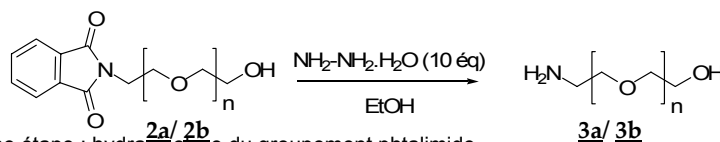


Figure 43. Troisième étape : hydrazinolyse du groupement phthalimide.

Cette étape nécessite obligatoirement la présence d'hydrazine. En effet, le mécanisme de la réaction de déprotection implique deux ruptures de liaisons (Figure 44). La première rupture est plus rapide que la seconde puisque le premier agent acylant est une imide et le second est une amide (les amides étant presque inertes aux substitutions nucléophiles). Cependant, l'amide réagit pour donner la diacylhydrazide **A**. Ceci s'explique par le fait qu'elle réagisse dans une réaction intramoléculaire avec un état de transition à six chaînons qui est beaucoup plus rapide qu'une réaction intermoléculaire analogue. Ainsi, une rupture de la liaison amidique avec NH_3 ne serait pas réalisable dans de telles conditions puisque cela implique une réaction intermoléculaire.

Le produit secondaire de la réaction de déprotection de la fonction amine, présente sur les PEG, est uniquement l'hydrazine-1,2-diacylée **A** et non pas l'hydrazine diacylée **B**. Ceci s'explique par la délocalisation de la paire électronique du NH qui, par conséquent, est moins réactive que celle présente sur le NH_2 de l'hydrazine.

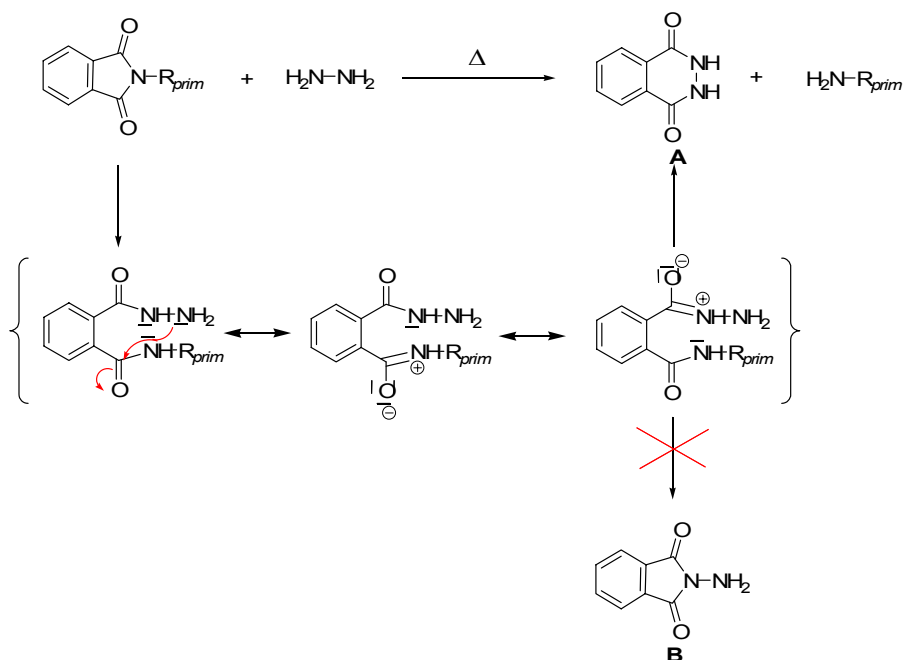


Figure 44. Mécanisme de la déprotection de l'amine d'après la synthèse de Gabriel d'alkylamines primaires.

Ainsi, les dérivés aminés des poly(éthylène glycols) **3a** et **3b** de départ sont obtenus quasi-quantitativement dans les deux cas après 6h de réaction à reflux de l'éthanol absolu.

1.3.1.2. Introduction de la DSPE- NH_2 .

Une fois les α -amino- ω -hydroxy-PEGs **3a** et **3b** synthétisés, la 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyléthanolamine (DSPE- NH_2) est introduite selon la méthode de Zalipsky. Pour permettre la réaction entre l'amine du phospholipide et le groupement

hydroxyle du poly(éthylène glycol), une protection de la fonction amine du PEG suivie d'une activation de l'alcool primaire doivent être réalisées au préalable. Ainsi, selon la méthode de Zalipsky, l'agent de protection de la fonction amine utilisé est le tert-butoxycarbonyl (Boc) pour donner les composés **4a** et **4b**, tandis que l'activation de la fonction hydroxyle est assurée par la *N,N*-disuccinimidylcarbonate (**5a/ 5b**) qui permet la création d'une liaison carbamate lors du couplage avec la DSPE-NH₂ (Figure 45).

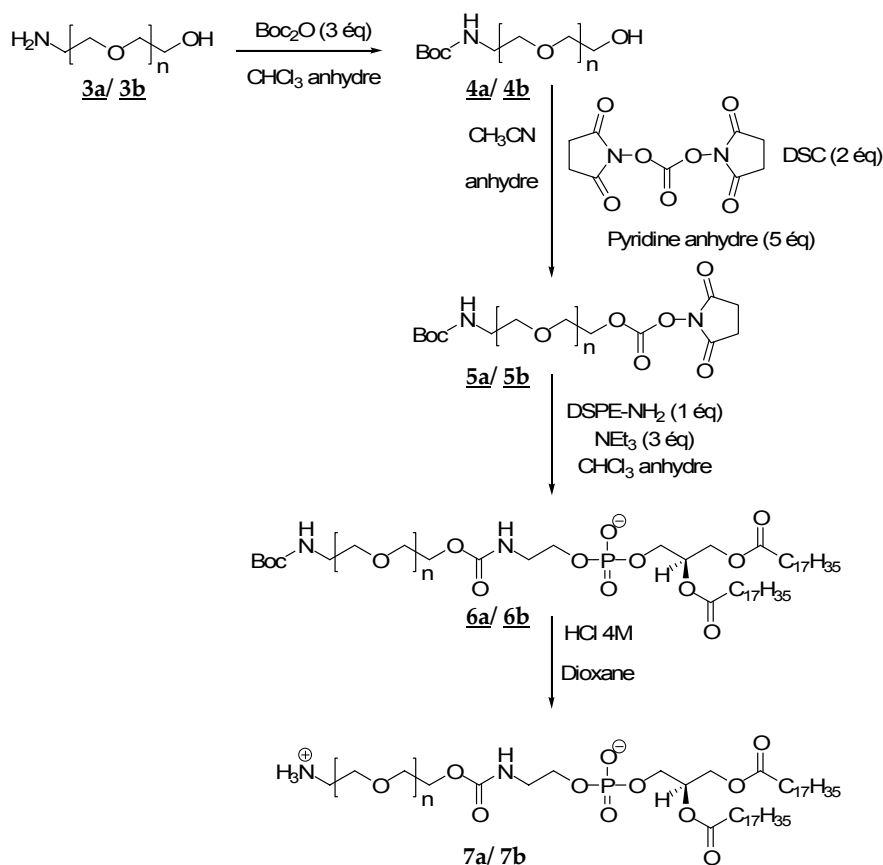


Figure 45. Couplage de la DSPE-NH₂ sur le α -amino- ω -hydroxy-PEG (voie 1). Une fois le couplage DSPE-NH₂ / PEG modifié réalisé (**6a/ 6b**), la fonction amine est déprotégée en milieu acide. Les rendements globaux de la synthèse totale des intermédiaires DSPE-PEG_n-NH₂ à partir des deux α -amino- ω -hydroxy-PEGs (2000 et 6000) (**7a** et **7b**) sont relativement modestes voire faibles (respectivement 28,3% et 7,9%). De plus, à partir du moment où le phospholipide est inséré sur la molécule, les pics en RMN¹H deviennent plus difficiles à interpréter et à quantifier dans le suivi de réaction.

Ainsi, pour augmenter les rendements globaux des synthèses et également faciliter leur interprétation spectroscopique, une nouvelle voie a été envisagée en introduisant la DSPE-NH₂ après l'introduction du groupement phthalimide.

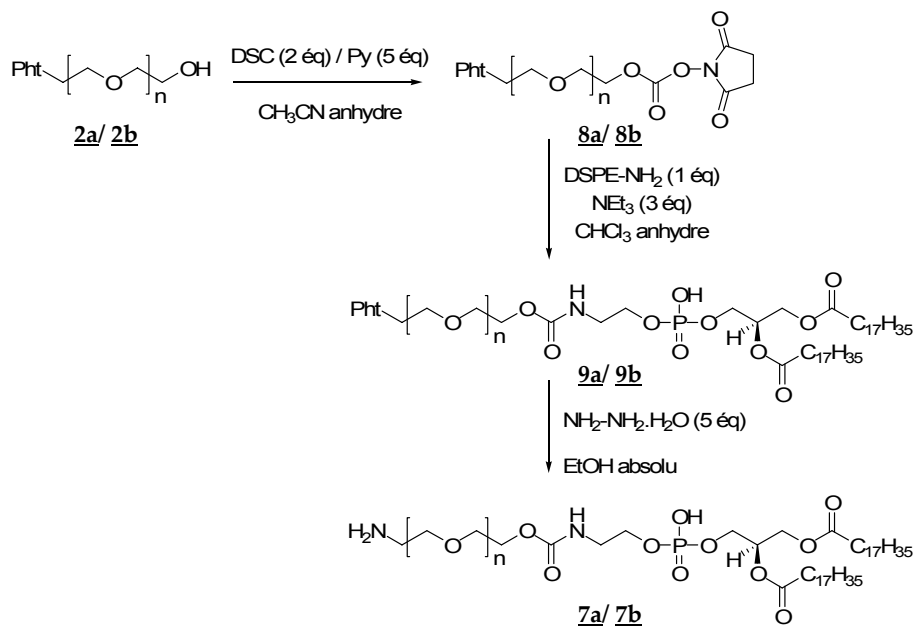
I.3.2. Nouvelle voie de synthèse de la DSPE-PEG_n-NH₂.

Figure 46. Synthèse de la DSPE-PEG_n-NH₂ à partir du α-phthalimido-ω-hydroxy-PEG_n (voie 2).

A partir des α-phthalimido-ω-hydroxy-PEGs (**2a** et **2b**) dont la synthèse a été précédemment décrite, les étapes d'activation de l'hydroxyle par la *N,N*-disuccinimidylcarbonate (DSC) suivie de l'introduction de la DSPE-NH₂ sont menées dans les mêmes conditions que pour la première voie de synthèse (Figure 46). La conservation du noyau aromatique sur la chaîne polymérique présente un atout intéressant pour le suivi des réactions, surtout en spectroscopie RMN¹H, puisque les protons aromatiques sont plus déblindés par rapport aux autres protons de la molécule. Ainsi, il est possible de valider la présence d'un phospholipide par motif PEG par comparaison entre le nombre de protons aromatiques et ceux du phospholipide (Figure 47). Cette même comparaison est plus difficile avec le "construct" DSPE-PEG_n-NHBoc puisque le pic correspondant aux protons du groupement tert-butoxycarbonyl se situe vers 1,41 ppm, trop proche du pic à 1,24 ppm des protons aliphatiques du phospholipide.

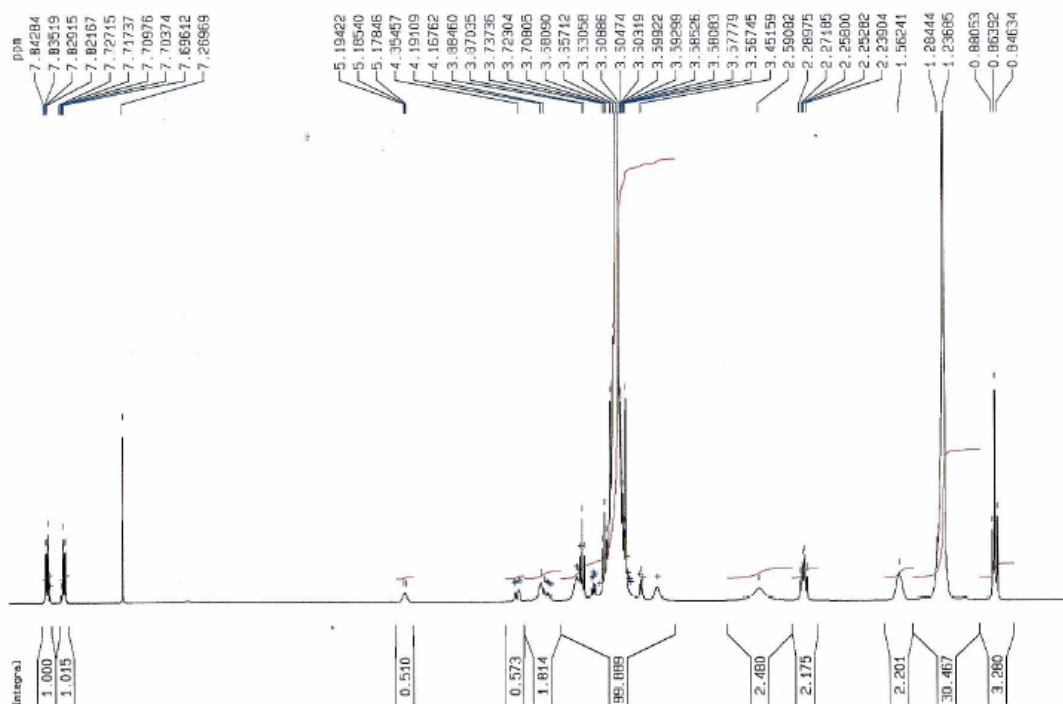


Figure 47. Spectre RMN ^1H (CDCl_3) du “construct” DSPE-PEG₂₀₀₀-Pht. (Les intégrales doivent être doublées pour obtenir le nombre exact de protons présents sur la molécule.)

La déprotection finale de l'amine par hydrazinolyse permet après précipitation dans l'éther diéthylique l'obtention des deux intermédiaires DSPE-PEG_n-NH₂. Ainsi, les rendements globaux des synthèses des intermédiaires DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ (**7a**) et DSPE-PEG₆₀₀₀-NH₂ (**7b**) en passant par la seconde voie ont été améliorés (respectivement, 31,3% et 16,7% contre 28,3% et 7,9% pour la première voie de synthèse).

Les intermédiaires DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ (**7a**) et DSPE-PEG₆₀₀₀-NH₂ (**7b**) synthétisés, l'étape suivante est leur fonctionnalisation par couplage d'agents chélatants pour le radiomarquage des nanocapsules lipidiques en surface et des différents haptènes permettant le ciblage actif vers les tumeurs.

II. FONCTIONNALISATION DES “CONSTRUCTS” DSPE-PEG_N-NH₂.

II.1. Synthèses des agents chélatants.

La couche hydrophile de Solutol[®], tensioactif des nanocapsules lipidiques, pouvant être une barrière à l'accès des radionucléides pour le radiomarquage en surface, il semble intéressant de placer les agents chélatants à l'extrémité hydrophile des poly(éthylène glycol) pour les rendre plus accessibles.

Les principaux radionucléides métalliques qui seront envisagés pour des applications futures en radioimmunothérapie sont des émetteurs β^- comme l' ^{90}Y et le ^{67}Cu afin d'appliquer la technique de “feux croisés” avec les nanocapsules lipidiques.

Ainsi, plusieurs agents chélatants peuvent être utilisés pour ce type de radioéléments comme le DTPA-DA **10**, le *p*-NCS-Bz-DOTA **12** ou le TE3A-NCS **13**. Il semble également intéressant d'introduire en surface des émetteurs α , dont le parcours est plus court mais beaucoup plus énergétiques. Ainsi, le CHXA"DTPA-NCS **11**, bon chélatant du ^{213}Bi , a été proposé dans la liste des agents chélatants à coupler. Le Tableau 10 récapitule les différents agents chélatants choisis ainsi que les radionucléides qui leur sont associés. Le DTPA présente un double intérêt puisqu'il peut à la fois introduire de la radioactivité mais également, en étant associé à l'indium, être utilisé comme haptène grâce à l'anticorps bispécifique anti-ACE / anti-DTPA-In (hMN14 / 734).

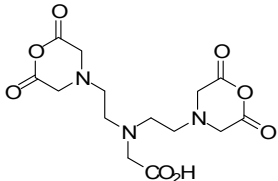
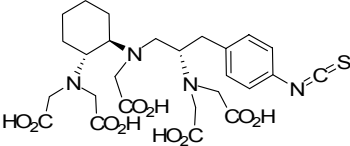
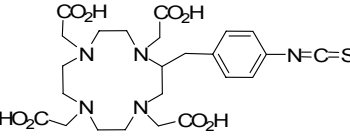
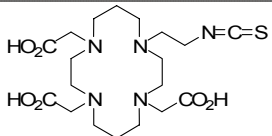
Agents chélatants	Radionucléides	Forme
 dianhydride de l'acide diéthylènetriaminepentaacétique ou DTPA-DA 10	^{111}In	Commercial
 acide <i>N</i> -[(2 <i>R</i>)-amino-3-(<i>p</i> -isothiocyanatophényl)-propyl]-trans-(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-cyclohexane-1,2-diamine- <i>N,N',N'',N'''</i> -penta acétique ou CHXA"DTPA-NCS 11	^{111}In ^{213}Bi	synthétisé
 acide 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane- <i>N,N',N'',N'''</i> -tetraacétique ou <i>p</i>-NCS-Bz-DOTA 12	^{111}In ^{90}Y ^{67}Cu	Commercial
 acide 1-(2-isothiocyanatoéthyl)-4,8,11-tétraazacyclotetradécane- <i>N,N',N'',N'''</i> -triacétique ou TE3A-NCS 13	^{67}Cu	synthétisé

Tableau 10. Récapitulatif des agents chélatants qui présentent un intérêt pour le radiomarquage des nanocapsules lipidiques. Les radionucléides qui seront utilisés pour la RIT sont en rouge.

Ainsi, parmi les agents chélatants, certains sont commercialisés (DTPA-DA **10** et le *p*-NCS-Bz-DOTA **12**) et d'autres ont été synthétisés comme le CHXA"DTPA-NCS **11** et le TE3A-NCS **13**.

II.1.1. Synthèse du CHXA"DTPA-NCS **11**.

Le CHXA"DTPA-NCS **11** ou l'acide *N*-[(2*R*)-amino-3-(*p*-isothiocyanatophényl)-propyl]-trans-(1*S*,2*S*)-cyclohexane-1,2-diamine-*N,N',N'',N'''*-pentaacétique est un dérivé du DTPA qui présente de bons résultats de complexation et de stabilité *in vivo* avec les radioisotopes du bismuth (Brecht MW, *et al.* 1992). Les fonctions amines

vicinales positionnées en trans du motif cyclohexanique permettent d'augmenter la rigidité du système chélatant.

Contrairement à la littérature (Brechtel MW, *et al.* 1992), la synthèse a été réalisée non pas à partir de mélanges racémiques de la *N*-(Boc)-*p*-nitrophénylalanine mais à partir de son composé énantiomériquement pur (S) et de la *trans*-1,2-cyclohexanediamine (Figure 48). Certaines étapes qui posaient problèmes comme la réduction par BH_3 .THF de la fonction amide pour donner le composé **19** ont été résolues. En effet, cette réaction nécessite des conditions anhydres très strictes (solvant, verrerie). La solubilisation de l'amide de départ dans du THF anhydre est également un facteur limitant pour que le complexe borane réagisse. Pour que la réduction se fasse, l'ajout de BH_3 .THF se fait directement sur l'amide sous forme solide. La fin de la réaction se visualise lorsque, par ajout du réducteur, le milieu réactionnel arrête de mousser.

Afin d'améliorer les rendements de la *N*-alkylation (**20**), l'ajout d'iodure de potassium a été ajouté au mélange réactionnel permettant ainsi la transformation du $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$ en son homologue iodé qui réagit plus facilement lors de la substitution nucléophile.

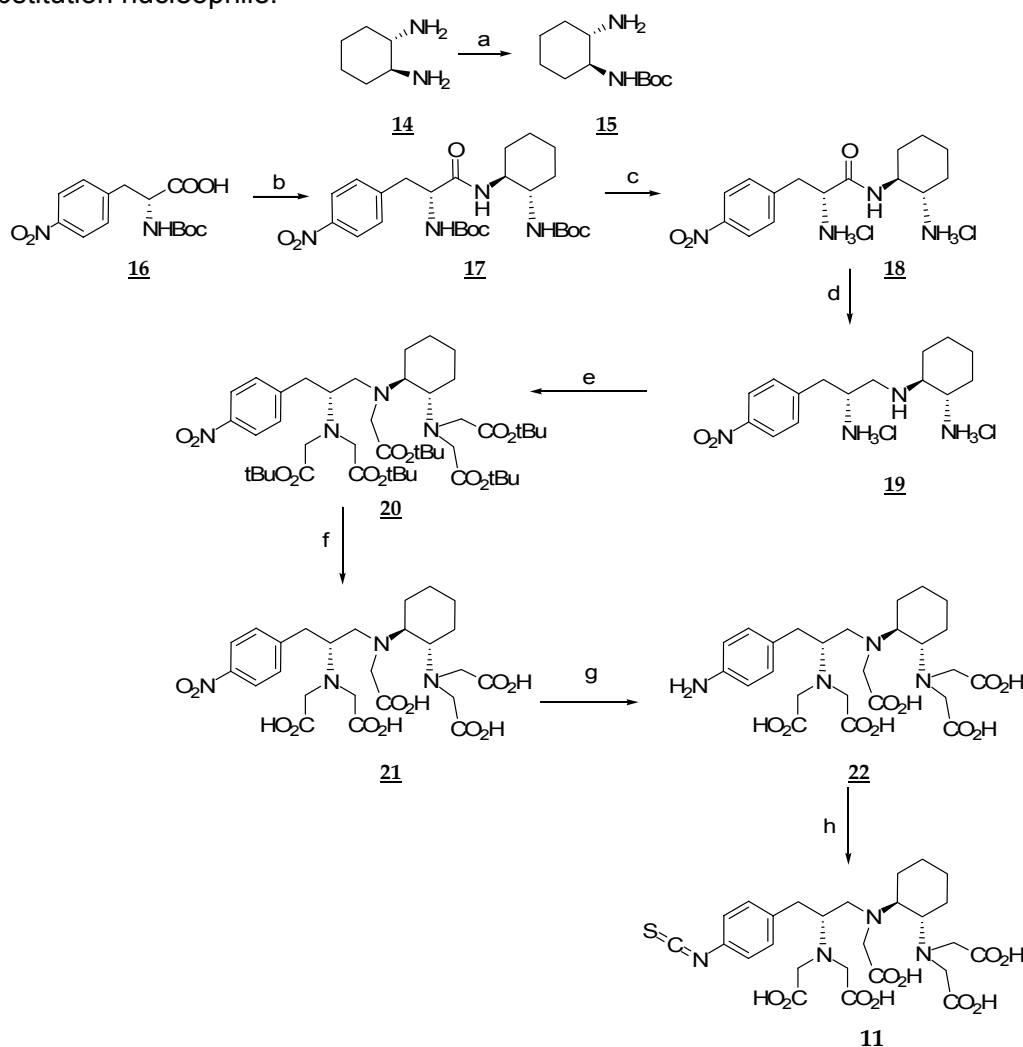


Figure 48. Synthèse de l'agent chélatant CHXA-DTPA-NCS **11**. (a) Boc_2O (1 éq), dioxane anhydre ; (b) **A**, EDC.HCl, HOBT, NMM, CHCl_3 anhydre ; (c) HCl_g , dioxane anhydre ; (d) BH_3 .THF (10 éq) ; HCl_g , dioxane anhydre ; (e) $\text{Br-CH}_2\text{-COOtBu}$ (10 éq), K_2CO_3 , KI, ACN anhydre ; (f) TFA ; (g) H_2 , Pd /C, MeOH ; (h) SOCl_2 , $\text{H}_2\text{O}/\text{CHCl}_3$.

II.1.2. Synthèse du TE3A-NCS 13.

Les polyazamacrocycles dérivant du cyclam sont de très bons chélatants du cuivre (Wong EH, *et al.* 2000 ; Boswell CA, *et al.* 2005). La synthèse de l'acide 1-(2-isothiocyanatoéthyl)-4,8,11-tétraazacyclotetradécane-*N',N'',N'''*-triacétique ou TE3A-NCS 13 a été réalisée en cinq étapes selon les travaux de Mishra (Mishra AK, *et al.* 1996) à partir du 1,4,8,11-tétraazacyclotetradécane 25 ou plus couramment appelé cyclam (Figure 49). Deux voies ont été envisagées : la première voie étant l'introduction dans un premier temps des trois groupements acétates de *tert*-butyl sur le cycle (26) puis de l'éthylamine (27) ; à l'inverse de la première, la seconde voie introduit l'éthylamine (28) puis les acétates (27). L'encombrement stérique des groupements *tert*-butyl des acétates défavorise la voie 1. En effet, la réaction de la *N*-Boc-2-bromoéthylamine 24 sur le cycle ne se fait pas.

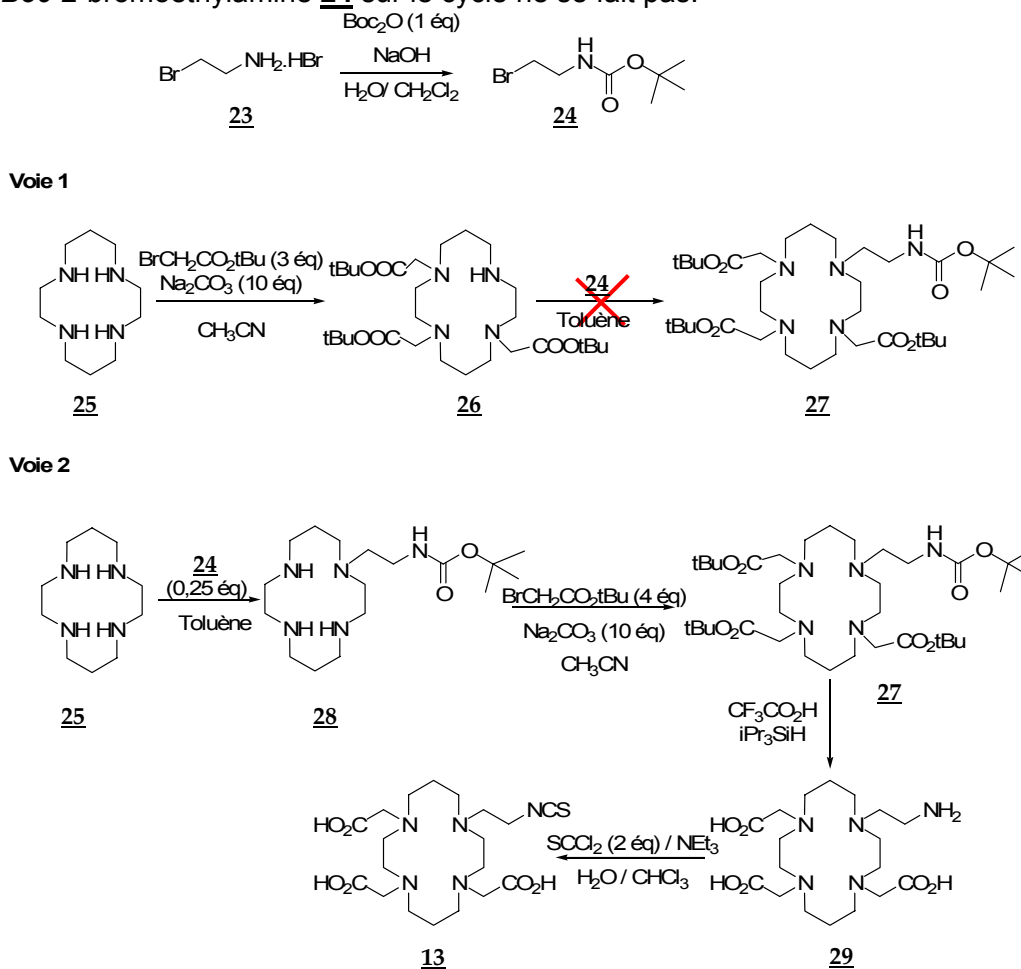


Figure 49. Synthèse de l'acide 1-(2-isothiocyanatoéthyl)-4,8,11-tétraazacyclotetradécane-*N',N'',N'''*-triacétique ou TE3A-NCS 13.

Dans la voie 2, le cyclam monoalkylé 28 est obtenu après réaction du *N*-Boc-2-bromoéthylamine 24 sur un excès de cyclam. Le produit monoalkylé est séparé du composé de départ et des produits secondaires (dialkylé et trialkylé) par plusieurs extractions successives : eau/ toluène puis eau/CH₂Cl₂. Cette méthode d'extraction permet alors d'obtenir le produit monoalkylé 28 pur dans la phase CH₂Cl₂ avec un rendement de 86%. L'étape suivante d'alkylation par l'acétate de *tert*-butyl est alors réalisable et le produit correspondant 27 est obtenu avec un rendement de 96%. La déprotection des acides et de l'amine est réalisée en milieu acide fort (CF₃CO₂H /

iPr₃SiH). Pour permettre le couplage sur la DSPE-PEG-NH₂, la fonction amine est enfin transformée en isothiocyanate par réaction avec le thiophosgène.

Comme nous l'avons vu paragraphe I.1, pour permettre la vectorisation des nanocapsules lipidiques, les haptènes doivent être synthétisés et activés pour être couplés aux intermédiaires DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ et DSPE-PEG₆₀₀₀-NH₂.

II.2. Synthèse des différents haptènes.

Le ciblage en deux temps peut être envisagé avec plusieurs haptènes puisqu'il existe des anticorps bispécifiques qui leur sont associés. Les différents haptènes et leur anticorps associés anti-ACE/ anti-haptènes sont résumés dans le Tableau 11.

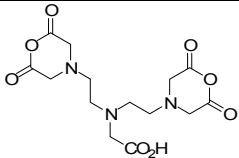
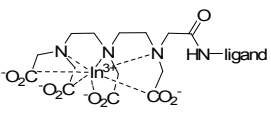
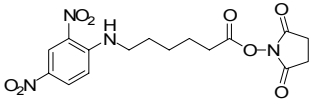
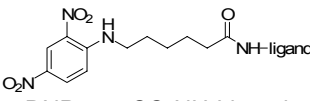
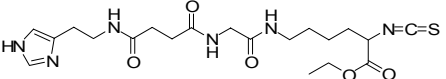
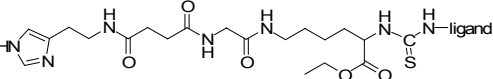
Haptènes activés	Haptènes couplés	bsmAb associé
 DTPA-DA 10	 In-DTPA-NH-Ligand	hMN14/734
 DNP-cap-CO-NHS 30	 DNP-cap-CO-NH-Ligand	F6/265.5
 HSGL-NCS 31	 HSGL-NH-Ligand	hMN14/679

Tableau 11. Résumé des différents haptènes utilisés et de leur anticorps associé.

II.2.1. Synthèse de l'haptène DNP-cap-CO-NHS **30**.

L'haptène activé sous forme d'ester *N*-hydroxysuccinimidyl-6-(2,4-dinitrophénylamino)-caproate ou DNP-cap-CO-NHS **30** a été synthétisé à partir de sa forme acide **32** par réaction avec le *N,N,N',N'*-tétraméthyl-*O*-(*N*-succinimidyl)-uronium tétrafluoroborate **33** ou plus couramment appelé TSTU. Cette méthode permet d'obtenir quantitativement le produit désiré quasi-instantanément.

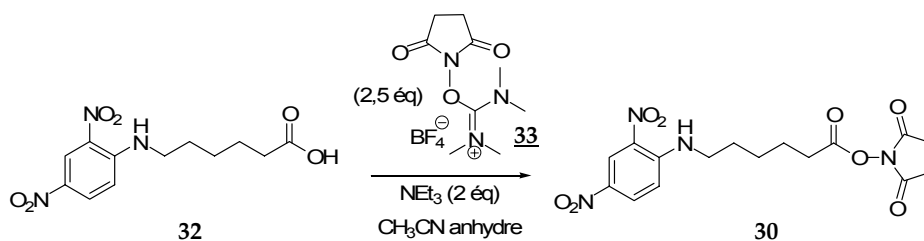


Figure 50. Synthèse de l'estér *N*-hydroxysuccinimidyl-6-(2,4-dinitrophénylamino)-caproate ou DNP-cap-CO-NHS **30**.

II.2.2. Synthèse de l'haptène HSGL-NCS **31**.

La synthèse de l'isothiocyanate de la *N*-□-(histaminosuccinylglycyl) lysinate d'éthyle ou HSGL-NCS **31** a été réalisée d'après les travaux réalisés par Benoist et Morandeau (Benoist E, 1997 ; Morandeau L, 2001 ; Morandeau L, *et al.* 2005) à partir de l'histamine **34** et de la *N*-□-(benzyloxycarbonyl) lysine **40**. Le couplage des différents acides aminés est possible grâce à une suite de protections / déprotections. La fonction amine terminale présente sur la glycine, devant servir au couplage sur l'intermédiaire DSPE-PEG_n-NH₂, est protégée par un groupement protecteur (benzyloxycarbonyl). Ce groupement protecteur est inerte aux conditions acides de déprotection du groupement Boc, permettant ainsi la réaction de couplage peptidique à partir d'une seule fonction amine. La protection de l'amine terminale est levée au final par hydrogénation catalytique.

II.2.2.1. Synthèse du motif HS **36**.

L'acide 4-histamidylsuccinique **36** est obtenu par substitution nucléophile de la fonction amine de l'histamine sur l'anhydride succinique **35** avec un rendement de 82% (Figure 51).

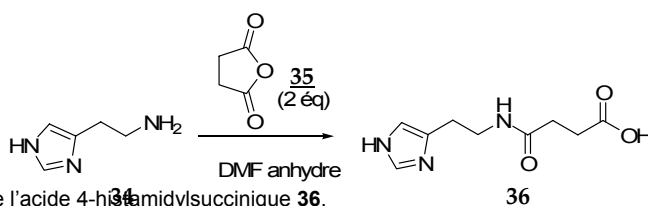


Figure 51. Synthèse de l'acide 4-histamidylsuccinique **36**.

Cet intermédiaire **36** est utilisé par la suite pour le couplage peptidique avec l'amine du motif GL **40**.

II.2.2.2. Synthèse du motif GL **40**.

La synthèse du motif GL **40** est réalisée à partir de la *N*-□-(benzyloxycarbonyl) lysine **37**. Quelques modifications dans le protocole de synthèse décrit par Morandeau (Morandeau L, *et al.* 2005) ont été apportées afin d'optimiser cette synthèse (Figure 52). Ainsi, la première étape consiste en une estérification de l'acide présent sur la

N- $\square$ -(benzyloxycarbonyl) lysine **37**. L'amine sous forme ammonium dans de telles conditions acides est neutralisée par Na_2CO_3 . Le produit correspondant **38** est alors obtenu quasi-quantitativement. La seconde étape est un couplage peptidique entre l'ester d'éthyle de la CBz-Lysine **38** et la *N*-(Boc)-Glycine en présence de *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt)/ hydrochlorure de *N*-éthyl-*N'*-(3-diméthylaminopropyl) -carbodiimide (EDC.HCl)/ *N*-méthylmorpholine (NMM). Cette méthode permet l'obtention du produit **39** de manière quantitative contrairement à l'ancienne technique de couplage faisant réagir l'ester de paranitrophénol de la *N*-(Boc)-lysine. L'amine du motif GL **40** est enfin déprotégée en milieu acide fort pour le couplage final HSGL.

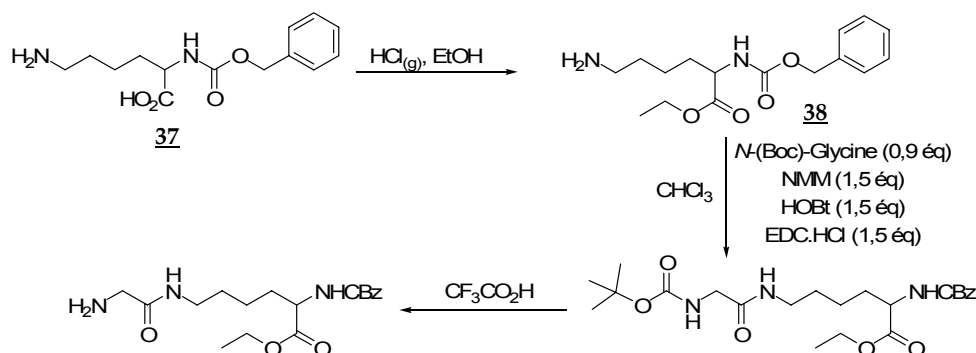


Figure 52. Synthèse de la α -glycyl-*N*- $\square$ -(benzyloxycarbonyl) lysinate d'éthyle **40**.

II.2.2.3. Synthèse du motif HSGL.

Le couplage peptidique final donnant accès au motif HSGL est réalisé à partir des motifs HS (composé **36**) et GL (composé **40**) dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (HOBt/EDC.HCl/NMM). Le composé issu du couplage peptidique est obtenu avec un rendement de 79% contre 59% par la méthode utilisant le DCC et le paranitrophénol. L'amine de l'haptène final HSGL- NH_2 **42** est ensuite déprotégée quantitativement par hydrogénation catalytique du groupement benzyloxycarbonyl.

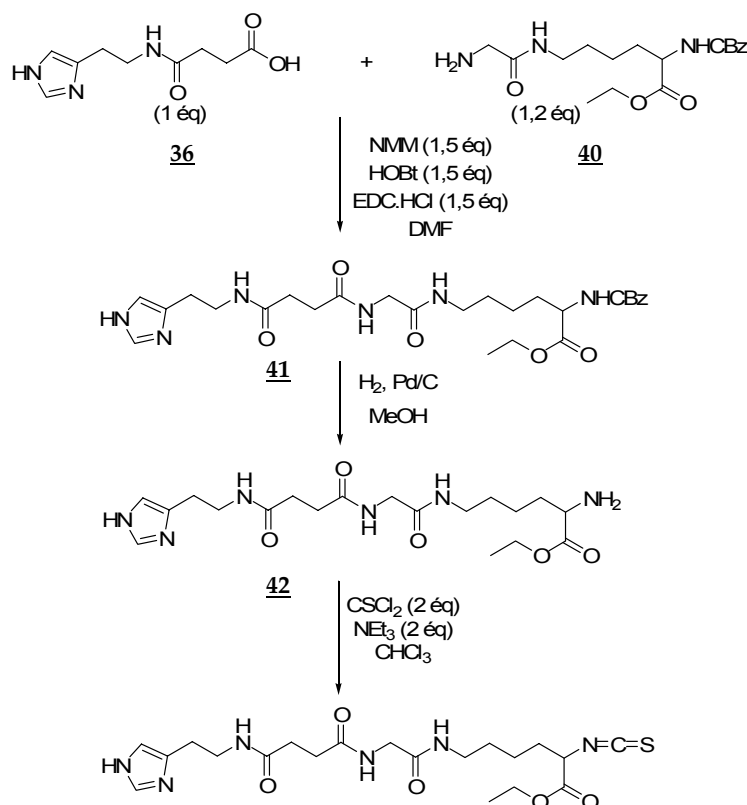


Figure 53. Synthèse de l'isothiocyanate de la N^{ϵ} -(histaminosuccinylglycyl) lysinate d'éthyle ou HSGL-NCS **31**.

Pour permettre le couplage sur l'intermédiaire DSPE-PEG_n-NH₂, une transformation de la fonction amine de l'haptène HSGL-NH₂ **42** est réalisée par réaction avec le thiophosgène pour donner son homologue isothiocyanate HSGL-NCS **31**.

Les synthèses des différents agents chélatants et haptènes ainsi réalisées, l'étape finale dans la synthèse des "constructs" est le couplage de ces molécules préalablement activées avec les intermédiaires DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ **7a** et DSPE-PEG₆₀₀₀-NH₂ **7b**.

II.3. Synthèses des "constructs" finaux.

Les couplages entre les intermédiaires DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ **7a** et DSPE-PEG₆₀₀₀-NH₂ **7b** et les ligands (agents chélatants bifonctionnels (BCA) et haptènes) ont été réalisés en présence de triéthylamine. La Figure 54 représente la réaction générale entre l'intermédiaire aminé et les différents ligands activés par une fonction isothiocyanate, anhydride ou ester *N*-hydroxysuccinimidyle. Un excès de ligands (5 éq) a été ainsi ajouté au milieu réactionnel pour saturer les motifs polymériques. Les réactions sont généralement réalisées en milieu chloroformique anhydre. Mais dans le cas des agents chélatants, une solubilisation au préalable des BCA dans un minimum de DMSO à chaud s'impose avant l'addition de la DSPE-PEG_n-NH₂, en solution dans le CHCl₃. L'intérêt des structures poly(éthylène glycol) de longue chaîne est leur capacité à précipiter dans l'éther diéthylique ce qui permet assez facilement de purifier les produits par cette méthode de précipitation.

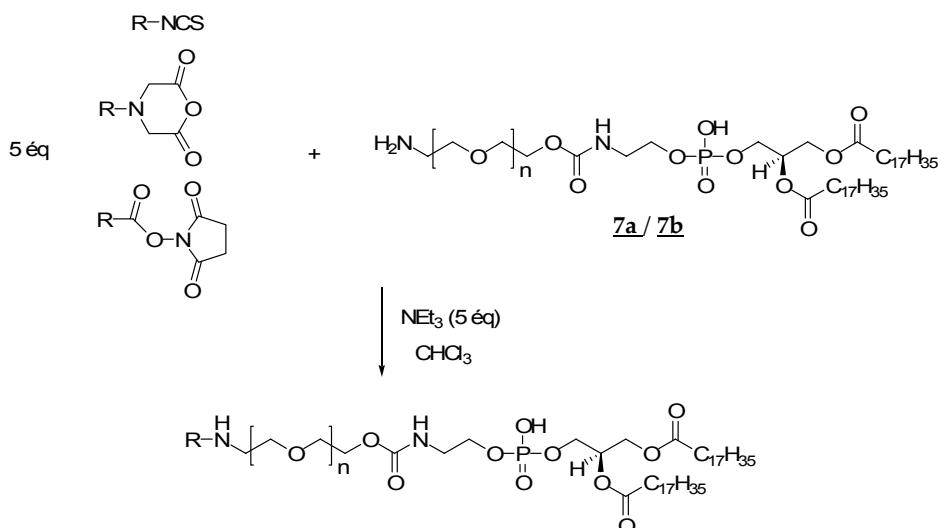
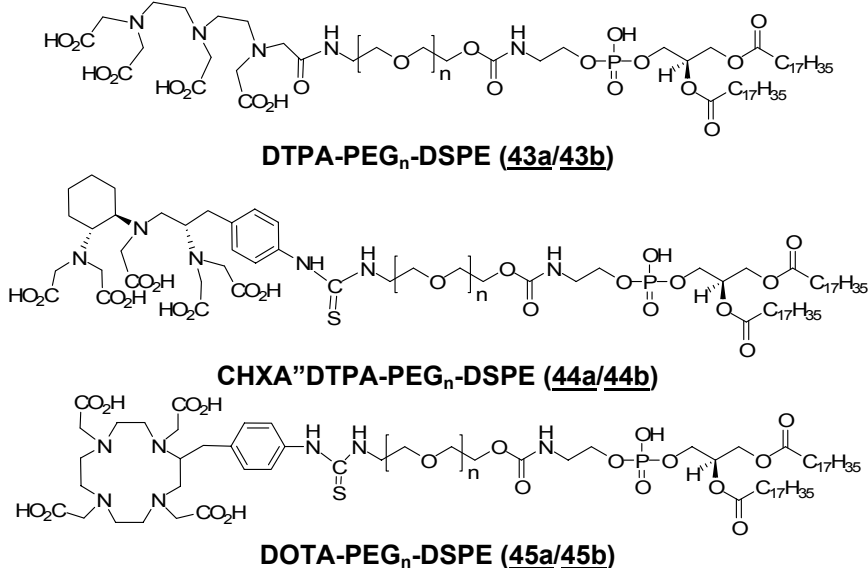


Figure 54. Réaction générale de couplage entre les intermédiaires DSPE-PEG_n-NH₂ **7a/7b** et les différents ligands.

En résumé, plusieurs molécules polymériques de longueur différentes ont été élaborées soit pour permettre un radiomarquage en surface des nanocapsules lipidiques avec des radionucléides de type métallique ; soit pour permettre une vectorisation future du matériel colloïdal dans des protocoles de RIT utilisant le système en deux temps. Ainsi, pour une longueur de poly(éthylène glycol) donnée, nous avons accès à quatre “constructs” chélatants et trois “constructs” haptènes, dont un, le “construct” DSPE-PEG_n-DTPA, sert à la fois comme chélatant et comme haptène lorsqu’il est couplé avec l’indium (Figure 55).

“Constructs” BCA-PEG_n-DSPE :



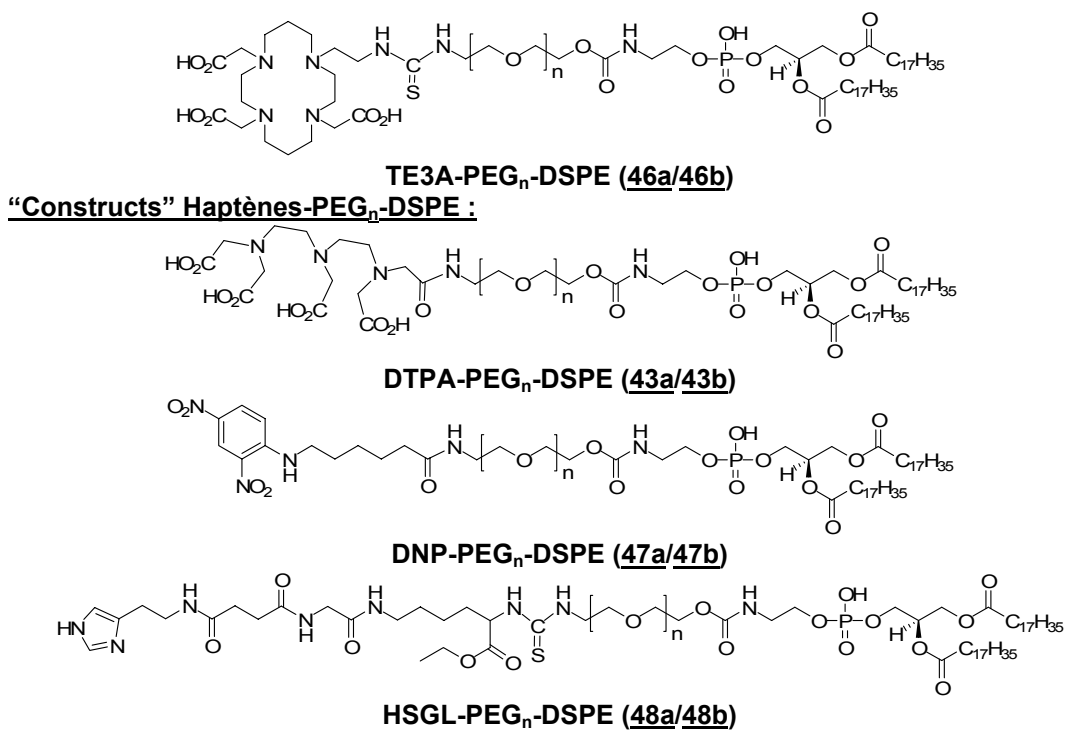


Figure 55. Différents "constructs" synthétisés.

CHAPITRE 4. DIFFÉRENTES VOIES DE RADIOMARQUAGE DES NANOCAPSULES LIPIDIQUES.

Ce chapitre développe différentes techniques de radiomarquages des nanocapsules lipidiques soit en surface par l'utilisation de "constructs" hydrophiles ; soit au niveau du cœur lipidique par incorporation de précurseurs lipophiles radiomarqués. Pour des raisons de compréhensions, il nous est apparu plus approprié de présenter chaque technique de radiomarquages sous la forme rédactionnelle du type protocole/résultats/conclusion.

I. ETUDE DE LA FAISABILITE DE RADIOMARQUAGES EN SURFACE.

Différents radiomarquages en surface peuvent être envisagés par l'utilisation des "constructs" de synthèse. En effet, les "constructs" chélatants peuvent permettre l'introduction de radionucléides métalliques du type : ^{111}In , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{213}Bi ... Il est également envisageable d'introduire des radionucléides tels que ^{125}I et ^{131}I par réaction sur les intermédiaires DSPE-PEG_n-NH₂ **7a** et **7b** de précurseurs prosthétiques du type Bolton-Hunter.

Afin d'étudier la faisabilité de ces radiomarquages à la surface des nanocapsules lipidiques, les travaux décrits dans les paragraphes suivants ont été menés par l'utilisation des "constructs" PEG₂₀₀₀. Les radionucléides qui ont été testés sur les nanocapsules lipidiques sont des émetteurs α utilisés couramment au laboratoire, c'est-à-dire ^{111}In et ^{125}I . Leurs comportements chimiques vis-à-vis des agents chélatants pour ^{111}In et des précurseurs pour ^{125}I permettent une extrapolation sur des radionucléides utilisés en thérapie (respectivement ^{90}Y et ^{131}I).

I.1. Radiomarquages des nanocapsules lipidiques à l'indium-111.

I.1.1. Protocole de radiomarquage.

Avant de procéder au radiomarquage à l'indium-111, une préparation au préalable des nanocapsules lipidiques est nécessaire. Trois types de nanocapsules lipidiques ont été préparés pour le radiomarquage selon la méthode de "post-insertion" : LNC + DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA **43a** (tube 1) ; LNC + DSPE-PEG₂₀₀₀-CHXA-DTPA **44a** (tube 2) ; LNC + DSPE-PEG₂₀₀₀-DOTA **45a** (tube 3).

Dans un premier temps, des nanocapsules lipidiques natives ont été préparées selon la méthode habituelle décrite dans le chapitre 2 (II-2). Pour que le radiomarquage à l'indium-111 puisse être réalisé, une dialyse des nanocapsules lipidiques natives a été réalisée au préalable en tampon acétate 0,1M à pH 5,5 durant 2h. En effet, le radiomarquage à l'indium-111 doit s'effectuer en milieu légèrement acide (pH entre 5 et 6) pour éviter la formation d'hydroxydes insolubles et pour permettre la complexation. Le tampon a été préalablement traité par une résine échangeuse de cations (chélex) afin d'éliminer toutes traces métalliques dans le tampon. La chélex est une résine permettant de complexer les métaux "contaminants" du milieu de marquage.

Dans une seconde étape, l'addition des poly(éthylène glycol)-2000 sur les nanocapsules lipidiques préformées a été appliquée. Ainsi, dans chaque tube, des quantités de "constructs" chélatants de synthèse et de produit commercial DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe sont ajoutées à 1 ml de nanocapsules natives préformées. Une étape de chauffage à 60°C pendant 90 minutes a ensuite été appliquée en vortexant toutes les 15 minutes, suivie d'un refroidissement brutal dans un bain de glace pendant 1 minute.

Dans un troisième temps, le radiomarquage des nanocapsules lipidiques est effectué par addition de $^{111}\text{InCl}_3$ avec entraîneur. Ainsi, une trace de $^{111}\text{InCl}_3$, correspondant à une activité de 3,7 MBq, et 4 équivalents d'indium froid par rapport au nombre de moles ajoutées en DSPE-PEG₂₀₀₀-BCA sont ajoutés dans chaque tube. La trace de $^{111}\text{InCl}_3$ en présence d'entraîneur va alors refléter le comportement de l'indium total qui sera ajouté au milieu.

Le Tableau 12 récapitule les quantités ajoutées dans chaque tube permettant ainsi le radiomarquage à l'indium-111 des nanocapsules lipidiques.

Tableau 12. Récapitulatif des quantités ajoutées dans chaque tube pour 1 ml de nanocapsules lipidiques natives.

	Tube 1	Tube 2	Tube 3
DSPE-PEG ₂₀₀₀ -BCA	4,2 mg (1,33 μmol)	4,1 mg (1,22 μmol)	3,9 mg (1,17 μmol)
DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OMe	29 mg	28,5 mg	31 mg
InCl ₃ froid	5,32 μmol	4,88 μmol	2,34 μmol
$^{111}\text{InCl}_3$	0,09 nmol (3,7 MBq)	0,09 nmol (3,7 MBq)	0,09 nmol (3,7 MBq)

Après 2h d'incubation à température ambiante, une purification des nanocapsules lipidiques sur colonne de gel filtration Sephadex[®] G25 est effectuée par dépôt de 500 μl du mélange réactionnel puis élution en tampon phosphate 0,1 M pH 7,0. Des fractions de 0,5 ml sont collectées et 10 μl de chaque fraction d'élution sont comptés à l'aide d'un compteur gamma (1480 WIZARD[®] 3", PerkinElmer, Wallac Oy, Turku, Finland).

I.1.2. Résultats.

Les résultats des radiomarquages des trois types de nanocapsules lipidiques montrent une saturation complète des sites de chélation. Pour chaque cas, on retrouve ainsi $\frac{1}{4}$ de la radioactivité associée aux nanocapsules lipidiques ; les $\frac{3}{4}$ de la radioactivité restants correspondant à l'excès de InCl₃.

La Figure 56 représente les profils d'élution sur Sephadex[®] G25 d'une solution de InCl₃ + $^{111}\text{InCl}_3$ (trace) témoin et d'une solution type contenant le mélange réactionnel LNC DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA **43a** + 4 équivalents de InCl₃.

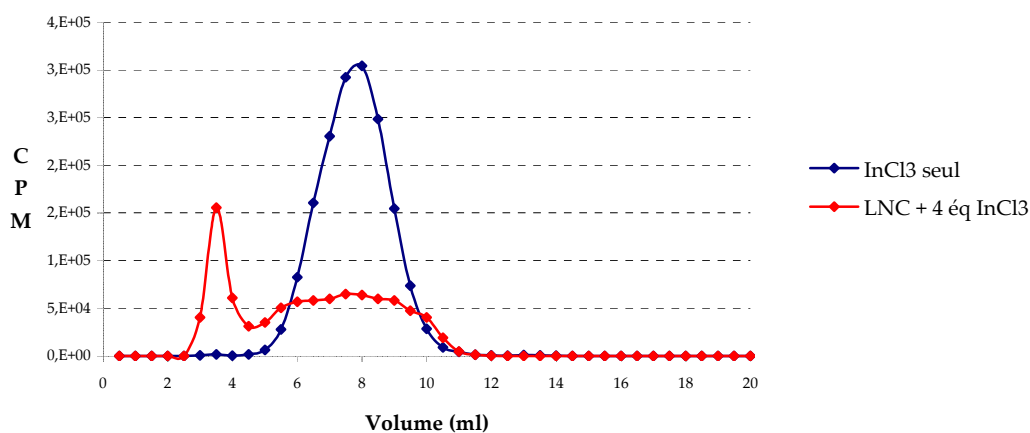
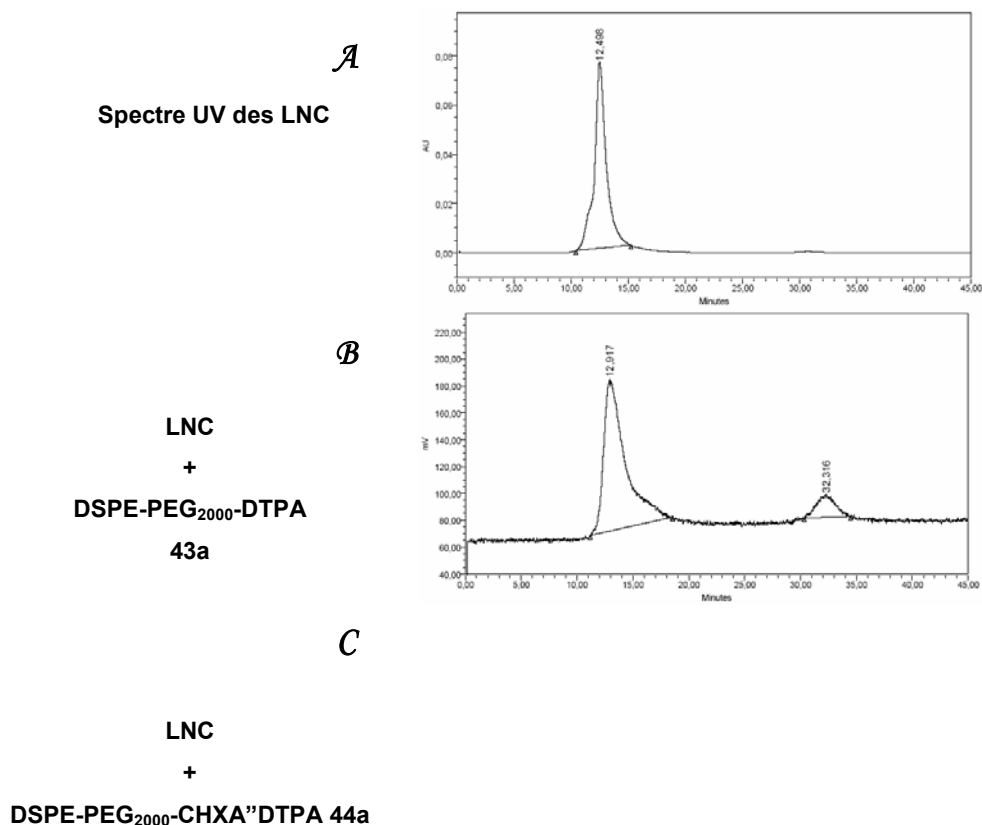


Figure 56. Profils d'élution sur Sephadex® G25 d'une solution d'indium-111 témoin et d'une solution mettant en présence des nanocapsules lipidiques DSPE-PEG₂₀₀₀-BCA et 4 équivalents InCl₃.

D'après la Figure 56, nous pouvons ainsi dire que 1 équivalent d'agent chélatant à la surface des nanocapsules lipidiques est nécessaire pour chélater 1 équivalent d'InCl₃.

Une analyse plus fine sur HPLC à exclusion stérique Superdex® 200 a été réalisée afin de confirmer l'intégrité de l'association nanocapsules lipidiques-indium. Ainsi, après la première purification sur Sephadex® G-25, une injection de 50 μ l de la 7^{ème} fraction (volume d'élution à 3,5 ml) sur la colonne HPLC. La Figure 57 représente les profils HPLC correspondant aux trois types de nanocapsules lipidiques radiomarquées (**B**, **C**, **D**).



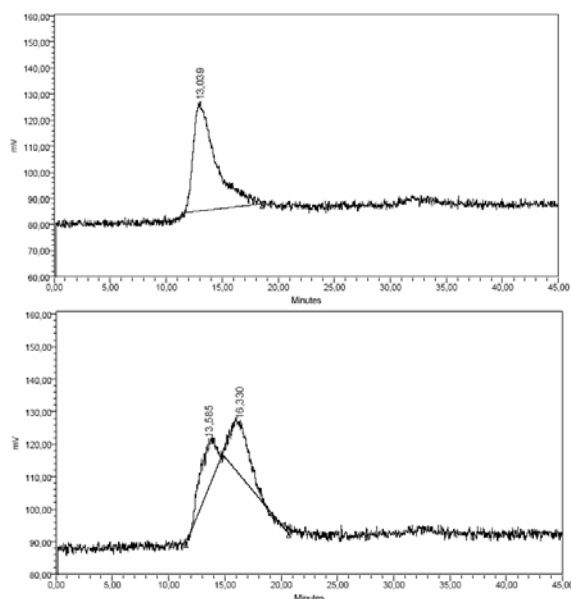


Figure 57. Profils HPLC sur Superdex® 200 éluée en tampon phosphate 0,1M pH 7,0 à 0,7 ml/min mettant en évidence le radiomarquage en surface des nanocapsules lipidiques à l'indium-111.

I.1.3. Discussion.

Les trois profils HPLC (**B**, **C**, **D**) confirment ainsi le radiomarquage des nanocapsules lipidiques à l'indium-111. Il est à noter la présence d'un second pic à 32 minutes correspondant à du chlorure d'indium libre. Ceci peut s'expliquer par le fait du chevauchement lors de la purification sur Sephadex® G-25 (Figure 56) du pic correspondant aux nanocapsules lipidiques radiomarquées et du pic du chlorure d'indium en excès. La purification sur Sephadex® G-25 est une méthode rapide de séparation mais en présence d'excès d' InCl_3 ne permet pas une purification complète. L'utilisation de ce type de colonnes de séparation est efficace lorsque l'on se place à l'équivalence agent chélatant/indium ou à défaut d'indium. Ce type de colonnes de séparation permet également une purification de quantités plus importantes de nanocapsules lipidiques comparé à la Superdex® 200.

En revanche, en ce qui concerne les résultats obtenus avec les nanocapsules lipidiques radiomarquées à l'indium-111 par l'intermédiaire du "construct" DSPE-PEG₂₀₀₀-DOTA **45a**, le spectre HPLC est peu satisfaisant en raison de l'obtention d'un double pic. Une mauvaise insertion au niveau de la membrane des nanocapsules lipidiques peut en être la raison majeure. En effet, une étude de stabilité en tampon phosphate a été menée jusqu'à 3 jours sur les LNC purifiées et a montré des profils HPLC identiques à ceux obtenus précédemment ce qui peut s'interpréter non pas par une mauvaise stabilité du système mais plutôt par un problème de constitution des nanocapsules lipidiques. Il est possible qu'une population micellaire, engendrée par une mauvaise insertion du "construct" DSPE-PEG₂₀₀₀-DOTA **45a**, soit présente en plus des nanocapsules lipidiques radiomarquées.

En conclusion de cette technique, les nanocapsules lipidiques ont pu être radiomarquées facilement à l'indium-111. Le radiomarquage a montré une équimolarité entre l'agent chélatant et le chlorure d'indium ce qui n'est pas le cas pour les liposomes (Mougin-Degraef M, 2005). En effet, des travaux de

radiomarquage à l'indium-111 ont été réalisés sur des liposomes présentant à leur surface des motifs DTPA en bout de phospholipide (DMPE-DTPA pour 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyléthanolamine-DTPA). Il a été démontré que les conditions de radiomarquage à l'indium-111 optimum sont obtenues avec 10 équivalents de DTPA par rapport à InCl_3 . Ce résultat s'explique par l'agencement des liposomes en bicouche lipidique. En effet, la molécule chélatante DMPE-DTPA peut à la fois se diriger vers le milieu extérieur mais également se tourner vers son cœur aqueux. Ce n'est pas le cas pour les nanocapsules lipidiques puisqu'il n'existe qu'une seule possibilité d'insertion. Cette caractéristique pourrait ainsi permettre, lors de futurs travaux, d'obtenir des activités spécifiques plus importantes que celles obtenues avec les liposomes.

1.2. Radiomarquages des nanocapsules lipidiques à l'iode-125.

Deux méthodes de radiomarquages à l'iode-125 ont été envisagées sur les nanocapsules lipidiques. La première méthode est un marquage direct sur des nanocapsules lipidiques présentant à leur surface l'intermédiaire DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ **7a**. Ce radiomarquage est assuré par le sulfo-Bolton-Hunter, forme hydrosoluble du Bolton-Hunter. Ainsi, seules les fonctions réactives en surface réagiront avec le précurseur. Il n'y aura pas d'incorporation possible au niveau du cœur lipophile des nanocapsules lipidiques.

La seconde méthode est un marquage indirect qui consiste en la réaction du Bolton-Hunter préalablement radiomarqué sur l'intermédiaire DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ **7a** en milieu organique. Après purification du produit de couplage, une insertion du "construct" radiomarqué au niveau de la membrane des nanocapsules lipidiques est induite par la méthode de "post-insertion".

1.2.1. 1ère méthode : radiomarquage direct.

1.2.1.1. Protocole de radiomarquage.

Cette première méthode de radiomarquage à l'iode consiste à faire réagir l'analogue hydrosoluble du Bolton-Hunter, le sulfo-Bolton-Hunter ou SBH, radiomarqué à l'iode-125 **50** sur la fonction NH₂ du "construct" DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ **7a** préalablement inséré au niveau de la membrane des nanocapsules lipidiques.

Ainsi, une première étape consiste à radiomarquer le précurseur (Figure 58) en présence d'un oxydant, la chloramine T.

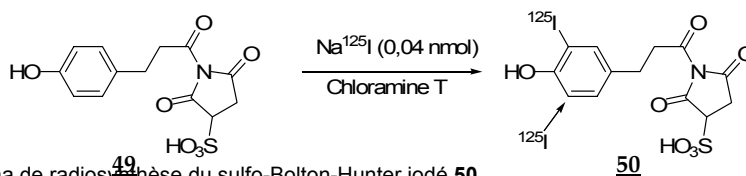


Figure 58. Schéma de radiosynthèse du sulfo-Bolton-Hunter iodé **50**.

Ainsi, dans un tube, les différents composants de la réaction sont placés successivement :

- 10 μ l d'une solution de chloramine T à 5 mg/ml (220 nmol) en tampon phosphate 0,1M pH 7,0.
- 3,7 MBq de Na¹²⁵I (0,04 nmol).
- 1 μ l d'une solution à 5,5 μ mol/ml de SBH **49** dans du DMSO (5,5 nmol).
- 10 μ l d'une solution de métabisulfite de sodium à 12 mg/ml (0,63 μ mol) en tampon phosphate 0,1M pH 7,0.

La faible quantité d'iode-125 introduite dans le mélange réactionnel va servir de traceur. En considérant que le SBH radiomarké **50** et le SBH froid **49** réagissent de la même manière, cela va permettre de suivre la réaction du SBH total vis-à-vis du substrat aminé présent sur les nanocapsules lipidiques.

Le précurseur est alors séparé de l'iode libre par chromatographie en phase inverse (C₁₈) sur une colonne Sep-Pak® (Millipore, France) éluée à l'aide d'un gradient H₂O/TFA 0,05% et MeOH. La pureté radiochimique est ensuite contrôlée sur chromatographie sur couche mince en utilisant comme éluant le mélange CHCl₃/AcOEt (1:1 v/v). La plaque CCM radioactive est ensuite révélée à l'aide d'un phosphor-imager (445SI Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia, Biotech, Orsay, France). Le rendement de marquage est calculé à l'aide d'un compteur gamma, en rapportant l'activité récupérée dans les fractions purifiées du réactif radio-iodé à l'activité totale déposée sur la Sep-Pak®. Les fractions purifiées de SBH-¹²⁵I sont alors rassemblées et le solvant est évaporé à sec par un courant d'azote.

Ce protocole de marquage est réitéré dans trois tubes différents pour tester l'évolution de la réaction de couplage induite par l'augmentation du nombre d'équivalents de SBH-¹²⁵I **50** par rapport à la DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ **7a**.

Parallèlement, une formulation de nanocapsules lipidiques contenant 5 mg de DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ **7a** par ml de LNC (soit 0,2 μ mol/ml) a été préparée selon la méthode de "post-insertion". Cette préparation a été obtenue à partir de nanocapsules lipidiques natives préalablement dialysée en tampon HEPES 0,1M pH 8,0. Afin d'éviter toute interaction avec d'autres molécules aminées, la formulation de nanocapsules lipidiques natives a été modifiée en remplaçant le Lipoïd®, contenant 9% de 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyléthanolamine (DSPE), par de la 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DSPC), phospholipide non réactif.

Dans les trois tubes contenant les mêmes quantités de SBH iodé, différentes quantités de nanocapsules lipidiques ont été déposées.

- Tube 1 : 1 ml de LNC (0,2 μ mol de DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ **7a**)
- Tube 2 : 0,5 ml de LNC (0,1 μ mol de DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ **7a**)
- Tube 3 : 0,25 ml de LNC (0,05 μ mol de DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ **7a**)

Les réactions sont incubées à température ambiante durant 30 minutes avec des phases d'agitation à l'aide d'un vortex toutes les 5 min. 200 μ l des mélanges réactionnels sont déposés sur Sephadex® G-25 permettant ainsi de séparer les nanocapsules lipidiques radiomarkées du SBH-¹²⁵I n'ayant pas réagi. Des fractions de 500 μ l sont collectées par élution de tampon phosphate 0,1M pH 7,0. 100 μ l de la 7^{ème} fraction de la PD-10 contenant une solution de nanocapsules lipidiques purifiées sont alors injectés sur colonne chromatographique Superdex® 200, éluée en tampon phosphate 0,1M pH 7,0 à 0,5 ml/min.

1.2.1.2. Résultats.

Dans les conditions d'éluant de la chromatographie sur couche mince (CHCl₃/AcOEt (1:1 v/v)), le produit ne migre pas. Après récupération des fractions purifiées de SBH-¹²⁵I et évaporation sous courant d'azote du solvant, le rendement de marquage

est obtenu à 76%. Le précurseur radiomarqué Ainsi, dans chaque tube, l'activité volumique est croissante :

- Tube 1 : 2,8 MBq/ml de LNC
- Tube 2 : 5,6 MBq/ml de LNC
- Tube 3 : 11,2 MBq/ml de LNC.

La Figure 59 représente les différents profils d'élution des trois réactions.

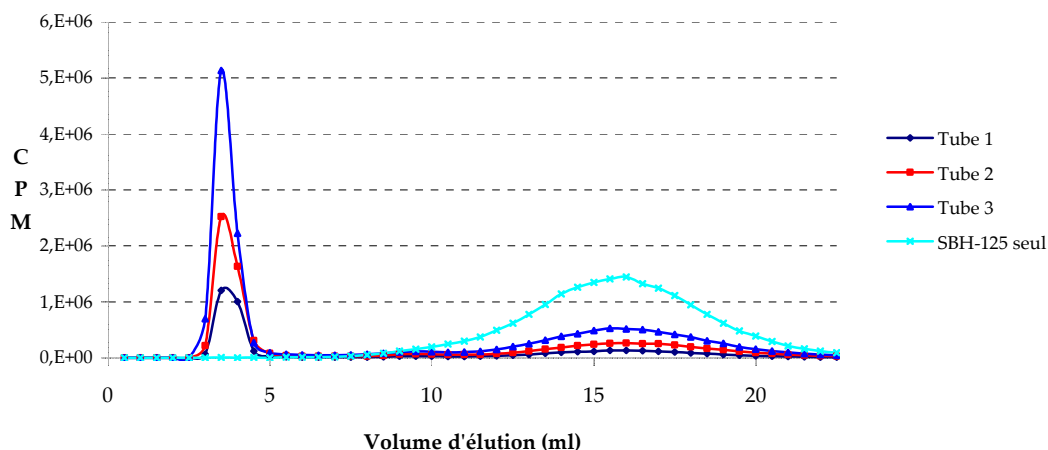
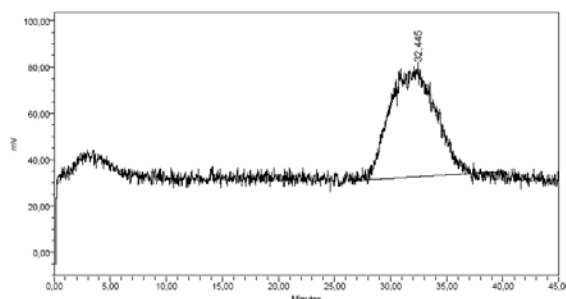


Figure 59. Profils d'élution sur Sephadex® G-25 de la réaction de couplage entre le SBH-¹²⁵I **50** et les nanocapsules lipidiques contenant de la DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ **7a**.

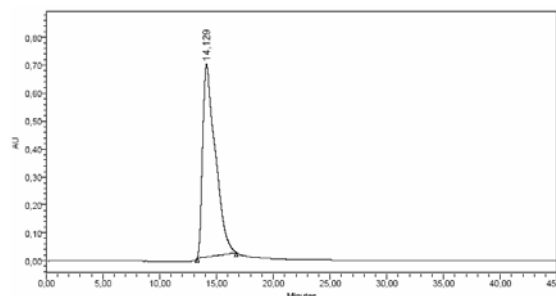
Dans chaque tube, la proportion de nanocapsules lipidiques radiomarquées par rapport à ce qui n'a pas réagit reste constante (60% de la radioactivité est associée aux LNC et 40% de SBH-¹²⁵I n'ayant pas réagit). Ceci peut être dû à une hydrolyse partielle lors de la réaction de couplage du SBH-¹²⁵I en l'acide radioiodé correspondant qui ne va donc pas réagir.

Une fois purifiées sur colonne Sephadex® G-25, les nanocapsules lipidiques radiomarquées sont ensuite contrôlées sur colonne HPLC Superdex® 200 par injection de 100 μ l de la 7^{ème} fraction collectée. La Figure 60 représente les profils HPLC des nanocapsules lipidiques radiomarquées.

SBH-¹²⁵I
(Satin)



Nanocapsules lipidiques
radiomarquées à l'iode-125
(Spectre UV à 280 nm)



Nanocapsules lipidiques
radiomarquées à l'iode-125
(Satin)

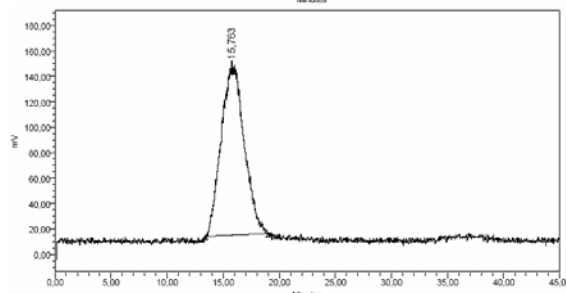


Figure 60. Profils HPLC sur Superdex®200 éluée en tampon phosphate 0,1M pH 7,0 à 0,5 ml/min mettant en évidence le radiomarquage en surface des nanocapsules lipidiques par le sulfo-Bolton-Hunter iodé **50**.

1.2.1.3. Conclusion.

Cette méthode de iodation directe permet d'obtenir un radiomarquage stable des nanocapsules lipidiques en tampon phosphate 0,1M pH 7,0 puisque deux semaines après purification du mélange réactionnel, les profils HPLC sur Superdex® 200 sont identiques à ceux obtenus précédemment (Figure 60). Le seul problème engendré par ce protocole est la perte évidente de 40% de la radioactivité lors de la réaction de couplage qui semblerait être due à une hydrolyse partielle de l'ester succinimide du SBH-¹²⁵I en son acide correspondant. Ce problème d'hydrolyse peut être levé par la deuxième méthode qui est réalisée en milieu organique.

1.2.2. 2ème méthode : radiomarquage indirect.

La deuxième méthode de radiomarquage à l'iode-125 consiste à coupler dans un premier temps le réactif de Bolton-Hunter radioiodé sur l'intermédiaire DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ **7a** en milieu organique ; puis, dans un second temps, après purification du "construct" de radiomarquage DSPE-PEG₂₀₀₀-BH-¹²⁵I **53**, une solution micellaire du produit de couplage est formée en milieu aqueux. Après addition sur des nanocapsules lipidiques, la méthode de "post-insertion" est appliquée et va permettre ainsi la fusion des micelles radioactives au niveau de la membrane des LNC.

1.2.2.1. Protocole de radiomarquage.

Le Bolton-Hunter **51** a été radiomarqué à l'iode-125 en présence d'un oxydant, la chloramine T et purifié par une méthode d'extraction (Figure 61).

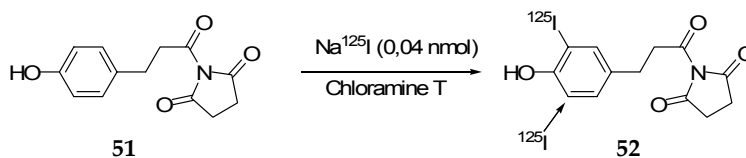


Figure 61. Radiosynthèse à l'iode-125 du réactif de Bolton-Hunter **52**.

Ainsi, dans un tube, les différents réactifs sont introduits successivement :

- 50 μ l de tampon phosphate 0,1M pH 7,0.
- 50 μ l d'une solution de chloramine T à 4 mg/ml (880 nmol) en tampon phosphate 0,1M pH 7,0.
- 3,7 MBq de Na^{125}I (0,04 nmol).
- 2 μ l d'une solution de Bolton-Hunter **51** à 0,5 mg/ml (3,8 nmol, soit 95 éq) dans du dioxane.

Comme décrit précédemment (Paragraphe I.2.1.1.), la quantité de radioactivité introduite va servir de traceur et ainsi permettre le suivi de l'ensemble du réactif de Bolton-Hunter **51** (3,8 nmol) lors du couplage avec la DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ **7a** et lors de l'insertion au niveau de la nanocapsule lipidique.

Le produit de radiomarquage est ensuite très rapidement purifié par un procédé d'extraction après addition de 400 μ l de tampon phosphate 0,1M pH 7,0 puis 500 μ l de toluène. Le rendement de marquage est calculé en rapportant l'activité de la phase organique sur l'activité totale pour faire le marquage. La pureté radiochimique est évaluée par chromatographie sur couche mince sur gel de silice (Silica gel 60 F₂₅₄, Merck, Allemagne) en utilisant l'éluant : CHCl₃/AcOEt (1:1 v/v). Les plaques sont révélées au phosphor-imager.

Le toluène est ensuite évaporé à sec pour permettre la seconde phase, la réaction de couplage du BH-¹²⁵I **52** et de la DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ **7a**. Ainsi, dans un deuxième temps, 500 μ l d'une solution chloroformique contenant 200 nmol/ml de DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ **7a** et 300 nmol/ml de NEt₃ sont additionnés afin de réagir sur le précurseur radiomarqué. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la pureté radiochimique du couplage est contrôlée sur chromatographie sur couche mince (Eluant : CHCl₃/AcOEt (1:1 v/v)).

Après évaporation du solvant organique de la réaction sous courant d'azote, 500 μ l de tampon phosphate sont additionnés sur le film lipidique qui s'est formé sur la paroi du tube. Le mélange est vortexé formant ainsi une solution micellaire du composé DSPE-PEG₂₀₀₀-BH-¹²⁵I **53**. Les nanocapsules lipidiques sont alors radiomarquées par la méthode de "post-insertion" par une première étape d'incubation de 1 ml de nanocapsules lipidiques et de la solution micellaire de DSPE-PEG₂₀₀₀-BH-¹²⁵I **53** à 60°C pendant 90 minutes suivie d'un refroidissement brutal à 0°C dans un bain de glace pendant 1 minute. Les nanocapsules lipidiques ainsi formées sont ensuite injectées sur colonne HPLC Superdex[®] 200 éluee en tampon phosphate 0,1M pH 7,0 à 5 ml/min.

I.2.2.2. Résultats.

Le réactif de Bolton Hunter **51** est radiomarqué avec un rendement de 79%. La Figure 62 représente le profil de la chromatographie sur couche mince de la phase organique permettant de déterminer la pureté radiochimique du produit radiomarqué à l'iode-125 **52**. Ainsi, dans de telles conditions, deux espèces radiomarquées issues

du réactif de Bolton-Hunter froid sont présentes : BH monoiodé **52a** ($R_f = 0,5$; 20%) et BH diiodé **52b** ($R_f = 0,7$; 80%).

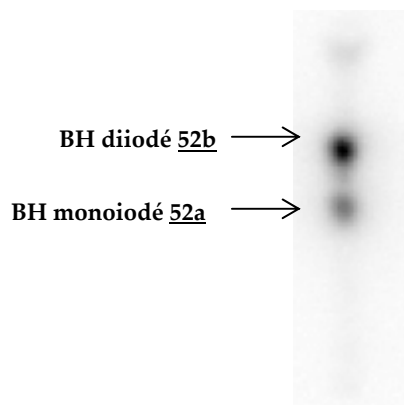


Figure 62. Chromatographie sur couche mince de la phase organique. Eluant : $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (1:1 v/v).

Le produit de couplage **53** entre l'intermédiaire DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ **7a** et le Bolton-Hunter **52** est obtenu quantitativement. La Figure 63 représente le profil de la chromatographie sur couche mince de la réaction de couplage de ces deux espèces en milieu organique : le premier dépôt représentant le Bolton-Hunter radiomarqué **52** et le second dépôt, le mélange réactionnel du couplage.



Figure 63. Chromatographie sur couche mince de la réaction de couplage. Eluant : $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (1:1 v/v) [1] Bolton-Hunter-¹²⁵I ; [2] Réaction de couplage DSPE-PEG₂₀₀₀-BH-¹²⁵I **53**.

Après évaporation à sec du solvant organique sous courant d'azote, une solution micellaire du composé DSPE-PEG₂₀₀₀-BH-¹²⁵I **53** est formée par addition de 500 μL de tampon phosphate 0,1M pH 7,0. L'insertion de ces micelles au niveau de la membrane des nanocapsules lipidiques par la méthode de "post-insertion" est démontrée sur les profils HPLC décrits dans la Figure 64 par un déplacement évident du temps de rétention (de 19,4 min pour les micelles à 15,9 min pour les LNC).

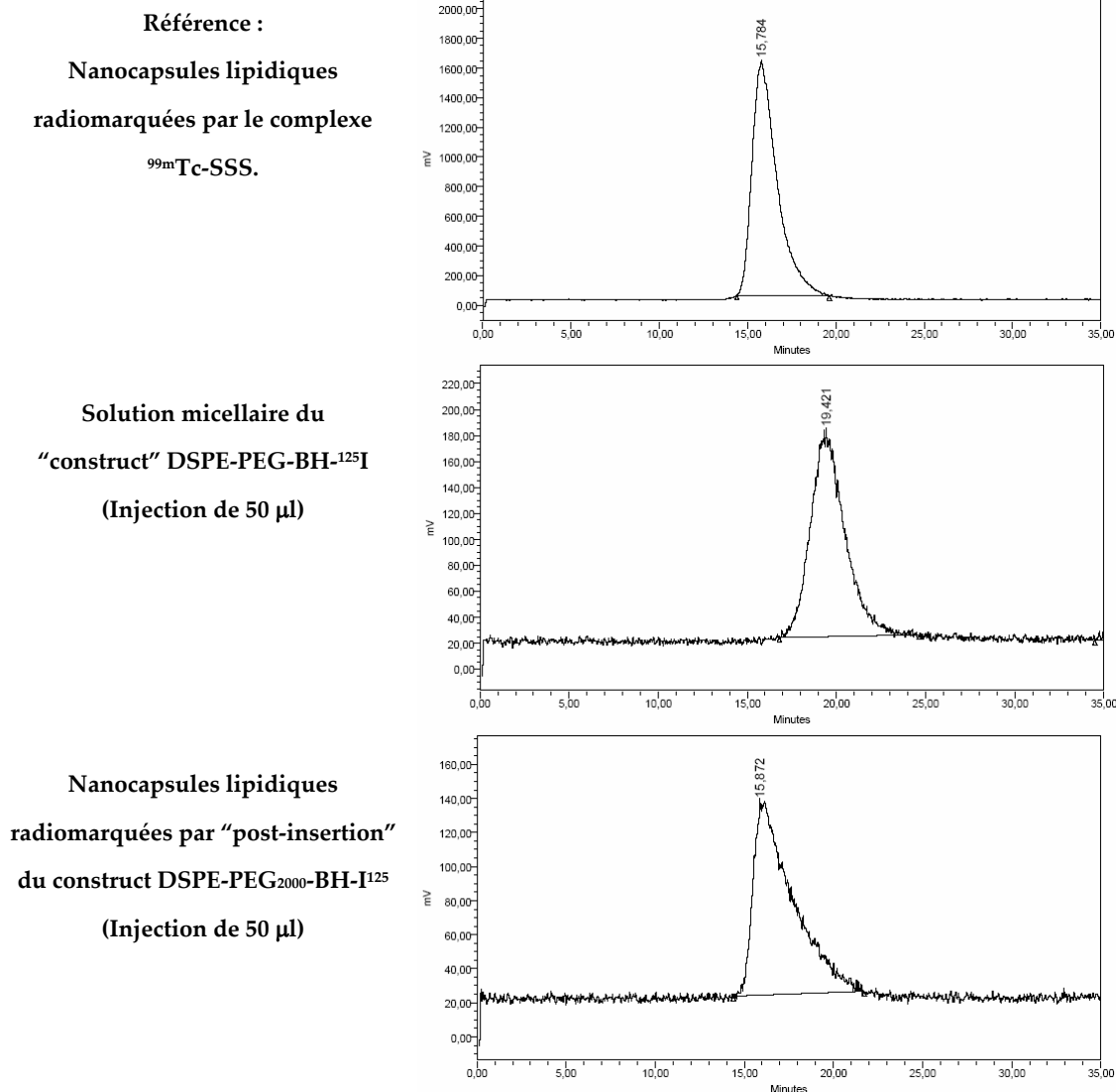


Figure 64. Profils HPLC sur Superdex[®] 200 éluée en tampon phosphate 0,1M pH 7,0 à 0,5 ml/min mettant en évidence le radiomarquage indirect à l'iode-125 de nanocapsules lipidiques préformées par un procédé de fusion d'une solution micellaire de DSPE-PEG₂₀₀₀-BH- ^{125}I **53** et de LNC préformées non radiomarquées en utilisant la méthode de "post-insertion".

1.2.2.3. Conclusion.

Cette méthode indirecte permet d'obtenir un radiomarquage stable en tampon phosphate 0,1M pH 7,0 des nanocapsules lipidiques pendant plusieurs jours. Après deux semaines en tampon phosphate, les nanocapsules lipidiques radiomarquées ont été injectées sur colonne HPLC Superdex[®] 200 et ont montré le même profil que dans la Figure 64. Cette méthode de radiomarquage confirme une bonne stabilité de l'ancrage des motifs amphiphiles phospholipide-poly(éthylène glycol) par la méthode de "post-insertion".

I.2.3. Discussion.

Les nanocapsules lipidiques ont ainsi pu être radiomarquées à l'iode-125 selon deux techniques différentes. La première consiste à radiomarquer directement des nanocapsules lipidiques possédant à leur surface l'intermédiaire DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ **7a** par le précurseur hydrosoluble, le sulfo-Bolton-Hunter, préalablement radiomarké à l'iode-125 **50**. Le couplage se faisant en milieu aqueux, cela va induire une hydrolyse partielle du précurseur radiomarké. En effet, une proportion, de l'ordre de 40%, du précurseur non réactif est récupérée après purification de la réaction de couplage. Ceci engendre alors une perte d'efficacité du radiomarquage qui pourra être un handicap non négligeable lors d'un marquage futur avec de plus fortes activités.

La seconde méthode peut alors pallier à ce problème d'hydrolyse puisque le radiomarquage du précurseur Bolton-Hunter **51** et l'étape de couplage entre le Bolton-Hunter radiomarké **52** et de l'intermédiaire DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ **7a** sont tout deux réalisés en milieu organique. Les rendements de ces deux premières étapes sont obtenus de manière très satisfaisante. Les profils HPLC montrent de toute évidence le radiomarquage des nanocapsules lipidiques selon la méthode de "post-insertion" par fusion de micelles constituées du "construct" DSPE-PEG₂₀₀₀-BH-¹²⁵I **53**. Il serait intéressant dans des travaux futurs de valider cette méthode de radiomarquage des LNC sur de plus fortes activités.

II. ETUDE DE LA FAISABILITE D'UN RADIOMARQUAGE A L'IODE-125 AU NIVEAU DU CŒUR LIPIDIQUE DES LNC.

L'intérêt des nanocapsules lipidiques est la multitude de possibilité de radiomarquage. Ainsi, les LNC peuvent être radiomarquées à l'extérieur au niveau de la membrane par des molécules amphiphiles décrites précédemment telles que les phospholipides-poly(éthylène glycol) chélatants (DSPE-PEG_n-BCA), pour des radiomarquages avec des radionucléides du type métallique ; soit par le "construct" intermédiaire DSPE-PEG_n-NH₂ permettant l'introduction de groupements prosthétiques du type Bolton-Hunter pour l'introduction de radionucléides comme ¹²⁵I, ¹³¹I voire ²¹¹At.

Les nanocapsules lipidiques peuvent également être radiomarquées au niveau du cœur lipidique par des molécules lipophiles. Ainsi, il a été démontré précédemment dans le chapitre 2 que l'introduction du complexe SSS lipophile technétié permettait un radiomarquage stable des nanocapsules lipidiques. D'autres molécules lipophiles peuvent être envisagées pour un radiomarquage interne des LNC. Ainsi, trois molécules ont été testées permettant l'introduction de radionucléides tels que l'iode-125 ou l'iode-131 (Figure 65).

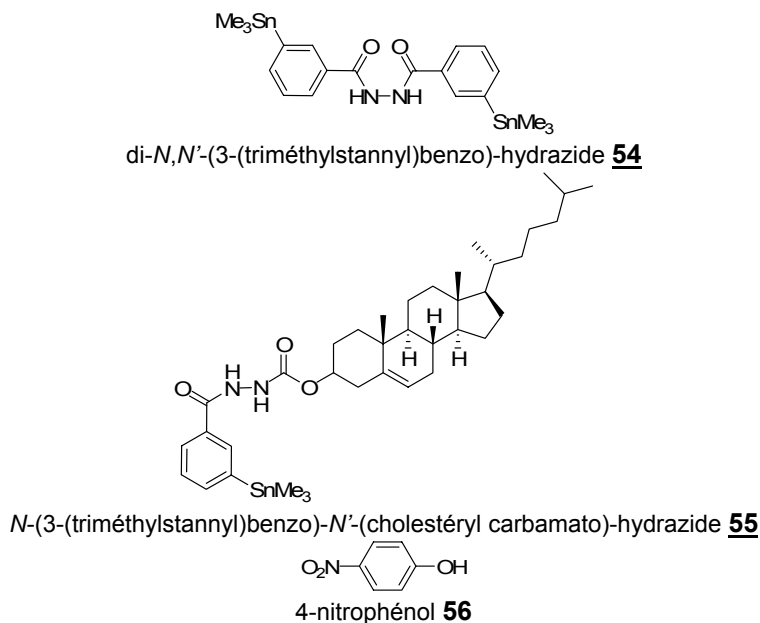


Figure 65. Précurseurs lipophiles envisagés pour le radiomarquage à l'iode du cœur lipidique des LNC.

Parmi ces précurseurs, deux molécules sont issues de synthèses : la di-*N,N'*-(3-(triméthylstannyl)benzo)-hydrazide **54** et la *N*-(3-(triméthylstannyl)benzo)-*N'*-(cholestéryl carbamato)-hydrazide **55** ; tandis que le 4-nitrophénol **56** est un produit commercial. Les deux précurseurs de synthèse présentent des groupements stannylés permettant lors du radiomarquage à l'iode une substitution électrophile régiosélective. Quant au 4-nitrophénol **56**, deux positions d'introduction de l'iode sur le noyau aromatique seront possibles, en ortho du groupement hydroxy.

II.1. Synthèse des précurseurs lipophiles.

II.1.1. Synthèse di-*N,N'*-(3-(triméthylstannyl)benzo)-hydrazide **54**.

Le composé **54** est issu du produit commercial, l'acide 3-iodobenzoïque **57** (Figure 66). La première étape de cette synthèse consiste en une réaction de Stille permettant l'introduction du groupement stannylé en présence de l'hexaméthyl-distannane et d'une quantité catalytique de dichlorobis(triphénylphosphine)palladium (II). Cette réaction conduit à l'acide 3-triméthylstannylbenzoïque **58** avec un rendement de 88%. Le composé **58** est ensuite activé quasi-quantitativement en l'ester *N*-hydroxysuccinimidyle **59** correspondant par addition de *N,N,N',N'*-tétraméthyl-*O*-(*N*-succinimidyl)-uronium tétrafluoroborate ou TSTU. L'addition d'hydrazine monohydrate conduit uniquement à la 3-(triméthylstannyl)-benzohydrazide **60** et non au produit final désiré **54**. Une dernière étape obligatoire mettant en présence l'hydrazide **60** purifiée et le 3-(triméthylstannyl)-benzoate de *N*-hydroxysuccinimidyle **59** en milieu légèrement basique donne accès au produit final **54**.

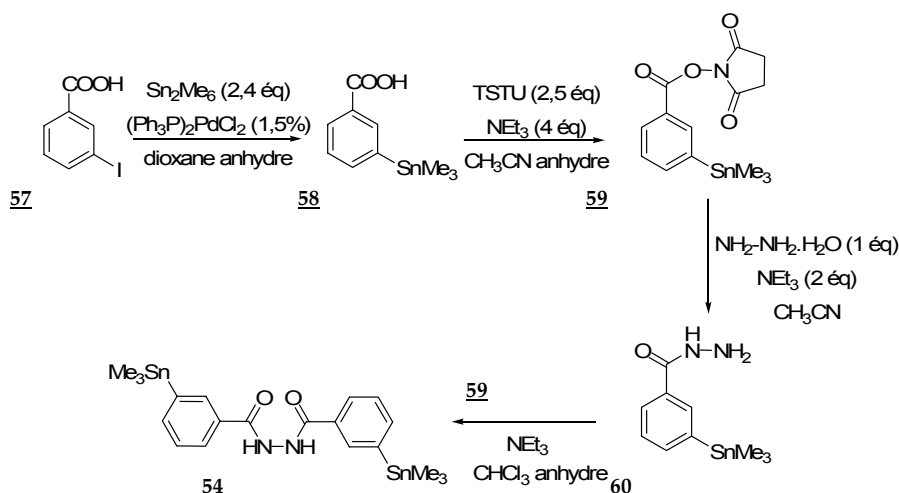


Figure 66. Synthèse de la di-*N,N'*-(3-(triméthylstannyl)benzo)-hydrazide **54**.

II.1.2. Synthèse du *N*-(3-(triméthylstannyl)benzo)-*N'*-(cholestérylcarbamato)-hydrazide **55**.

La *N*-(3-(triméthylstannyl)benzo)-*N'*-(cholestéryl carbamato)-hydrazide **55** (Figure 67) est synthétisée par couplage entre 1 équivalent de 3-(triméthylstannyl)benzohydrazide **60**, dont la synthèse a été décrite précédemment, et 1 équivalent du produit commercial, le cholestéryl chloroformate **61**. Le produit final **54** est obtenu après recristallisation dans l'acétone avec un rendement quasi-quantitatif.

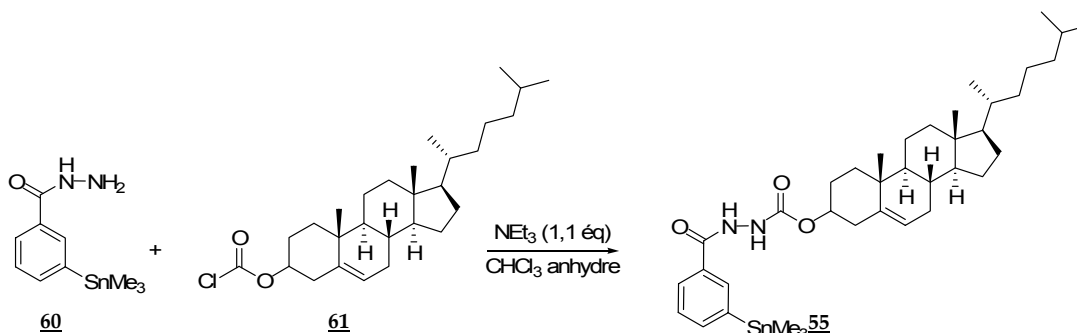


Figure 67. Synthèse de la *N*-(3-(triméthylstannyl)benzo)-*N'*-(cholestéryl carbamato)-hydrazide **55** à partir de la 3-(triméthylstannyl)benzo-hydrazide **60**.

II.2. Radiomarquages des nanocapsules lipidiques.

Les radiomarquages à l'iode-125 sont réalisés en présence d'un oxydant, la *N*-chlorosuccinimide. Contrairement à la chloramine T, l'activité de la *N*-chlorosuccinimide ne dépend pas du pH de la réaction ce qui va simplifier le protocole de radiomarquage et permettre des réactions en milieu organique.

II.2.1. Protocoles de radiomarquages.

Des solutions mères sont préparées juste avant de faire le radiomarquage :

- Une solution du précurseur **54** à 0,5 mg/ml (soit 0,88 μ mol/ml) dans du méthanol/acide acétique 5% (MeOH/AA 5%).
- Une solution du précurseur **55** à 1 mg/ml (soit 1,4 μ mol/ml) dans du CHCl_3 .
- Une solution du précurseur **56** à 0,5 mg/ml (soit 3,6 μ mol/ml) dans du dioxane.
- Deux solutions de *N*-chlorosuccinimide à 1 mg/ml (soit 7,5 μ mol/ml) soit dans du méthanol/acide acétique 5%, soit dans du dioxane.
- Une solution de Na^{127}I à 1mg/ml (6,67 μ mol/ml) dans NaOH 0,05N

Ainsi, trois tubes ont été préparés selon les conditions décrites dans le tableau 13.

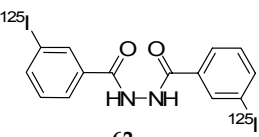
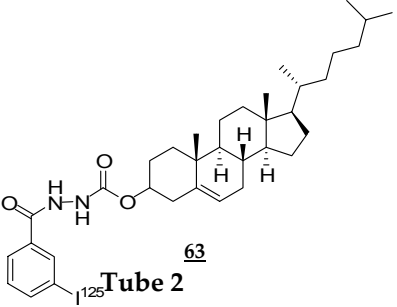
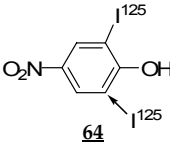
 Tube 1	 Tube 2	 Tube 3
- 11,3 μl de 54 (10 nmol). - 133,5 μl de NCS en MeOH/AA 5% (1000 nmol). - 3 μl de Na^{127}I (20 nmol) + 3,7 MBq de Na^{125}I (0,04 nmol).	- 14,2 μl de 55 (20 nmol). - 133,5 μl de NCS en dioxane (1000 nmol). - 3 μl de Na^{127}I (20 nmol) + 3,7 MBq de Na^{125}I (0,04 nmol).	- 5,5 μl de 56 (20 nmol). - 133,5 μl de NCS en dioxane (1000 nmol). - 3 μl de Na^{127}I (20 nmol) + 3,7 MBq de Na^{125}I (0,04 nmol).

Tableau 13. Récapitulatif des quantités ajoutées dans chaque tube pour le radiomarquage des précurseurs lipophiles.

Les réactions sont incubées à température ambiante pendant 5 minutes. Les précurseurs radiomarqués sont ensuite séparés de l'iode libre par chromatographie en phase inverse (C_{18}) sur une colonne Sep-Pak® (Millipore, France) éluée à l'aide d'un gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ 0,05% et MeOH. Les puretés radiochimiques sont alors évaluées par chromatographie sur couche mince sur gel de silice en CHCl_3 (100). Les plaques sont ensuite révélées au phosphor-imager. Le rendement de marquage est calculé à l'aide d'un compteur gamma, en rapportant l'activité récupérée dans les fractions purifiées du réactif radio-iodé à l'activité totale déposée sur la Sep-Pak®.

La seconde étape est l'insertion de ces précurseurs radiomarqués dans le cœur lipidique des nanocapsules lipidiques. L'iode-125 possédant une $\frac{1}{2}$ vie beaucoup plus longue que le technétium-99m (30 jours comparés à 6h), l'incorporation des précurseurs lipophiles durant le processus de formulation des nanocapsules lipidiques est plus contraignante du fait de la contamination du matériel. En effet, les températures des différentes transitions de phase lors de la formulation des nanocapsules lipidiques sont contrôlées par introduction d'un thermomètre dans le flacon sous agitation constante à l'aide d'un agitateur magnétique. Ainsi, pour éviter ce problème de contamination, la méthode de "post-insertion" utilisée sur les molécules amphiphiles a été également testée sur le radiomarquage des nanocapsules lipidiques par des molécules lipophiles.

Après rassemblement des fractions purifiées en solution méthanolique puis évaporation à sec du solvant sous courant d'azote, 1 ml de nanocapsules lipidiques préformées est ajouté dans chaque tube. Le processus de la "post-insertion" est appliqué. Les mélanges réactionnels sont ensuite purifiés sur colonne Sephadex® G-25 permettant la séparation des nanocapsules lipidiques radiomarquées de ce qui n'a pas été incorporé. Les fractions purifiées (7^{ème}) sont enfin injectés sur colonne HPLC Superdex® 200 pour valider la bonne intégrité des nanocapsules lipidiques.

II.2.2. Résultats.

Les radiomarquages des trois précurseurs lipophiles **62**, **63**, **64** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 92%, 33% et 87% après purification sur Sep-Pak®. La Figure 68 représente les trois profils chromatographiques des molécules radiomarquées après purification.

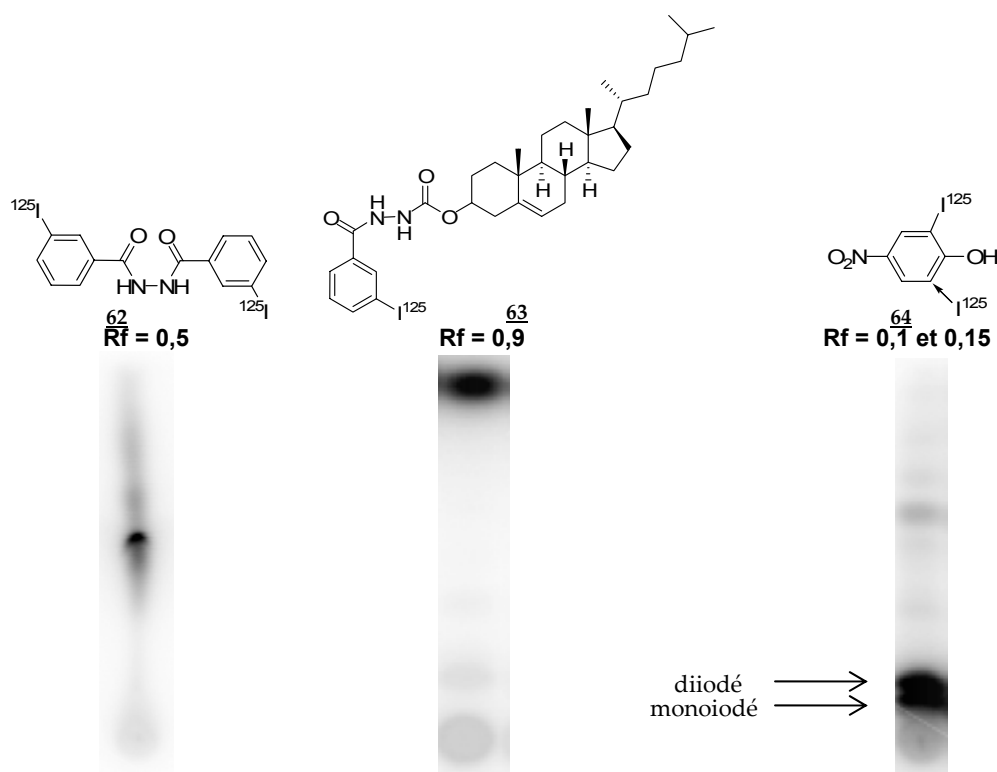
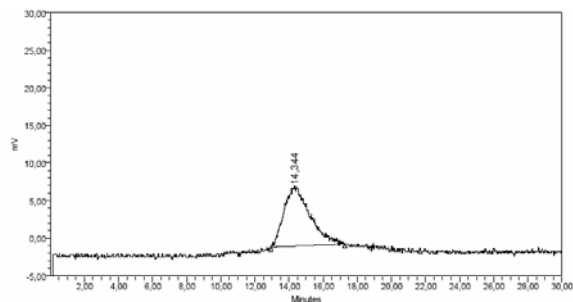


Figure 68. Chromatographies sur couche mince sur gel de silice des fractions purifiées des trois précurseurs lipophiles **62**, **63**, **64** (Eluant : CHCl_3 : 100).

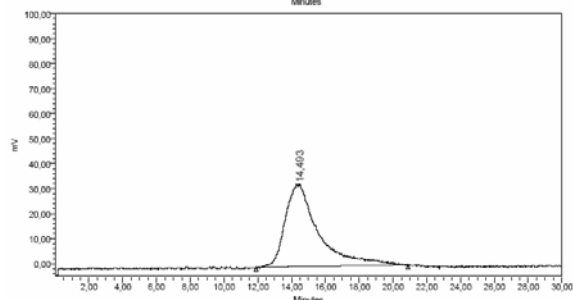
Après incubation des précurseurs lipophiles avec 1 ml de nanocapsules lipidiques, 0,5 ml des mélanges réactionnels sont déposés sur colonne Sephadex® G-25 puis élués en tampon phosphate 0,1M pH 7,0. Des fractions de 0,5 ml sont alors collectées et 10 μl de chaque fraction d'éluion sont comptés à l'aide d'un compteur gamma permettant ainsi d'évaluer le taux d'incorporation des précurseurs au sein du cœur lipidique des LNC. Ainsi, les rendements d'encapsulation des précurseurs **62**, **63**, **64** sont respectivement : 80,5% ; 41% et 51%.

La Figure 69 montrent les profils chromatographiques obtenus sur Superdex®200 des nanocapsules lipidiques radiomarquées à l'iode-125 au niveau de leur cœur lipidique.

50 μ l de nanocapsules lipidiques
radiomarquées avec la di-*N, N'*-(3-
iodobenzoyl)-hydrazide 62



100 μ l de nanocapsules lipidiques
radiomarquées avec la *N*-(3-
iodobenzoyl)-*N'*-(cholestéryl
carbamate)-hydrazide 63



100 μ l de nanocapsules lipidiques
radiomarquées avec le 4-
nitrophénol mono et diiodé 64

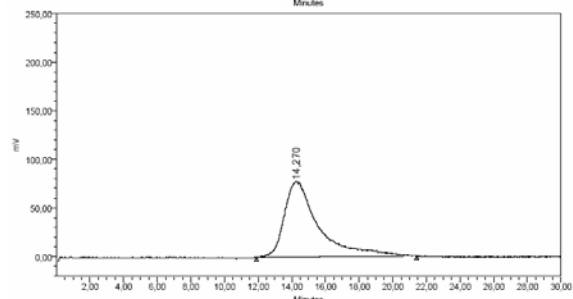


Figure 69. Profils HPLC (Superdex® 200 éluée en tampon phosphate 0,1M pH 7,0 à 0,7 ml/min) de l'incorporation des trois précurseurs lipophiles 62, 63, 64 au niveau du cœur lipidique des nanocapsules lipidiques.

II.2.3. Conclusion.

Il a été démontré précédemment que l'utilisation de la méthode de "post-insertion" pour des radiomarquages au niveau du cœur lipidique des nanocapsules lipidiques par incorporation de précurseurs lipophiles 62, 63, 64 était réalisable mais pas optimale. La couche extérieure hydrophile constituée du Solutol® peut être une barrière à l'incorporation des molécules lipophiles. Cette méthode convient plus aux molécules amphiphiles pour l'insertion au niveau de la membrane. Cependant, elle peut être intéressante pour ce type de radiomarquage à condition d'optimiser les conditions opératoires (temps de chauffage plus long, agitation plus vive etc).

Cette méthode a également été testée pour l'incorporation du complexe lipophile technétium-99m. En raison de la précipitation du composé en milieu aqueux lors de la radiosynthèse du complexe (*cf chapitre 2 II.2.2.1.b*), le taux d'incorporation du complexe n'est que de 60% de l'activité totale. Pour récupérer une activité maximum, une solubilisation en solvant organique a été obligatoire ce qui ne permet pas l'addition de nanocapsules lipidiques préformées sur le complexe.

CHAPITRE 5.CONCLUSION

La radioimmunothérapie a montré son efficacité dans le traitement des lymphomes. En revanche, en ce qui concerne les tumeurs solides, son efficacité est limitée par la faible activité que peuvent délivrer les AcM ou les haptènes radiomarqués aux cellules tumorales. Afin de résoudre ce problème, nous avons envisagé l'utilisation de nanocapsules lipidiques immunospécifiques dans un système de préciblage afin de diminuer la toxicité engendrée par la circulation trop longue de la radioactivité liée à un anticorps dans l'organisme. Par conséquent, les nanocapsules lipidiques devront transporter de la radioactivité mais également présenter à leur surface des haptènes qui seront reconnus par un anticorps bispécifique.

Les nanocapsules lipidiques sont à l'origine utilisées comme transporteurs de molécules médicamenteuses. Leur utilisation permet soit une protection contre le système responsable du mécanisme de résistance de l'organisme vis-à-vis des drogues médicamenteuses, soit une diminution des effets secondaires liés à l'injection de la molécule seule. Dans les deux cas, cela permet d'augmenter l'efficacité du traitement. Les nanocapsules lipidiques présentent des propriétés de tolérance vis-à-vis de l'organisme particulièrement intéressantes, mais également la capacité de transporter de fortes quantités de principe actif. Toutes ces propriétés caractéristiques des nanocapsules lipidiques en font un outil intéressant pour des applications en RIT des cancers.

Il a été démontré dans la littérature que les vecteurs colloïdaux avaient la capacité de se fixer sur les tumeurs solides de façon significative (Drummond DC, *et al.* 1999 ; Moghimi SM, *et al.* 2001 ; Brigger I, *et al.* 2002) mais non spécifique. Cette propriété de reconnaissance pourrait être largement améliorée en associant l'utilisation des LNC à une technique de préciblage. De plus, l'insertion du système nanocapsule/radionucléides dans une méthode de préciblage permettrait d'augmenter l'efficacité thérapeutique sur les tumeurs solides de manière significative.

L'objectif de ce travail de thèse a été de modifier la composition originelle des nanocapsules lipidiques pour une application future en RIT. La méthode envisagée a consisté à travailler à différents niveaux :

1. Augmentation du temps de résidence des LNC
2. Vectorisation
3. Radiomarquages des LNC extérieurs ou intérieurs

1. Augmentation du temps de résidence des LNC

Afin d'améliorer le temps de résidence des LNC au sein de l'organisme, une première modification a consisté à ajouter dans la formulation des molécules polymériques en surface. Dans le but d'étudier l'influence de la taille des chaînes polymériques sur le comportement *in vivo* des nanocapsules lipidiques, deux types de molécules polymériques de longueurs de poly(éthylène glycol) différentes, disponibles commercialement, ont été envisagées : DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe et DSPE-PEG₅₀₀₀-OMe. Différentes voies d'ancrage de ces molécules amphiphiles ont été testées.

Une première approche a consisté en l'introduction de ces molécules lors de l'étape de la formulation dite "classique". Par cette méthode d'insertion, deux formulations optimales ont été obtenues à masses égales de DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe et DSPE-PEG₅₀₀₀-OMe. Les résultats *in vivo* de cinétiques sanguines ont montré que les nanocapsules lipidiques contenant de la DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe circulaient légèrement plus longtemps que leurs homologues contenant de la DSPE-PEG₅₀₀₀-OMe (49 minutes contre 43 minutes). Les temps de circulation obtenus sont encore insuffisants pour une application future en RIT.

Une deuxième voie d'insertion des polymères dite de "post-insertion" a été développée permettant une amélioration très intéressante de la quantité introduite de motifs pégylés. Une étude *in vivo* chez la souris sera menée prochainement sur ce type de nanocapsules lipidiques modifiées radiomarquées au niveau du cœur lipidique à l'aide du complexe lipophile technété.

2. Vectorisation

L'addition de telles molécules pouvant interférer dans la reconnaissance haptène-anticorps, des "constructs" poly(éthylène glycol) amphiphiles de longueurs différentes ont été synthétisés permettant l'accès des haptènes à l'extrémité hydrophile des polymères. Plusieurs haptènes, dont les anticorps bispécifiques peuvent être disponibles au laboratoire, ont pu être couplés en bout de chaîne pégylée :

- Le DTPA, qui est utilisé en tant qu'haptène lorsqu'il est associé avec de l'indium.
- Le DNP, dérivé de l'acide 6-(2,4-dinitrophénylamino)-caprique.
- Le HSGL ou HistaminoSuccinimidylGlycylLysine.

3. Radiomarquages des LNC extérieur ou intérieur

Le radiomarquage peut s'effectuer à l'extérieur ou à l'intérieur des nanocapsules lipidiques en fonction de la nature chimique du radioélément à utiliser ou de sa méthode de complexation. Les nanocapsules lipidiques offrent diverses possibilités d'introduction de radionucléides. Leur constitution permet d'une part un radiomarquage extérieur par des "constructs" amphiphiles de synthèse ou des molécules hydrophiles, et d'autre part un radiomarquage intérieur par des molécules lipophiles.

✂ Radiomarquages extérieurs

En ce qui concerne les radiomarquages extérieurs, la couche protectrice de Solutol® de même que l'addition dans la formulation des molécules pégylées de longue taille peuvent être une barrière pour l'accès des radionucléides à leurs sites de chélation. Par conséquent, de la même manière que pour les haptènes, les agents chélatants ont été placés à l'extrémité hydrophile des chaînes poly(éthylène glycol) donnant ainsi les "constructs" suivants :

- DSPE-PEG_n-DTPA **43a/43b**
- DSPE-PEG_n-CHXA"DTPA **44a/44b**
- DSPE-PEG_n-DOTA **45a/45b**
- DSPE-PEG_n-TE3A **46a/46b** avec n = 2000 et 6000.

Une partie de ces travaux de thèse a donc consisté à élaborer la synthèse de plusieurs molécules amphiphiles du type phospholipide-poly(éthylène glycol)-agent chélatant.

Plusieurs types de radiomarquages extérieurs ont été testés en utilisant les "constructs" pégylés de synthèse. L'indium-111 a pu être introduit au niveau de la membrane avec de bons rendements grâce à l'insertion au préalable des "constructs" chélatants : DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA **43a** ; DSPE-PEG₂₀₀₀-CHXA"DTPA **44a** ; DSPE-PEG₂₀₀₀-DOTA **45a**. Les différents marquage à l'indium-111 de nanocapsules lipidiques ont montré leur intégrité en tampon phosphate 0,1M pH 7,0 jusqu'à 3 jours.

Une autre partie de cette thèse décrit la réalisation de composés du type phospholipide-poly(éthylène glycol)-précurseur permettant le radiomarquage extérieur à l'iode.

L'iode-125 a ainsi pu être associée à la membrane des nanocapsules lipidiques selon deux méthodes. La première consiste en un radiomarquage direct de nanocapsules lipidiques préformées, contenant l'intermédiaire de synthèse DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ **7a**, par un précurseur prosthétique radiomarké à l'iode-125. Afin d'éviter l'incorporation du précurseur dans la nanocapsule, un dérivé hydrosoluble du Bolton-Hunter, le sulfo-Bolton-Hunter **49**, a été utilisé. Le problème engendré par cette méthode est la perte de 40% du précurseur lors de la réaction de couplage avec les nanocapsules lipidiques modifiées, due vraisemblablement à l'hydrolyse de la fonction réactive.

La seconde méthode, indirecte, qui a été utilisée permet d'éviter ce problème d'hydrolyse puisqu'elle est réalisée en milieu organique. Ainsi, le réactif de Bolton-Hunter radiomarké à l'iode-125 **52** réagit sur l'intermédiaire DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ **7a** en milieu chloroformique quantitativement sans perte de radioactivité. Le "construct" engendré par le radiomarquage, DSPE-PEG₂₀₀₀-BH-¹²⁵I **53**, forme en milieu aqueux une solution micellaire et va fusionner au niveau de la membrane des nanocapsules lipidiques par la méthode de "post-insertion". Après deux semaines en tampon phosphate 0,1M pH 7,0, aucun relargage de la radioactivité n'a été observé.

L'indium-111 et l'iode-125 sont les deux radionucléides commercialement disponibles qui nous ont permis de réaliser la mise au point des techniques de radiomarquages. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont validé la faisabilité des marquages en surface des nanocapsules. Il serait intéressant prochainement d'étudier la capacité des nanocapsules lipidiques à contenir à leur surface des radionucléides analogues émetteurs bêta et alpha avec de plus fortes activités si besoin pour permettre à l'avenir une utilisation en thérapie (yttrium-90, bismuth-213, iode-131, astate-211).

✂ Radiomarquages intérieurs.

L'incorporation de molécules lipophiles au sein du cœur lipidique des nanocapsules est une seconde possibilité d'introduction de radionucléides.

Des études antérieures ont montré la possibilité de radiomarquage du cœur lipidique de LNC natives par incorporation au cours du processus de formulation d'un complexe lipophile technétié (SSS-^{99m}Tc) (Ballot S, *et al.* 2006). Cette technique a également été employée sur des nanocapsules lipidiques modifiées. Des stabilités sanguines ont montré une bonne intégrité des LNC ainsi radiomarkées. Des études *in vivo* sont en cours de réalisation chez la souris sur ce type de nanocapsules lipidiques.

D'autres molécules lipophiles de synthèse (**62**, **63**, **64**) ont été incorporées dans le cœur huileux, essentiellement constitué par le Labrafac®. Ces molécules ont été préalablement radiomarkées à l'iode-125 puis introduite par la méthode de "post-insertion". Cette méthode peut être intéressante dans la mesure où cela évite une contamination du matériel utilisé pour l'élaboration de la formulation, mais également dans le cas où le processus de radiomarquage des LNC doit se faire en conditions stériles. Mais, pour l'instant, cette technique n'est pas optimale. Des modifications des conditions du mode opératoire pourraient être envisagées dans l'avenir.

En conclusion, ces travaux de thèse ont permis d'initier la création d'un outil pour des applications finales en radioimmunothérapie des cancers grâce à l'utilisation de nanocapsules lipidiques. Différentes approches de vectorisation et de radiomarquage ont été explorées. Les techniques de radiomarquages employées

vont ouvrir des perspectives pour de futurs travaux de recherche qui consisteront à optimiser ces méthodes et également à augmenter les activités spécifiques associées aux LNC pour permettre leur utilisation en RIT. Il faudra également évaluer biologiquement le taux de molécules amphiphiles adéquate devant être insérées au niveau de la membrane des LNC pour permettre le meilleur ciblage des nanocapsules lipidiques vers leur cible ; tout cela dépendra évidemment du type de tumeur à cibler. Les différentes molécules synthétisées serviront à la fois pour les nanocapsules lipidiques mais également pour le développement d'un outil similaire, les liposomes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Allen TM. The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1994** ; 13 : 285-309.

Allen TM, Brandeis E, Hansen CB, Kao GY, Zalipsky S. A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1995** ; 1237 : 99-108.

Arano Y, Matsushima H, Tagawa M, Koizumi M, Endo K, Konishi J, Yokoyama A. A novel bifunctional metabolizable linker for the conjugation of antibodies with radionuclides. *Bioconjugate Chem.* **1991** ; 2 : 71-76.

Bale WF, Spar IL, Goodland RL. "Experimental radiation therapy of tumors with ¹³¹I-carrying antibodies to fibrin." *Cancer Res.* **1960** ; 20 : 1488-1494.

Ballot S, Noiret N, Hindré F, Denizot B, Garin E, Rajerison H, Benoît JP. ^{99m}Tc/¹⁸⁸Re-labelled lipid nanocapsules as promising radiotracers for imaging and therapy : formulation and biodistribution. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2006** ; 33 : 602-607.

Barbet J, Kraeber-Bodéré F, Vuillez JF, Gautherot E, Rouvier E, Chatal JF. Pretargeting with the Affinity Enhancement System for radioimmunotherapy. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* **1999** ; 14 : 153-166.

Bardiès M, Faivre-Chauvet A. Sélection des radioéléments pour la radiothérapie interne. *Inc : Radiopharmaceutiques : Chimie des radiotraceurs et applications biologiques.* Comet M. Vidal M. Presses Universitaires de Grenoble. **1998** ; 673-685.

Benoist E. Synthèse de ligands tétradentés N₂S₂ en vue du radiomarquage de vecteurs immunospécifiques pour des applications diagnostiques et thérapeutiques en cancérologie. *Thèse de Doctorat* **1997**.

Benoît JP, Lamprecht A. Use of P-glycoprotein inhibito surfactants at the surface of a colloidal carrier. **2004**. *Patent WO2004071498*.

Bexxar (tositumomab and ¹³¹I-tositumomab) [package insert]. San Diego, CA : IDEC Pharmaceuticals Corporation ; **2002**.

- Boerman OC, van Schaijk FG, Oyen WJG, Corstens FHM. Pretargeted radioimmunotherapy of cancer : Progress step by step. *J. Nucl. Med.* **2003** ; 44 : 400-411.
- Boswell CA, McQuade P, Weisman GR, Wong EH, Anderson CJ. Optimization of labelling and metabolite analysis of copper-64-labeled azamacrocyclic chelators by radio-LC-MS. *Nucl. Med. Biol.* **2005** ; 32 : 29-38.
- Boyle CC, Paine AJ, Mather SJ. The mechanism of hepatic uptake of a radiolabelled monoclonal antibody. *Int. J. Cancer* **1992** ; 50 : 912-917.
- Brady ED, Chong HS, Milenic DE, Brechbiel MW. Development of a spectroscopic assay for bifunctional ligand-protein conjugates based on copper. *Nucl. Med. Biol.* **2004** ; 31 : 795-802.
- Brechbiel MW, Gansow OA. Synthesis of C-functionalized trans-cyclohexyldiethylenetriaminepenta-acetic acids for labelling of monoclonal antibodies with the bismuth-212 α -particle emitter. *J. Chem. Soc., Perkin Trans* **1992** ; 1 : 1173-1178.
- Breitz HB, Weiden PL, Vanderheyden JL, Appelbaum JW, Bjorn MJ, Fer MF, Wolf SB, Ratliff BA, Seiler CA, Foisie DC et al. Clinical experience with rhenium-186-labeled monoclonal antibodies for radioimmunotherapy : results of phase I trials. *J. Nucl. Med.* **1992** ; 33 : 1099-1112.
- Breitz HB, Weiden PL, Beaumier PL, Axworthy DB, Seiler C, Su FM, Graves S, Bryan K, Reno JM. Clinical optimization of pretargeted radioimmunotherapy with antibody-streptavidin conjugate and ^{90}Y -DOTA-biotin. *J. Nucl. Med.* **2000** ; 41 : 131-140.
- Briggers I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002** ; 54 : 631-651.
- Brouwers A, Van Eerd J, Oosterwijk E, Oyen O, Corsten F, Boerman O. Preparation, characterization and application of ^{131}I , ^{186}Re , ^{90}Y and ^{177}Lu -labelled CG250 for radioimmunotherapy of renal cell carcinoma. *J. Nucl. Med.* **2002** ; 43 : 268.

Buchsbaum DJ, Wahl RL, Normolle DP, Kaminski MS. Therapy with unlabeled and ¹³¹I-labeled pan-B-cell monoclonal antibodies in nude mice bearing Raji Burkitt's lymphoma xenografts. *Cancer Res.* **1992** ; 52 : 6476-6481.

Cahouet A, Denizot B, Hindré F, Passirani C, Heurtault B, Moreau M, Le Jeune JJ, Benoît JP. Biodistribution of dual radiolabeled lipidic nanocapsules in the rat scintigraphy and γ counting. *Int. J. Pharm.* **2002** ; 242 : 367-371.

Cao Y, Suresh MR. Bispecific antibodies as novel bioconjugates. *Bioconjugate Chem.* **1998** ; 9 : 635-644.

Cao Y, Suresh MR. Bispecific Mab aided liposomal drug delivery. *J. Drug Targeting* **2000** ; 8 : 257-266.

Carter P. Toward the production of bispecific antibody fragments for clinical applications. *J. Hematotherapy* **1995** ; 4 : 463-470.

Carter P. Bispecific Human IgG by design. *J. Immunol. Methods* **2001** ; 248 : 7-15.

Chatal JF, Faivre-Chauvet A, Bardiès M, Peltier P, Gautherot E, Barbet J. Bifunctional antibodies for radioimmunotherapy. *Hybridoma* **1995** ; 14 : 125-128.

Chatal JF. Radioimmunothérapie. *Inc : Radiopharmaceutiques : Chimie des radiotraceurs et applications biologiques. Comet M. Vidal M. Presses Universitaires de Grenoble.* **1998** ; 711-717.

Chatal JF, Hoefnagel CA. Radionuclide therapy. *The Lancet.* **1999** ; 357 : 931-935.

Chérel M, Davodeau F, Kraeber-Bodéré F, Chatal JF. Current status and perspectives in alpha radioimmunotherapy. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2006** ; 50 : 322-329.

Cook AG, Wood PJ. Chemical synthesis of bifunctional monoclonal antibodies : potential advantages in immunoassay systems. *J. Immunol. Methods* **1994** ; 171 : 227-237.

Cotton RG, Milstein C. Letter : Fusion of two immunoglobulin-producing myeloma cells. *Nature* **1973** ; 244 : 42-43.

Couturier O, Supiot S, Mougin-Degraef M, Faivre-Chauvet A, Carlier T, Chatal JF, Davodeau F, Chérel M. Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nucleides. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2005** ; 32 : 601-614.

Demainay F, Noiret N, Roucoux A, Patin H, Bellande E, Pasqualini R, Moisan A. New bis(dithiocarboxylato)nitridotechnetium-99m radiopharmaceuticals for leucocyte labelling : *in vitro* and *in vivo* studies. *Nucl. Med. Biol.* **1997** ; 24 : 439-445.

Demainay F, Roucoux A, Dazord L, Noiret N, Moisan A, Patin H. Studies of technetium-99m nitridobisthiocarbonylate leucocyte specific radiopharmaceutical : [^{99m}TcN(DTCX)₂], DTCX =CH₃(CH₂)₈CS₂. The cellular and subcellular distribution in human cells, and chemical behaviour. Synthesis of the analogous rhenium-188 radiopharmaceutical. *Nucl. Med. Biol.* **1999** ; 26 : 225-231.

Deshpande SV, DeNardo SJ, Meares CF, McCall MJ, Adams GP, Moi MK, DeNardo GL. Copper-67-labeled monoclonal antibody Lym-1, a potential radiopharmaceutical for cancer therapy : labeling and biodistribution in RAJI tumored mice. *J. Nucl. Med.* **1988** ; 29 : 217-225.

DeSilva BS, Wilson GS. Solid phase synthesis of bifunctional antibodies. *J. Immunol. Methods* **1995** ; 188 : 9-19.

DeSilva BS, Wilson GS. Synthesis of bifunctional antibodies for Immunoassays. *Methods* **2000** ; 22 : 33-43.

Dillman R. Radiolabeled anti-CD20 monoclonal antibodies or the treatment of B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncology* **2002** ; 16 : 3545-3557.

Douillard JY, Chatal JF. L'utilisation des anticorps ou de leurs fragments pour le traitement des tumeurs. *Bulletin du cancer* **1998** ; 85 : 951-959.

Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol. Rev.* **1999** ; 51 : 691-743.

Ehrlich P, Herta CA, Shigas K. "Ueber einige verwendungen der naphthochinosuflsaure." *Ztschr. f. Physiol. Chem.* **1904**, 61, 379-392.

Fishman A, Farrah ME, Zhong JH, Paramanantham S, Carrera C, Lee-Ruff E. Synthesis and investigation of novel branched PEG-based soluble polymer supports. *J. Org. Chem.* **2003** ; 68 : 9843-9846.

Fournier E, Passirani C, Montero-Menei CN, Benoît JP. Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers : focus on brain biocompatibility. *Biomaterials* **2003** ; 24 : 3311-3331.

Furukawa S, Katayama N, Iizuka T, Urabe I, Okada H. Preparation of polyethylene glycol-bound NAD and its application in a model enzyme reactor. *FEBS Lett.* **1980** ; 121 : 239-242.

Garcion E, Lamprecht A, Heurtault B, Paillard A, Aubert-Pouessel A, Denizot B, Menei P, Benoît JP. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol. Cancer Res.* **2006** ; 5 : 1710-1722.

Gautherot E, Rouvier E, Daniel L, Loucif E, Bouhou J, Manetti C, Martin M, Le Doussal JM, Barbet J. Pretargeted radioimmunotherapy of human colorectal xenografts with specific antibody and ¹³¹I-labeled bivalent hapten. *J. Nucl. Med.* **2000** ; 41 : 480-487.

Gestin JF, Faivre-Chauvet A, Mease RC, Saï-Maurel C, Thédrez P, Slinkin M, Meinken GE, Srivastava SC, Chatal JF. Introduction of five potentially metabolizable linking groups between ¹¹¹In-cyclohexyl EDTA derivatives and F(ab')₂ fragments of anti-carcinoembryonic antigen antibody – A new reproducible synthetic method. *Nucl. Med. Biol.* **1993** ; 20 : 755-762.

Glennie MJ, McBride HM, Worth AT, Stevenson GT. Preparation and performance of bispecific F(ab'γ)₂ antibody containing thioether-linked Fab'γ fragments. *J. Immunol.* **1987** ; 139 : 2367-2375.

Goldenberg DM, Horowitz JA, Sharkey RM, Hall TC, Murphy S, Goldenberg H, Lee R, Stein R, Siegel JA, Izon DO. Targeting, dosimetry, and radioimmunotherapy of B-cell lymphomas with iodine-131-labeled LL2 monoclonal antibody. *J Clin. Oncol.* **1991** ; 9 : 548-564.

- Goldenberg DM, Sharkey RM. Advances in cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2006** ; 50 : 248-264.
- Griffiths GL, Govindan SV, Sharkey RM, Fisher DR, Goldenberg DM. ^{90}Y -DOTA-hLL2 : an agent for radioimmunotherapy of non-hodgkin's lymphoma. *J. Nucl. Med.* **2003** ; 44 : 77-84.
- Harrington KJ, Mubashar M, Peters AM. Polyethylene glycol in the design of tumor-targeting radiolabelled macromolecules – lessons from liposomes and monoclonal antibodies. *Q. J. Nucl. Med.* **2002** ; 46 : 171-180.
- Haseman MK, Goodwin DA, Meares CF, Kaminski MS, Wensel TG, McCall MJ, Levy R. Metabolizable ^{111}In chelate conjugated anti-idiotypic monoclonal antibody for radioimmunodetection of lymphoma in mice. *Eur. J. Nucl. Med.* **1986** ; 12 : 455-460.
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Richard J, Benoît JP. Nanocapsules lipidiques, procédé de préparation et utilisation comme médicament. *French Patent n° 0002688*. **2000**.
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoît JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm. Res.* **2002a** ; 19 : 875-880.
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoît JP. Properties of polyethylene glycol 660 12-hydroxy stearate at a triglyceride/water interface. *Int. J. Pharm.* **2002b** ; 242 : 167-170.
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Benoît JP, Proust JE. Interfacial stability of lipid nanocapsules. *Colloids Surf., B* **2003a** ; 30 : 225-235.
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Venier-Julienne MC, Proust JE, Phan-Tan-Luu R, Benoît JP. The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003b** ; 18 : 55-61.
- Hnatowich DJ, Virzi F, Rusckowski M. Investigations of avidin and biotin for imaging applications. *J. Nucl. Med.* **1987** ; 28 : 1294-1302.

- Hoarau D, Delmas P, David S, Roux E, Leroux JC. Novel long-circulating lipid nanocapsules. *Pharm. Res.* **2004** ; 21 : 1783-1789.
- Holliger P, Prospero T, Winter G. "Diabodies" : small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993** ; 90 : 6444-6448.
- Huhalov A, Chester KA. Engineered single chain antibody fragments for radioimmunotherapy. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2004** ; 48 : 279-288.
- Ishida O, Maruyama K, Sasaki K, Iwatsuru M. Size-dependent extravasation and interstitial localization of polyethyleneglycol liposomes in solid tumor-bearing mice. *Int. J. Pharm.* **1999** ; 190 : 49-56.
- Jazirehi AR, Bonavida B. Cellular and molecular signal transduction pathways modulated by rituximab (Rituxan, anti-CD20 mAb) in non-hodgkin's lymphoma : implications in chemosensitization and therapeutic intervention. *Oncogene* **2005** ; 24 : 2121-2143.)
- Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* **1986** ; 321: 522-525.
- Jurisson S, Berning D, Jia W, Ma D. Coordination compounds in nuclear medicine. *Chem. Rev.* **1993** ; 93 : 1137-1156.
- Khalid MN, Simard P, Hoarau D, Dragomir A, Leroux JC. Long circulating poly(ethylene glycol)-decorated lipid nanocapsules deliver docetaxel to solid tumors. *Pharm. Res.* **2006** ; 23 : 752-758.
- Kaminski MS, Zasadny KR, Francis IR, Milik AW, Ross CW, Moon SD, Crawford SM, Burgess JM, Petry NA, Butchko GM, Glenn SD, Wahl RL. Radioimmunotherapy of B-cell lymphoma with ¹³¹I-anti-B1 (anti-CD20) antibody. *N. Engl. J. Med.* **1993** ; 329 : 459-465.
- Kaminski MS, Zasadny KR, Francis IR, Fenner MC, Ross CW, Milik AW, Ester J, Tuck M, Regan D, Fisher S, Glenn SD, Wahl RL. Iodine-131-anti-B1 radioimmunotherapy for B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **1996** ; 14 : 1974-81.

Kaminski MS, Estes J, Zasadny KR, Francis IR, Ross CW, Milik AW, Tuck M, Regan D, Fisher S, Gutierrez J, Kroll S, Stagg R, Tidmarsh G, Wahl RL.

Radioimmunotherapy with ^{131}I -tositumimab for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma : updated results and long-term follow-up of the university of Michigan experience. *Blood* **2000**; 96 : 1259-1266.

Klibanov AL, Maruyama K, Beckerleg AM, Torchilin VP, Huang L. Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes size and is unfavorable for immunoliposome binding to target. *Biochim. Biophys. Acta* **1991** ; 1062 : 142-148.

Köhler G, Milstein C. "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* **1975** ; 256 : 495-497.

Kraeber-Bodéré F, Bardet S, Hoefnagel CA, Vieira MR, Vuillez JP, Murat A, Ferreira TC, Bardiès M, Ferrer L, Resche I. Radioimmunotherapy of medullary thyroid cancer using bispecific antibody and iodine-131 labeled bivalent hapten : preliminary results of phase I/II clinical trial. *Clin. Cancer Res.* **1999** ; 5 : 3190-3198.

Kreuter Jörg. Nanoparticulate systems for brains delivery of drugs. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001** ; 47 : 65-81.

Lamprecht A Bouligand Y, Benoît JP. New lipid nanocapsules exhibit sustained release properties for amiodarone. *J. Controlled Release* **2002** ; 84 : 59-68.

Lamprecht A, Saumet JL, Roux J, Benoît JP. Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. *Int. J. Pharm.* **2004** ; 278 : 407-414.

Lamprecht A, Benoît JP. Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition. *J. Controlled Release* **2006** ; 112 : 208-213.

Le Doussal JM, Martin M, Gautherot E, Delaage M, Barbet J. In vitro and in vivo targeting of radiolabeled monovalent and bivalent haptens with dual specificity monoclonal antibody conjugates : Enhanced divalent hapten affinity for cell-bound antibody conjugate. *J. Nucl. Med.* **1989** ; 30 : 1358-1366.

Leserman LD, Barbet J, Kourilsky F, Weinstein JN. Targeting to cells of fluorescent liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein A. *Nature* **1980** ; 288 : 602-604.

Macklis RM, Kaplan WD, Ferrara JLM, Atcher RW, Hines JJ, Burakoff SJ, Norman Coleman C. Alpha particle radioimmunotherapy : animal models and clinical prospects. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* **1989** ; 16 : 1377-1387.

Maloney DG, Liles TM, Czerwinski DK, Waldichuk C, Rosenberg J, Grillo-Lopez A, Levy R. Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood* **1994** ; 84 : 2457-2466.

Maruyama K, Takizama M, Yuda T, Kennel SJ, Huang L, Iwatsuru M. Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic poly(ethylene glycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* **1995** ; 1234 : 74-80.

Maruyama K. PEG-immunoliposomes. *Bioscience Reports* **2002** ; 22 : 251-266.

Mausner LF, Srivastava SC. Radionuclides for radioimmunotherapy. *Med. Phys.* **1993** ; 20 : 503-509.

McCardle RJ, Harper P, Spar IL, Bale WF, Andros G, Jiminez F. Studies with iodine-131-labeled antibody to human fibrinogen for diagnosis and therapy of tumors. *J. Nucl. Med.* **1966** ; 7 : 837-847.

McDevitt MR, Sgouros G, Finn RD, Humm JL, Jurcic JG, Larson SM, Scheinberg DA. Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur. J. Nucl. Med.* **1998** ; 25 : 1341-1351.

Meares CF, McCall MJ, Deshpande SV, DeNardo SJ, Goodwin DA. Chelate radiochemistry cleavable linkers lead to altered levels of radioactivity in the liver. *Int. J. Cancer (Suppl 2)* **1988** ; 99-102.

Mévellec F, Roucoux A, Noiret N, Patin H, Dazort L, Moisan A. *Q. J. Nucl. Med.* **1998** ; 42 : 47.

Mévellec F, Tisato F, Refosco F, Roucoux A, Noiret N, Patin H, Bandoli G. Synthesis and characterization of the "sulfur-rich" bis(perthiobenzoato) (dithiobenzoato)technetium (III) heterocomplex. *Inorg. Chem.* **2002** ; 41 : 598-601.

Mévellec F, Pasqualini R, Patin H, Roucoux A, Noiret N. Complexes de technétium ou de rhénium, produits radiopharmaceutiques, les contenant et leur préparation. *French Patent n°FR0114991* ; **2001**.

Mévellec F, Roucoux A, Noiret N, Moisan A, Patin H, Duatti A. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2003** ; 46 : 319

Milenic DE. Radioimmunotherapy : Designer molecules to potentiate effective therapy. *Seminars in Radiation Oncology* **2000** ; 10 : 139-155.

Mishra AK, Draillard K, Faivre-Chauvet A, Gestin JF, Curtet C, Chatal JF. A convenient, novel approach for the synthesis of polyaza macrocyclic bifunctional chelating agents. *Tetrahedron Lett.* **1996** ; 37 : 7515-7518.

Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles : Theory to practice. *Pharmacol. Rev.* **2001** ; 53 : 283-318.

Morandeau L. Synthèse d'haptènes bivalents couplés à des agents chélatants bifonctionnels, pour des applications à la radioimmunothérapie des cancers, dans le cadre du système AES (Affinity Enhancement System). *Thèse de Doctorat* **2001**.

Morandeau L, Benoist E, Loussouarn A, Ouadi A, Le Saëc P, Mougin M, Faivre-Chauvet A, Le Boterff J, Chatal JF, Barbet J, Gestin JF. Synthesis of new bivalent peptides for applications in the affinity enhancement system. *Bioconjugate Chem.* **2005** ; 16 : 184-193.

Moroney S, Plückthun A. Modern antibody technology : The impact on drug development. In : *Knäblein J, ed. Modern Biopharmaceuticals. Weinheim, Germany : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA ; 2005 ; 1147-1186.*

Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules : mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984** ; 81 : 6851-6855.

Mougin-Degraef M. Etude de faisabilité du radiomarquage et du préciblage de liposomes pour la radioimmunothérapie. *Thèse de Doctorat* **2005**.

Mougin-Degraef M, Jestin E, Bruel D, Remaud-Le Saëc P, Morandeau L, Faivre-Chauvet A, Barbet J. High-activity radio-iodine labeling of conventional and stealth liposomes. *J. Liposomes Res.* **2006** ; 16 : 1-12.

Mulford DA, Scheinberg DA, Juscic JC. The promise of targeted α -particle therapy. *J. Nucl. Med.* **2005** ; 46 : 1005-1045.

Nisonoff A, Rivers MM. Recombination of a mixture of univalent antibody fragments of different specificity. *Arch. Biochem. Biophys.* **1961**; 93:460-462.

Orchard K, Cooper M. Targeting the bone marrow : applications in stem cells transplantation. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2004** ; 48 : 267-278.

Paganelli G, Grana C, Chinol M, Cremonesi M, de Cicco C, De Braud F, Robertson C, Zurrida S, Casadio C, Zoboli S, Siccardi AG, Veronesi U. Antibody-guided three-step therapy for high grade glioma with yttrium-90 biotin. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **1999** ; 26 : 348-357.

Paganelli G, Chinol M. Radioimmunotherapy : is avidin-biotin pretargeting the preferred choice among pretargeting methods? *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003** ; 30 : 777-780.

Paik CH, Quadri SM, Reba RC. Interposition of different chemical linkages between antibody and ^{111}In -DTPA to accelerate clearance from non-target organs and blood. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B.* **1989** ; 16 : 475-481.

Passirani C, Barratt G, Devissaguet JP, Labarre D. Interactions of nanoparticules bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methylmethacrylate) with the complement system. *Life Science* **1998** ; 62 : 775-785.

Passirani C, Benoît JP. Complement activation by injectable colloidal drug carriers. *Inc : Biomaterials for delivery and targeting of proteins and nucleic acids. Boca Raton : CRC Press, Inc.; 2005 ; 187-230.*

Peltier S, Oger JM, Lagarce F, Couet W, Benoît JP. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharm. Res. 2006 ; 23 : 1243-1249.*

Phillips WT. Delivery of gamma-imaging agents by liposomes. *Adv. Drug Delivery Rev. 1999 ; 37 : 13-32.*

Pluckthun A. Escherichia Coli producing recombinant antibodies. *Bioprocess Technol. 1994 ; 19 : 233-252.*

Pluckthun A, Pack P. New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. *Immunotechnology 1997 ; 3 : 83-105.*

Pressman D, Keighley G. The zone of activity of antibodies as determined by the use of radioactive tracers : The zone of activity of nephritoxic antikidney serum. *J. Immunol. 1948 ; 59 : 141-146*

Proffitt RT, William LE, Presant CA. Tumor-imaging potential of liposomes loaded with In-111-NTA : biodistribution in mice. *J. Nucl. Med. 1983 ; 24 : 45-51.*

Puisieux F, Barratt G, Couarraze G, Couvreur P, Devissaguet JP, Dubernet C, Fattal E, Fessi H, Vauthier C, Benita S. Polymeric micro and nanoparticles as drug carriers. *In : Dimitriu S, editor. Polymeric biomaterials. New York : Marcel Dekker, Inc.; 1994 ; 749-794.*

Qu Z, Griffiths GL, Wegener WA, Chang CH, Govindan SV, Horak ID, Hansen HJ, Goldenberg DM. Development of humanized antibodies as cancer therapeutics. *Methods 2005 ; 36 :84-95.*

Ragnarsson U, Grehn L. Novel Gabriel reagents. *Acc. Chem. Res. 1991 ; 24 : 285-289.*

Reardan DT, Meares CF, Goodwin DA, McTigue M, David GS, Stone MR, Leung JP, Bartholomew RM, Frincke JM. Antibodies against metal chelates. *Nature* **1985** ; 316 : 265-268.

Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* **1988** ; 332 : 323-327.

Sastry KSR. Biological effects of the Auger emitter ^{125}I : A review. Report n°1 of AAPM nuclear medicine task group n°6. *Med. Phys.* **1992** ; 19 : 1362-1370.

Schubiger PA, Alberto R, Smith A. Vehicles, chelators, and radionuclides : choosing the “building blocks” of an effective therapeutic radioimmunoconjugate. *Bioconjugate Chem.* **1996** ; 7 : 165-179.

Segal DM, Weiner GJ, Weiner LM. Introduction : bispecific antibodies. *J. Immunol. Methods* **2001** ; 248 : 1-6.

Sharkey RM, Goldenberg DM. Perspectives on cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies. *J. Nucl. Med.* **2005** ; 46 : 115S-127S.

Sharkey RM, Karacay H, Cardillo TM, Chang, McBride WJ, Rossi EA, Horak ID, Goldenberg DM. Improving the delivery of radionuclides for imaging and therapy of cancer using pretargeting methods. *Clin. Cancer Res.* **2005** ; 11 : 7109s-7121s.

Sharkey RM, Goldenberg DM. Targeted therapy of cancer : new prospects for antibodies and immunoconjugates. *CA Cancer J. Clin.* **2006** ; 56 : 226-243.

Songsivilai S, Lachmann PJ. Bispecific antibody : a tool for diagnosis and treatment of disease. *Clin. Exp. Immunol.* **1990** ; 79 : 315-321.

Sou K, Endo T, Takeoka S, Tsuchida E. Poly(ethylene glycol)-modification of the phospholipid vesicles by using the spontaneous incorporation of poly(ethylene glycol)-lipid into the vesicles. *Bioconjugate Chem.* **2000** ; 11 : 372-379.

Stolnik S, Illum L, Davis S. Long-circulating microparticulate drug carriers. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1995** ; 16 : 195-214.

Storm G, Belliot SO, Daemen T, Lasic DD. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1995** ; 17 : 31-48.

Suresh MR, Cuello AC, Milstein C. Advantages of bispecific hybridomas in one-step immunocytochemistry and immunoassays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986** ; 83 : 7989-7993.

Szebeni J, Muggia FM, Alving CR. Complement activation by Cremophor EL[®] as a possible contributor to hypersensitivity to paclitaxel : an in vitro study. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998** ; 90 : 300-306.

Thédrez P, Saccavini JC, Nolibé D, Simoen JP, Guerreau D, Gestin JF, Kremer M, Chatal JF. Biodistribution of indium-111-labeled OC 125 monoclonal antibody after intraperitoneal injection in nude mice intraperitoneally grafted with ovarian carcinoma. *Cancer Res.* **1989** ; 49 : 3081-3086.

Torchilin VP, Papisov MI. Why do polyethylene glycol-coated liposomes circulate so long? *J. Liposome Res.* **1994** ; 4 : 725-739.

Torchilin VP, Trubetskoy VS. Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating? *Adv. Drug Delivery Rev.* **1995** ; 16 : 141-155.

Uster PS, Allen TM, Daniel BE, Mendez CJ, Newman MS, Zhu GZ. Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged in vivo circulation time. *FEBS letters* **1996** ; 386 : 243-246.

Volkert WA, Hoffman TJ. Therapeutic radiopharmaceuticals. *Chem. Rev.* **1999** ; 99 : 2269-2292.

Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Simard P, Leroux JC, Benoît JP. Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. *J. Biomed. Mater. Res. A.* **2006a** ; 78 : 620-628.

Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Benoît JP. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* **2006b** ; 27 : 4356-4373.

Vuillez JP, Kraeber-Bodéré F, Moro D, Bardiès M, Douillard JY, Gautherot E, Rouvier E, Barbet J, Garban P, Moreau P, Chatal JF. Radioimmunotherapy of small-cell lung carcinoma with the two-step method using a bispecific anti-CEA/anti-DTPA antibody and iodine-131-di-DTPA hapten : results of a phase I/II trial. *Clin. Cancer Res.* **1999** ; 5 : 3259-3267.

Wagner HN, Wiseman GA, Marcus CS, Nabi HA, Nagle CE, Fink-Bennett DM, Lamonica DM, Conti PS. Administration guidelines for radioimmunotherapy of non-hodgkin's lymphoma with ⁹⁰Y-labeled anti-CD20 monoclonal antibody. *J. Nucl. Med.* **2002** ; 43 : 267-272.

Wheldon TE. Radionuclide therapy of cancer : particle range and therapeutic effectiveness. *Nucl. Med. Commun.* **1993** ; 14 : 408-410.

Wilbur DS. Potential use of alpha emitting radionuclides in the treatment of cancer. *Antib. Immunoconj. Radiopharm.* **1990** ; 4 : 85-97.

Witzig TE, Gordon LI, Cabanillas F, Czuczman MS, Emmanouilides C, Joyce R, Pohlman BL, Bartlett NL, Wiseman GA, Padre N, Grillo-Lopez AJ, Multani P, White CA. Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncology* **2002** ; 20 : 2453-2463.

Wong EH, Weisman GR, Hill DC, Reed DP, Rogers ME, Condon JP, et al. Synthesis and characterization of cross-bridged cyclams and pendant-armed derivatives and structural studies of their copper (II) complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2000** ; 122 : 10561-10572.

Yoshida Y, Sakakura Y, Aso N, Okada S, Tanabe Y. Practical and efficient methods for sulfonylation of alcohols using Ts(Ms)Cl / NEt₃ and catalytic Me₃N.HCl as combined base : promising alternative to traditional pyridine. *Tetrahedron* **1999** ; 55 : 2183-2192.

Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Wood JF, Hubert SL, Schlom J. Microautoradiographic analysis of the normal organ distribution of radioiodinated

single-chain Fv and other immunoglobulin forms. *Cancer Res.* **1993** ; 53 : 3776-3783.

Zalipsky S. Synthesis of an end-group functionalized polyethylene glycol-lipid conjugate for preparation of polymer-grafted liposomes. *Bioconjugate Chem.* **1993** ; 4 : 296-299.

Zalipsky S, Brandeis E, Newman MS, Woodle MC. Long-circulating, cationic liposomes containing amino-PEG-phosphatidylethanolamine. *FEBS Lett.* **1994** ; 353 : 71-74.

Zalipsky S. Functionalized polyethylene glycol-lipid conjugates. *in: D. Lasic and F. Martin (Eds). Stealth Liposomes. CRC Press, Boca Raton, FL, 1995a*; 93-102.

Zalipsky S. Functionalized poly(ethylene glycol) for preparation of biologically relevant conjugates. *Bioconjugate Chem.* **1995b** ; 6 : 150-165.

Zalipsky S, Hansen CB, Lopes de Menezes DE, Allen TM. Long-circulating, polyethylene glycol-grafted immunoliposomes. *J. Controlled Release* **1996** ; 39 : 153-161.

Zalutsky MR, Garg PK, Friedman HS, Bigner DD. Labeling monoclonal antibodies and F(ab')₂ fragments with the alpha particle emitting nuclide astatine-211: preservation of immunoreactivity with in vivo localizing capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1989** ; 86 : 7149-7153.

Zalutsky MR, Pozzi OR. Radioimmunotherapy with α -particle emitting radionuclides. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2004** ; 48 : 289-296.

Zalutsky MR. Current status of solid tumors : brain tumor therapy. *J. Nucl. Med.* **2005** ; 46 : 1515-1565.

Zevalin (ibritumomab tiuxetan) [package insert]. Seattle, WA : Corixa Corporation and Philadelphia, PA : GlaxoSmithKline ; **2003**.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I GENERALITES

Les **produits chimiques** utilisés lors des synthèses sont commercialisés chez Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne) et sont utilisés sans purification.

Les **spectres RMN** ont été enregistrés sur un appareil à transformée de Fourier BRUKER AC (250,133 MHz pour la RMN¹H et 62,896 MHz pour la RMN¹³C) et également sur un appareil BRUKER (400,131 MHz pour la RMN¹H et 100,62 MHz pour la RMN¹³C). Les valeurs des déplacements chimiques sont exprimées en partie par million (ppm) et les constantes de couplages en Hertz (Hz). Les solvants utilisés pour les spectres ¹H et ¹³C sont le chloroforme deutérié (CDCl₃, δ : 7,27 ppm (¹H) et 77 ppm (¹³C)), l'eau deutériée (D₂O, δ : 4,79 ppm), le diméthylsulfoxyde deutérié (DMSO-d₆, 2,50 ppm) et le méthanol (CD₃OD, 3,31 ppm). Dans la description des spectres, les multiplicités des signaux sont indiqués à l'aide des abréviations suivantes : s, d, dd, t, td, q, quint, m signifiant respectivement singulet, doublet, doublet de doublet, triplet, triplet dédoublé, quadruplet, quintuplet, multiplet. L'attribution des carbones a été effectuée sur le BRUKER (400 MHz RMN¹H/ 100 MHz RMN¹³C) en utilisant des séquences impulsionsnelles spécifiques (DEPT, COSY, HSQC).

Les **spectres de masse (SM)** ont été réalisés pour les petites molécules sur un spectromètre de masse à trappe d'ions BRUKER en mode électrospray par solubilisation des composés chimiques dans CH₃CN, MeOH ou H₂O. En ce qui concerne les poly(éthylène glycol), les spectres de masse ont été réalisés au Laboratoire de Spectroscopie de masse de l'Université des Sciences d'Angers sur un MALDI-TOF Biflex III BRUKER Daltonics après solubilisation des composés dans un mélange H₂O/CH₃CN 1/1 + 0,1% TFA et mélangé dans une matrice constituée d'acide pinnacolique.

La **spectroscopie infrarouge** a été réalisée directement sur les échantillons à l'aide d'un spectromètre NICOLET™ FT-IR munis d'un diamant synthétique ATR permettant des mesures entre 4000 et 675 cm⁻¹. Les valeurs sont exprimées en cm⁻¹.

La **chromatographie** des produits chimiques a été réalisée selon différentes façons :

- ✖ Les **chromatographies sur couche mince (CCM)** sont réalisées sur des plaques de silice Kieselgel 60 F₂₅₄ sur support plastique et révélées soit par lampe UV (λ=254 nm), soit par l'iode, soit par révélateur Dragendorff (pour les alcaloïdes), soit par ninhydrine (pour les amines primaires).
- ✖ Les **chromatographies sur colonne** sont faites à l'aide de silice Kieselgel 60, 230-400 mesh (Carlo Erba), et poussées à l'air comprimé (chromatographie flash).

Les **radiomarquages** ont été réalisés à l'indium-111 et à l'iode-125. L'indium-111 (¹¹¹In, t_{1/2} = 2,8 j) a été fourni par le laboratoire Mallinckrodt sous forme de chlorure d'indium en solution chlorhydrique 0,05N. L'activité spécifique est de 370 MBq/□g soit 41 MBq/nmol lors de la calibration et l'activité volumique est de 370 MBq/ml. L'iode-125 a été fourni par le Laboratoire Perkin-Elmer. Il est utilisé sous forme d'iodure de sodium en solution NaOH 0,05N avec une activité spécifique de 643 GBq/mg (soit 95,2 GBq/□mol) et une activité volumique de 3,7 GBq/ml. Les produits chimiques utilisés pour les radiomarquages sont disponibles commercialement et

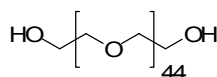
sont utilisés sans purification. Le sulfo-Bolton-Hunter (SBH) (*N*-sulfo-succinimidyl-3-(4-hydroxyphényl)-propionate) et le Bolton-Hunter (BH) (*N*-succinimidyl-3-(4-hydroxyphényl)-propionate) ont été fournis par Pierce Chemical Co. (Rockford, USA). La chloramine T, la *N*-chlorosuccinimide et le métabisulfite de sodium ainsi que l'iodure de sodium et le 4-nitrophénol sont des produits commercialisés par Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne).

II. MODES OPERATOIRES

II.1. Synthèse des intermédiaires α -amino- ω -O-(carboxy-*N*-distéaroyl phosphatidyléthanolamine)-poly(éthylène glycols) ou DSPE-PEG_n-NH₂.

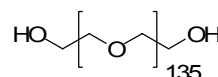
Les synthèses des “constructs” ont été réalisées en parallèle à partir des poly(éthylène glycol) suivants :

PEG₂₀₀₀ :



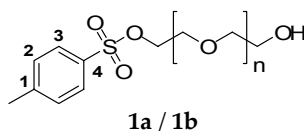
[HO-PEG₂₀₀₀-OH + Na]⁺ : 2021,4

PEG₆₀₀₀ :



[HO-PEG₆₀₀₀-OH + Na]⁺ : 5503,6

➤ α -*p*-toluènesulfonate- ω -hydroxy-poly(éthylène glycol) (TsO-PEG_n-OH).



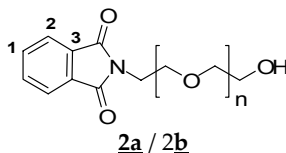
1 équivalent de HO-PEG_n-OH (25 g /20 g) est solubilisé dans 50 mL de CH₃CN anhydre sous courant d'azote. 3 équivalents de NEt₃ (5,23 mL /1,52 mL)) et 0,5 équivalent de NMe₃.HCl (0,6 g /0,17 g) sont ajoutés dans le ballon. Le milieu réactionnel est refroidi à 0°C. 1,2 équivalents de chlorure de tosyl (2,86 g /0,82 g) préalablement solubilisés dans 100 mL de CH₃CN sont placés dans une ampoule de coulée. La solution est ensuite additionnée à 0°C au goutte à goutte au mélange réactionnel. La température du milieu est progressivement remontée à température ambiante. La réaction est agitée pendant 2h à température ambiante.

Le solvant est ensuite évaporé à sec. Le solide est solubilisé dans 5 mL de CHCl₃. La solution est lavée avec H₂O puis avec une solution de H₂O saumurée. La phase organique est séchée avec Na₂SO₄, filtrée puis évaporée.

Le produit monotosylé est purifié sur colonne chromatographique (éluant : CHCl₃/ MeOH : 9/1).

	PEG ₂₀₀₀ 1a	PEG ₆₀₀₀ 1b
	Réactif de départ : 25g (12,5 mmoles) Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 Rf = 0,4 Masse obtenue : 14,8 g Rdt : 55%	Réactif de départ : 20g (3,6 mmoles) Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 Rf = 0,4 Masse obtenue : 8,43 g Rdt : 41%
SM	[M + Na] ⁺ : 2175,5	[M + Na] ⁺ : 5657,7
RMN¹H (CDCl ₃)	2,44 (s, 3H, CH ₃); 2,68 (m, 1H, OH); 3,30-4,00 (m, 178H, CH ₂); 4,15 (t, 2H, TsO-CH ₂ , ³ J=4,9Hz); 7,34 (d, 2H, H ₂ , ³ J=7,9 Hz); 7,78 (d, 2H, H ₃ , ³ J=8,3 Hz).	2,40 (s, 3H, CH ₃); 2,70 (s, 1H, OH); 3,00-4,20 (m, 544H, CH ₂); 7,35 (d, 2H, H ₂ , ³ J=7,3 Hz); 7,79 (d, 2H, H ₃ , ³ J=8,25 Hz).
RMN¹³C (CDCl ₃)	21,3 (CH ₃); 61,6 (TsO-CH ₂); 68,6 (CH ₂ -OH); 69,2 (TsO-CH ₂ -CH ₂); 70,2-70,7 ([CH ₂ -O-CH ₂] ₄₃); 72,5 (CH ₂ -CH ₂ -OH); 127,6 (C ₃); 129,5 (C ₂); 132,7 (C ₄); 144,4 (C ₁).	21,6 (CH ₃); 61,7 (TsO-CH ₂); 68,67 (CH ₂ -OH); 69,2 (TsO-CH ₂ -CH ₂); 70,2-70,8 ([CH ₂ -O-CH ₂] ₁₃₄); 72,2 (CH ₂ -CH ₂ -OH); 127,9 (C ₃); 129,8 (C ₂); 138,2 (C ₄); 144,7 (C ₁).
IR	2883, 1466, 1359, 1342, 1342, 1279, 1176, 1147, 1107.	

➤ **α-phtalimido-ω-hydroxy-poly(éthylène glycol) (Pht-PEG_n-OH).**

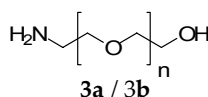


Dans un ballon, 1 équivalent de TsO-PEG_n-OH (**1a/1b**) préalablement séché (4,4 g / 13,3 g) est solubilisé dans du CH₃CN anhydre (20 mL/ 50 mL) sous flux d'azote et agité à température ambiante. Dans un erlen, 3 équivalents de phtalimide de potassium (1,12 g / 1,35 g) sont mis en suspension dans du CH₃CN anhydre (10 mL/ 20 mL) et agités à température ambiante. 6 équivalents de 15-crown-5 (2,4 mL / 2,9 mL) sont ensuite ajoutés à la suspension. On observe ainsi une solubilisation totale de la suspension. Le mélange est ajouté au milieu réactionnel dans le ballon. La réaction est agitée pendant 1h à température ambiante.

Le solvant est ensuite évaporé à sec. Le solide obtenu est lavé avec H₂O et extrait avec CHCl₃. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée. Le mélange est solubilisé dans quelques ml de CHCl₃. Le mélange réactionnel est refroidi à 0°C. Une addition de Et₂O anhydre fait précipiter le produit et permet ainsi après filtration de le séparer du 15-crown-5 et d'obtenir le produit pur après répétition de l'opération de précipitation deux à trois fois.

	PEG ₂₀₀₀ 2a	PEG ₆₀₀₀ 2b
	Réactif de départ : 4,4 g (2 mmoles) Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 Rf = 0,5 Masse obtenue : 4,2 g Rdt : 95%	Réactif de départ : 13,3 g (2,4 mmoles) Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 Rf = 0,5 Masse obtenue : 12,9g Rdt : 98%
SM	[M + Na] ⁺ : 2166,4	[M + Na] ⁺ : 5631,5
RMN¹H (CDCl ₃)	2,77 (s, 1H, OH) ; 3,30-3,70 (m, 178H, CH ₂) ; 3,89 (t, 2H, Pht-CH ₂ , ³ J=5,7 Hz) ; 7,69-7,85 (m, 4H, Ar).	2,70 (s, 1H, OH) ; 3,30-3,70 (m, 542H, CH ₂) ; 3,81 (t, 2H, Pht-CH ₂ , ³ J=5,5Hz) ; 7,62-7,77 (m, 4H, Ar).
RMN¹³C (CDCl ₃)	37,0 (Pht-CH ₂) ; 57,7 (HO-CH ₂) ; 62,7 (Pht-CH ₂ -CH ₂ -O) ; 67,6-70,2 ([CH ₂ -O-CH ₂] ₄₃) ; 72,3 (CH ₂ -CH ₂ -OH) ; 122,9 (2×C ₂) ; 131,8 (2×C ₃) ; 133,7 (2×C ₁) ; 167,9 (2×C=O).	38,5 (Pht-CH ₂) ; 59,4 (HO-CH ₂) ; 62,7 (Pht-CH ₂ -CH ₂ -O) ; 67,0-70,6 ([CH ₂ -O-CH ₂] ₁₃₅) ; 72,4 (CH ₂ -CH ₂ -OH) ; 122,9 (2×C ₂) ; 132,9 (2×C ₃) ; 134,5 (2×C ₁) ; 167,5 (2×C=O).
IR	2883, 1768, 1714, 1467, 1342, 1146, 1109, 1060.	

➤ **α-amino-ω-hydroxy-poly(éthylène glycol) (H₂N-PEG_n-OH)**



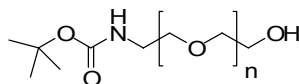
Pht-PEG_n-OH (**2a/2b**) (0,23 g / 8,8 g) est solubilisé dans EtOH (10 mL / 50 mL) et chauffé à 50°C. 10 équivalents d'hydrazine monohydrate (48,5 μ L / 0,75 mL) sont ensuite additionnés. La réaction est chauffée à reflux pendant 6h. Le mélange réactionnel est ensuite filtré afin d'éliminer le précipité blanc formé par l'hydrazine puis rincé avec EtOH.

Le solvant est évaporé à sec. Quelques millilitres de CHCl₃ sont ajoutés dans le ballon. Le mélange est refroidi à 0°C puis une opération de précipitation dans l'éther est effectuée. Le produit est ainsi obtenu avec un rendement supérieur à 95%.

	PEG ₂₀₀₀ 3a	PEG ₆₀₀₀ 3b
	Réactif de départ : 0,23 g (0,1 mmoles) Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 Rf = 0,1 Masse obtenue : 0,2 g Rdt : 97,5%	Réactif de départ : 8,8 g (1,56 mmoles) Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 Rf = 0,1 Masse obtenue : 8,2 g Rdt : 95%
SM	[M + Na] ⁺ : 2020,5	[M + Na] ⁺ : 5501,4
RMN¹H (CDCl ₃)	2,38 (s, 2H, NH ₂) ; 2,82 (t, 2H, CH ₂ -NH ₂ , ³ J = 4,87 Hz) ; 3,30-3,90 (m, 178H).	2,83 (s, 2H, NH ₂) ; 3,30-3,90 (m, 544H).

RMN¹³C (CDCl ₃)	41,0 (CH ₂ -NH ₂); 61,3 (CH ₂ -OH); 70,5-73,0 ((CH ₂ -O-CH ₂) ₄₃ + CH ₂ -CH ₂ -OH + CH ₂ -CH ₂ -NH ₂).	41,0 (CH ₂ -NH ₂); 61,5 (CH ₂ -OH); 70,0-73,0 ((CH ₂ -O-CH ₂) ₁₃₅ + CH ₂ -CH ₂ -OH + CH ₂ -CH ₂ -NH ₂).
IR	2883, 1466, 1359, 1341, 1279, 1147, 1106, 1060.	

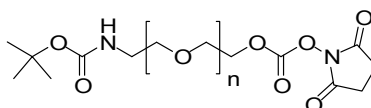
VOIE 1

➤ α -N-(Boc)-amino- ω -hydroxy-poly(éthylène glycol) (Boc-HN-PEG_n-OH).**4a / 4b**

1 équivalent de H₂N-PEG_n-OH (**3a/3b**) (0,48 g / 1,9 g) est solubilisé dans CHCl₃ (20 mL / 50 mL). 3 équivalents de Boc₂O (0,16 g / 0,23 g) sont ensuite ajoutés à température ambiante dans le ballon. La réaction est agitée à température ambiante pendant 12h.

Le milieu réactionnel est concentré au rotavapor. Le ballon est ensuite refroidi à 0°C. On procède ensuite à une précipitation à l'Et₂O. Le précipité blanc est filtré et récupéré. Le produit est obtenu après purification sur colonne chromatographique.

	PEG₂₀₀₀ 4a	PEG₆₀₀₀ 4b
	Réactif de départ : 0,48 g (0,24 mmoles) Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 Rf = 0,4 Masse obtenue : 0,43 g Rdt : 86%	Réactif de départ : 1,9 g (0,35 mmoles) Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 Rf = 0,4 Masse obtenue : 1,39 g Rdt : 72%
SM	[M + Na] ⁺ : 2120,5	[M + Na] ⁺ : 5601,4
RMN¹H (CDCl ₃)	1,41 (s, 9H, Boc); 2,90 (s, 1H, OH); 3,27 (m, 2H, CH ₂ -NH); 3,40-3,80 (m, 178H) ; 5,10 (s, 1H, NH).	1,52 (s, 9H, Boc); 2,01 (s, 1H, OH); 3,30 3,40-3,80 (m, 544H) ; 5,00 (s, 1H, NH).
RMN¹³C (CDCl ₃)	28,4 (CH ₃); 40,3 (CH ₂ -N); 61,6 (CH ₂ -OH); 70,0-70,5 (N-CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ / N-CH ₂ -CH ₂ / (CH ₂ -O-CH ₂) ₄₃); 72,5 (CH ₂ -CH ₂ -OH); 79,0 (C(CH ₃) ₃); 146,6 (C=O).	27,3 (CH ₃); 40,3 (CH ₂ -N); 61,6 (CH ₂ -OH); 70,1-70,5 (N-CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ / N-CH ₂ -CH ₂ / (CH ₂ -O-CH ₂) ₁₃₄); 72,3 (CH ₂ -CH ₂ -OH); 80,0 (C(CH ₃) ₃); 146,7 (C=O).
IR	2868, 1808, 1748, 1711, 1456, 1369, 1249, 1116.	

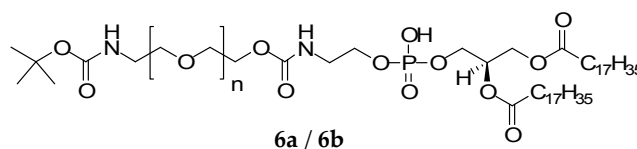
➤ α -N-(Boc)-amino- ω -O-carboxy-N-hydroxysuccinimidyl-poly(éthylène glycol) (Boc-HN-PEG_n-OSC)**5a / 5b**

1 équivalent de Boc-HN-PEG_n-OH (**4a/4b**) (0,49 g / 1,92 g) préalablement séché est solubilisé dans CH₃CN anhydre (20 mL / 50 mL) sous courant de N₂. Une solution de CH₃CN anhydre (10 mL / 20 mL) contenant 2 équivalents de *N,N*-disuccinimidylcarbonate (0,17 g / 0,26 g) et 5 équivalents de pyridine anhydre (93 μ L / 137 μ L) est additionnée au milieu réactionnel au goutte à goutte. La réaction est agitée à température ambiante pendant 24h sous N₂.

Le mélange réactionnel est évaporé à sec. Quelques millilitres de CHCl₃ sont ajoutés dans le ballon. Le milieu est refroidi à 0°C. Le produit est précipité dans du Et₂O, puis filtré. Le produit est ainsi obtenu après purification sur colonne chromatographique.

	PEG ₂₀₀₀ 5a	PEG ₆₀₀₀ 5b
	Réactif de départ : 0,49 g (0,23 mmoles) Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 Rf = 0,5 Masse obtenue : 0,4 g Rdt : 76%	Réactif de départ : 1,92 g (0,34 mmoles) Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 Rf = 0,5 Masse obtenue : 1,6 g Rdt : 81%
SM	[M + Na] ⁺ : 2261,5	[M + Na] ⁺ : 5742,5
RMN¹H (CDCl ₃)	1,40 (s, 9H, Boc); 2,73 (s, 4H, CH ₂ -CH ₂); 3,13 (m, 2H, CH ₂ -NH); 3,60-4,30 (m, 178H); 5,11 (s, 1H, NH).	1,41 (s, 9H, Boc); 2,78 (s, 4H, CH ₂ -CH ₂); 3,10-4,40 (m, 546H); 5,30 (s, 1H, NH).
RMN¹³C (CDCl ₃)	24,5 (2×CH ₂); 28,5 (Boc); 40,9 (CH ₂ -N); 67,8-70,5 (CH ₂ -OCO/ (CH ₂ -O-CH ₂) ₄₃ / N-CH ₂ -CH ₂); 78,9 (CBoc); 150,9 (O-C=O); 155,2 (C=O (Boc)); 169,0 (2×C=O).	24,0 (2×CH ₂); 27,3 (Boc); 40,3 (CH ₂ -N); 68,5-70 (CH ₂ -OCO/ (CH ₂ -O-CH ₂) ₁₃₅ / N-CH ₂ -CH ₂); 79,5 (CBoc); 152,4 (O-C=O); 155,5 (C=O (Boc)); 170,1 (2×C=O).
IR	2869, 1808, 1748, 1711, 1521, 1458, 1249, 1101.	

➤ **α -N-(Boc)-amino- ω -O-(carboxy-N-distéaroylphosphatidyléthanolamine)-poly(éthylèneglycol (Boc-HN-PEG_n-DSPE)**



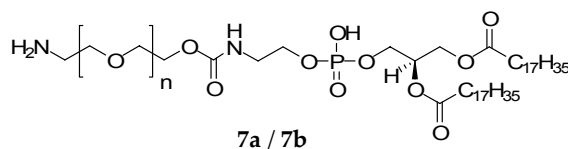
1 équivalent de Boc-HN-PEG_n-OSC (**5a/5b**) (73 mg / 0,76 g) est solubilisé dans CHCl₃ anhydre (5mL). 3 équivalents de NEt₃ (13,3 μ L / 54,3 μ L) sont ajoutés dans le ballon à température ambiante. Le milieu réactionnel est chauffé à 50°C. 1 équivalent de distéaroylphosphatidyléthanolamine (DSPE-NH₂) (23,9 mg / 97 mg)

solubilisé dans 10 ml de CHCl_3 anhydre à chaud est additionné à l'aide d'une ampoule de coulée lentement dans le ballon à 50°C . La réaction est agitée à chaud pendant 1h.

Le solvant est évaporé à sec. Le produit est ainsi obtenu après purification sur colonne chromatographique.

	PEG ₂₀₀₀ 6a	PEG ₆₀₀₀ 6b
	Réactif de départ : 73 mg (0,032 mmoles) Eluant : CHCl_3 / MeOH : 9/1 Rf = 0,2 Masse obtenue : 80 mg Rdt : 85%	Réactif de départ : 0,76 g (0,13 mmoles) Eluant : CHCl_3 / MeOH : 9/1 Rf = 0,2 Masse obtenue : 0,3 g Rdt : 36%
SM	$[\text{M} + \text{Na}]^+ : 2894,5$	$[\text{M} + \text{Na}]^+ : 6375,4$
RMN¹H (CDCl_3)	0,86 (m, 6H, $2\times\text{CH}_3$); 1,23 (m, 58H, CH_2 (DSPE)); 1,40-1,70 (m, 13H, $3\times\text{CH}_3$ (Boc) + $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C=O}$); 2,25 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-C=O}$); 3,09 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$); 3,60-4,30 (m, 182H); 4,40 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-P=O}$); 4,45 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-O-C=O}$ (DSPE)); 5,15 (s, 1H, NH); 7,80 (s, 1H, NH).	0,84 (m, 6H, $2\times\text{CH}_3$); 1,13-1,6 (m, 71H, CH_2 (DSPE)/ CH_3 (Boc)/ $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C=O}$); 2,23 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-C=O}$); 3,30 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$); 3,30-4,00 (m, 548H); 4,20 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-P=O}$); 4,45 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-O-C=O}$ (DSPE)); 5,15 (s, 1H, NH); 7,70 (s, 1H, NH).
RMN¹³C (CDCl_3)	14,1 ($2\times\text{CH}_3$); 22,6 ($2\times\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 24,8 ($2\times\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$ (DSPE)); 28,5-29,7 ($3\times\text{CH}_3$ / CH_2 (DSPE)); 33,9 ($2\times\text{CH}_2\text{-CO}$); 40,5-40,9 ($\text{CH}_2\text{-NH}$ (DSPE) + $\text{CH}_2\text{-NH}$ (PEG)); 62,2 ($\text{CH}_2\text{-O-C=O}$ (PEG)); 63,8 ($\text{CH}_2\text{-O-C=O}$ (DSPE)); 64,3 ($\text{CH-CH}_2\text{-O-P=O}$); 64,6 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P=O}$); 68-70,5 ($(\text{CH}_2\text{-O-CH}_2)_{43}$ / CH (DSPE)/ $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$); 77,2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 156,0 ($2\times\text{NH-C=O}$); 173,1 ($2\times\text{O-C=O}$).	14,1 ($2\times\text{CH}_3$); 22,8 ($2\times\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 25,1 ($2\times\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$ (DSPE)); 29,0-30,0 ($3\times\text{CH}_3$ / CH_2 (DSPE)); 34,0 ($2\times\text{CH}_2\text{-CO}$); 40,6/40,8 ($\text{CH}_2\text{-NH}$ (DSPE) + $\text{CH}_2\text{-NH}$ (PEG)); 62,1 ($\text{CH}_2\text{-O-CO}$ (PEG)); 64,2 ($\text{CH}_2\text{-O-C=O}$ (DSPE)); 64,4 ($\text{CH-CH}_2\text{-O-P=O}$); 64,5 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P=O}$); 67,0-70,7 ($(\text{CH}_2\text{-O-CH}_2)_{135}$ / CH (DSPE)/ $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$); 79,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 156,6 ($2\times\text{NH-C=O}$); 173,0 ($2\times\text{O-C=O}$).
IR	2916, 2850, 1808, 1740, 1713, 1467, 1247, 1101.	

➤ **α -amino- ω -O-(carboxy-*N*-distéaroylphosphatidyléthanolamine)-poly (éthylène glycol) ($\text{H}_2\text{N-PEG}_n\text{-DSPE}$)**



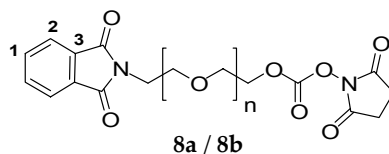
1 équivalent de Boc-HN-PEG_n-DSPE (**6a/6b**) (80 mg / 0,3 g) est placé dans un ballon et mis en suspension dans du dioxane (10 mL / 30 mL). Une solution de HCl 4M est ensuite additionnée. La réaction est agitée à température ambiante.

Le solvant est évaporé à sec. Une précipitation dans Et₂O est appliquée pour obtenir le produit intermédiaire pur.

	PEG ₂₀₀₀ 7a	PEG ₆₀₀₀ 7b
	Réactif de départ : 80 mg (0,028 mmoles) Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 R_f = 0 Masse obtenue : 77 mg Rdt : 100%	Réactif de départ : 0,3 g (0,47 mmoles) Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 R_f = 0 Masse obtenue : 0,29 g Rdt : 98%
SM	[M + Na] ⁺ : 2794,4	[M + Na] ⁺ : 6275,4
RMN¹H (CDCl₃)	0,85 (m, 6H, 2×CH ₃); 1,25 (m, 62H, CH ₂ (DSPE)); 2,00 (s, 2H, NH ₂); 2,26 (m, 4H, CH ₂ -CO); 3,33 (m, 2H, CH ₂ -NH); 3,60-4,30 (m, 182H); 4,40 (m, 2H, CH ₂ -P=O); 4,45 (m, 2H, CH ₂ -O-C=O (DSPE)); 5,20 (s, 1H, NH).	0,84 (m, 6H, 2×CH ₃); 1,23 (m, 62H, CH ₂ (DSPE)); 1,55 (s, 2H, NH ₂); 2,26 (m, 4H, CH ₂ -CO); 3,30-4,30 (m, 550H); 4,20 (m, 2H, CH ₂ -P=O); 4,45 (m, 2H, CH ₂ -O-C=O (DSPE)); 5,24 (s, 1H, NH); 6,50 (s, 1H, NH).
RMN¹³C (CDCl₃)	14,1 (2×CH ₃); 22,8 (2×CH ₂ -CH ₃); 25,3 (2×CH ₂ -CH ₂ -CO (DSPE)); 29,0-30,0 (CH ₂ (DSPE)/ 2×CH ₂ -CO); 40,5 (CH ₂ -NH (DSPE)); 41,8 (CH ₂ -NH (PEG)); 62,1 (CH ₂ -O-C=O (PEG)); 62,9 (CH ₂ -O-C=O (DSPE)); 64,7 (CH-CH ₂ -O-P=O)/NH-CH ₂ -CH ₂ -O-P=O); 68,0-73,0 ((CH ₂ -O-CH ₂) ₄₃ /CH (DSPE)/NH-CH ₂ -CH ₂ -O); 155,6 (NH-CO); 173,1 (2×O-C=O).	14,12 (2×CH ₃); 23,1 (2×CH ₂ -CH ₃); 25,5 (2×CH ₂ -CH ₂ -CO (DSPE)); 29,7 (24×CH ₂ (DSPE)); 33,9 (2×CH ₂ -CO); 40,2 (CH ₂ -NH (DSPE)); 41,0 (CH ₂ -NH (PEG)); 62,0 (CH ₂ -O-C=O (PEG)); 63,8 (CH ₂ -O-C=O (DSPE)); 64,0-70,0 (CH-CH ₂ -O-P=O)/NH-CH ₂ -CH ₂ -O-P=O/(CH ₂ -O-CH ₂) ₁₃₅ /CH (DSPE)); 72,9 (NH-CH ₂ -CH ₂ -O); 156,0 (NH-C=O); 172,9 (2×O-C=O).
IR	2916, 2883, 1741, 1714, 1466, 1343, 1146, 1101, 1061.	

VOIE 2

➤ α-phthalimido-ω-O-carboxy-N-hydroxysuccinimidyl-poly(éthylène glycol) (Pht-PEG_n-OSC)

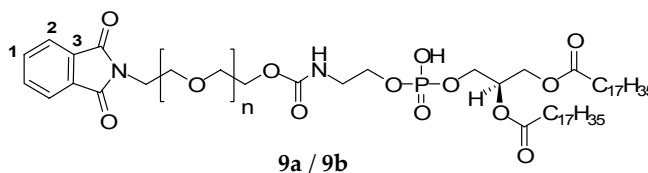


1 équivalent de Pht-PEG_n-OH (**2a/2b**) (1 g / 0,8 g) préalablement séché est solubilisé dans CH₃CN anhydre (20 mL) sous courant de N₂. Une solution de CH₃CN anhydre (10 mL / 5 mL) contenant 2 équivalents de *N,N*-disuccinimidylcarbonate (0,24 g / 87 mg) et 5 équivalents de pyridine anhydre (0,19 mL / 56,6 μL) est additionnée au milieu réactionnel au goutte à goutte. La réaction est agitée à température ambiante pendant 24h sous N₂.

Le mélange réactionnel est évaporé à sec. Quelques millilitres de CHCl_3 sont ajoutés dans le ballon. Le milieu est refroidi à 0°C . On fait précipiter le produit avec Et_2O , puis il est filtré. Le produit est ainsi obtenu après purification sur colonne chromatographique.

	PEG ₂₀₀₀ 8a	PEG ₆₀₀₀ 8b
	Réactif de départ : 1g (0,47 mmoles) Eluant : CHCl_3 / MeOH : 9/1 Rf = 0,6 Masse obtenue : 0,92 g Rdt : 85%	Réactif de départ : 0,8 g (0,14 mmoles) Eluant : CHCl_3 / MeOH : 9/1 Rf = 0,55 Masse obtenue : 0,61 g Rdt : 75%
SM	$[\text{M} + \text{Na}]^+ : 2335,4$	$[\text{M} + \text{Na}]^+ : 5772,5$
RMN¹H (CDCl_3)	2,78 (s, 4H, $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$); 3,30-3,90 (m, 178H, CH_2); 4,40 (t, 2H, $^3\text{J}=4,6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-OSC}$); 7,60-7,79 (m, 4H, Ar).	2,77 (s, 4H, $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$); 3,30-3,90 (m, 542H, CH_2); 4,50 (t, 2H, $^3\text{J}=4,6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-OSC}$); 7,50-7,77 (m, 4H, Ar).
RMN¹³C (CDCl_3)	27,4 ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$); 39,2 (Pht- CH_2); 61,8 ($\text{CH}_2\text{-OSC}$); 67,8 (Pht- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$); 69,1-70,8 ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OSC/}[\text{CH}_2\text{-O-CH}_2]_{43}$); 127,6 ($2\times\text{C}_2$); 132,1 ($2\times\text{C}_1$); 132,3 ($2\times\text{C}_3$); 154,3 (CO); 167,9 ($2\times\text{CO}$ (Pht)); 178,6 ($2\times\text{C=O}$ (SC)).	27,6 ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$); 39,7 (Pht- CH_2); 61,8 ($\text{CH}_2\text{-OSC}$); 68,0-70,5 (Pht- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OSC/}[\text{CH}_2\text{-O-CH}_2]_{134}$); 126,9 ($2\times\text{C}_2$); 132,0 ($2\times\text{C}_1$); 132,5 ($2\times\text{C}_3$); 154,7 (C=O); 168,2 ($2\times\text{C=O}$ (Pht)); 178,0 ($2\times\text{C=O}$ (SC)).
IR	2881, 1813, 1789, 1742, 1713, 1466, 1343, 1279, 1146, 1109, 1061, 755.	

➤ **α -phtalimido- ω -O-(carboxy-N-distéaroylphosphatidyléthanolamine)-poly (éthylène glycol) (Pht-PEG_n-DSPE)**

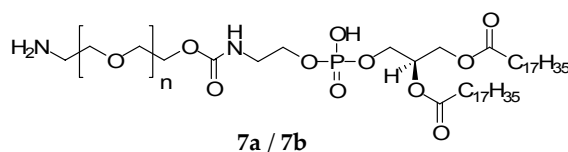


1 équivalent de Pht-PEG_n-OSC (**8a/8b**) (0,87 g / 0,75 g) est solubilisé dans 2 mL de CHCl_3 anhydre. 3 équivalents de NEt_3 (0,15 mL / 54 μL) sont ajoutés dans le ballon à température ambiante. Le milieu réactionnel est chauffé à 50°C . A l'aide d'une ampoule de coulée, 1 équivalent de distéaroylphosphatidyléthanolamine (0,27 g / 97 mg) solubilisé dans 10 mL de CHCl_3 anhydre préalablement chauffé est additionné lentement dans le ballon à 50°C . La réaction est agitée à chaud pendant 1h. Le solvant est évaporé à sec. Le produit est ainsi obtenu après purification sur colonne chromatographique.

	PEG ₂₀₀₀ 9a	PEG ₆₀₀₀ 9b
--	-------------------------------	-------------------------------

	Réactif de départ : 0,87 g (0,37 mmoles) Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 Rf = 0,3 Masse obtenue : 0,95 g Rdt : 87%	Réactif de départ : 0,75 g (0,13 mmoles) Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 Rf = 0,3 Masse obtenue : 0,6 g Rdt : 73%
SM	[M + Na] ⁺ : 2940,5	[M + Na] ⁺ : 6405,6
RMN¹H (CDCl₃)	0,83 (m, 6H, 2×CH ₃); 1,21 (s, 62H, CH ₂ (DSPE)); 2,25 (m, 4H, CH ₂ -C=O); 2,25 (m, 2H, CH ₂ -NH); 3,45-3,80 (m, 182H); 4,20 (m, 2H, CH ₂ -P=O); 4,40 (m, 2H, CH ₂ -O-C=O (DSPE)); 5,20 (s, 1H, NH); 6,80 (s, 1H, NH); 7,60-7,90 (m, 4H, CH (Ar)).	0,85 (m, 6H, 2×CH ₃); 1,29 (s, 62H, CH ₂ (DSPE)); 2,25 (m, 4H, CH ₂ -C=O); 3,33 (m, 2H, CH ₂ -NH); 3,60-4,30 (m, 548H); 4,40 (m, 2H, CH ₂ -P=O); 4,45 (m, 2H, CH ₂ -O-CO (DSPE)); 5,20 (m, 1H, NH); 6,90 (s, 1H, NH); 7,50-8,20 (m, 4H, CH (Ar)).
RMN¹³C (CDCl₃)	14,1 (2×CH ₃); 22,6 (2×CH ₂ -CH ₃); 24,8 (2×CH ₂ -CH ₂ -CO (DSPE)); 29,0-29,7 (CH ₂ (DSPE)); 31,9 (2×CH ₂ -C=O); 34,2 (CH ₂ -Pht); 37,2 (CH ₂ -NH (DSPE)); 62,7 (CH ₂ -O-CO (PEG)); 63,2 (CH ₂ -O-CO (DSPE)); 63,4 (CH-CH ₂ -O-P=O/ NH-CH ₂ -CH ₂ -O-P=O); 67,8 (CH ₂ -CH ₂ -Pht/ CH ₂ -Pht); 69,1-71,0 ((CH ₂ -O-CH ₂) ₄₃ / CH (DSPE)/ NH-CH ₂ -CH ₂ -O); 123,2 (2×C ₂); 132,0 (2×C ₁); 133,9 (2×C ₃); 156,6 (NH-CO); 168,6 (2×CO Pht); 173,0 (2×O-CO).	14,1 (2×CH ₃); 22,6 (2×CH ₂ -CH ₃); 25,1 (2×CH ₂ -CH ₂ -CO (DSPE)); 28,9-29,7 (CH ₂ (DSPE)); 33,9 (2×CH ₂ -CO); 35,1 (CH ₂ -Pht); 39,9 (CH ₂ -NH (DSPE)); 62,5 (CH ₂ -O-CO (PEG)); 63,8 (CH ₂ -O-CO (DSPE)); 64,1 (CH-CH ₂ -O-P=O/ NH-CH ₂ -CH ₂ -O-P=O); 67,5 (CH ₂ -CH ₂ -Pht/ CH ₂ -Pht); 68-72,9 ((CH ₂ -O-CH ₂) ₁₃₅ / CH (DSPE)/ NH-CH ₂ -CH ₂ -O); 122,9 (2×C ₂); 132,1 (2×C ₁); 132,3 (2×C ₃); 156,0 (NH-CO); 167,9 (2×CO Pht); 173,1 (2×O-CO).
IR	2916, 2850, 1740, 1713, 1467, 1247, 1101, 752.	

➤ **α-amino-ω-O-(carboxy-N-distéaroylphosphatidyléthanolamine)-poly (éthylène glycol) (H₂N-PEG_n-DSPE).**



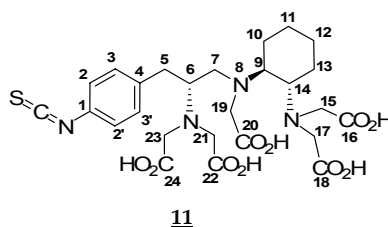
1 équivalent de Pht-PEG_n-DSPE (**9a/9b**) (0,4 g / 0,6 g) est solubilisé dans EtOH (50 mL). 5 équivalents d'hydrazine monohydrate (33 □L / 22,7 □L) sont ajoutés au milieu réactionnel. La réaction est agitée et chauffée à reflux (70°C) pendant 12h. Le mélange réactionnel est refroidi à température ambiante. Le précipité blanc formé par l'hydrazine est filtré et rincé avec EtOH. Le filtrat est évaporé à sec. Le mélange est solubilisé avec quelques millilitres de CHCl₃. Le ballon est refroidi à 0°C. L'ajout de Et₂O permet d'éliminer les impuretés du mélange et ainsi d'obtenir le produit pur.

	PEG₂₀₀₀ 7a	PEG₆₀₀₀ 7b
	Réactif de départ : 0,4 g (0,14 mmoles)	Réactif de départ : 0,6 g (0,094 mmoles)

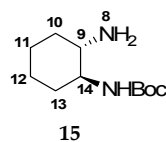
	Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 Rf = 0 Masse obtenue : 0,3 g Rdt : 81%	Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 Rf = 0 Masse obtenue : 0,45 g Rdt : 76%
--	---	--

II.2. Synthèses des agents chélatants

II.2.1. Synthèse du CHXA''DTPA-NCS 11.



➤ *N*-tert-butoxycarbonyl-(1*S*,2*S*)-diaminocyclohexane 15.



3 équivalents de *trans*-(1*S*,2*S*)-cyclohexanediamine 14 (5 g, 43,7 mmol) sont solubilisés dans 40 mL d'AcOEt anhydre. La solution est agitée à 0°C. 1 équivalent de di-*tert*-dibutyl dicarbonate (3,18 g, 14,6 mmol) est solubilisé dans 400 mL d'AcOEt anhydre puis additionné goutte à goutte à l'aide d'une ampoule à brome. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 24h.

Le solvant est ensuite évaporé à sec. Le produit obtenu est solubilisé dans du CHCl₃, lavé avec H₂O puis avec H₂O saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis évaporée. Le produit 15 est obtenu après colonne chromatographique avec un rendement de 85% (2,7 g, 12,5 mmol).

Eluant : MeOH (100)

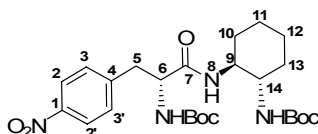
Rf : 0,1

[M+H]⁺ : 215,17

RMN¹H (CDCl₃) : 1,20 (m, 4H, CH₂(11)/CH₂ (12)); 1,40 (s, 9H, 3×CH₃); 1,50(s, 2H, NH₂); 1,70 (m, 2H, CH₂(13)); 2,00 (m, 2H, CH₂(10)); 2,72 (m, 1H, CH(14)); 3,10 (m, 1H, CH(9)); 4,40 (s, 1H, NH).

IR (cm⁻¹) : 3400-3000, 2977, 2930, 2858, 1693, 1550, 1521, 1240, 1175, 1016.

➤ ***N*-[(2*R*)-*N*-*tert*-butoxycarbonylamino-3-(*p*-nitrophényl)-propanone]-*N'*-*tert*-butoxycarbonyl-*trans*-(1*S*,2*S*)-cyclohexane-1,2-diamine 17**



17

Dans un ballon, 1 équivalent de *boc*-4-nitro-*D*-phénylalanine **16** (1,8 g ; 5,7 mmoles) et 1 équivalent du composé **15** (1,24 g ; 5,7 mmoles) sont solubilisés dans 50mL de CHCl₃ anhydre sous un flux d'azote. 1 équivalent de 1-hydroxybenzotriazole (0,78 g ; 5,7 mmoles) et 1 équivalent de *N*-méthylmorpholine (0,639 mL ; 5,7 mmoles) sont additionnés au mélange réactionnel. Le milieu devient alors jaune orangé. Le mélange est agité jusqu'à solubilisation totale puis 1 équivalent d'hydrochlorure de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide (EDC.HCl) (1,11 g ; 5,7 mmoles) est ajouté dans le ballon. La réaction est agitée pendant 12h à température ambiante.

Le mélange réactionnel est ensuite lavé avec H₂O puis H₂O saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis évaporée. Le produit **17** est obtenu après purification sur colonne chromatographique avec un rendement de 91% (2,63 g).

Eluant : CHCl₃ / AcOEt (9/1)

R_f : 0,4

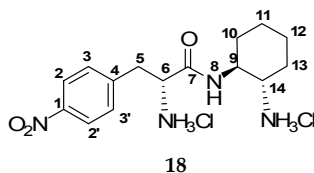
[M+H]⁺ : 507,5

RMN¹H (CDCl₃) : 1,15 (m, 4H, CH₂(11)/CH₂ (12)); 1,25 (s, 18H, 6×CH₃); 1,70 (m, 2H, CH₂ (13)); 1,95 (m, 2H, CH₂(10)); 3,05 (m, 1H, CH(14)); 3,20 (m, 2H, CH₂(5)); 3,50 (m, 1H, CH(9)); 4,40 (m, 1H, CH(6)); 4,65 (d, 1H, NH, ³J= 8,3

Hz); 5,10 (d, 1H, NH, $^3J = 8,3$ Hz); 6,65 (d, 1H, NH, $^3J = 7,3$ Hz); 7,35 (d, 2H, CH (3/3'), $^3J = 8,8$ Hz); 8,15 (d, 2H, CH(2/2'), $^3J = 8,5$ Hz).

IR (cm⁻¹) : 3338, 2933, 2856, 1686, 1648, 1532, 1516, 1341, 1251, 1165.

➤ **hydrochlorure de *N*-[(2*R*)-amino-3-(*p*-nitrophényl)-propanone]-*trans*-(1*S*,2*S*)-cyclohexane-1,2-diamine 18**



La *N*-[(2*R*)-*N*-*tert*-butoxycarbonylamino-3-(*p*-nitrophényl)-propanone]-*N'*-*tert*-butoxycarbonyl-*trans*-(1*S*,2*S*)-cyclohexane-1,2-diamine 17 (2,64 g ; 5,2 mmoles) est mise en suspension dans 60 mL de dioxane anhydre sous un courant d'azote. Le mélange réactionnel est refroidi à 0°C. HCl gazeux est mis à buller jusqu'à saturation du milieu. La température est progressivement augmentée jusqu'à température ambiante. La réaction est agitée pendant 12h.

Le précipité blanc obtenu est ensuite filtré et rincé avec quelques mLs de dioxane anhydre. Le dihydrochlorure désiré 18 est obtenu avec un rendement de 76% (1,5 g). Le solide est placé sous cloche à vide 24h.

Eluant : CHCl₃ / AcOEt (5/5)

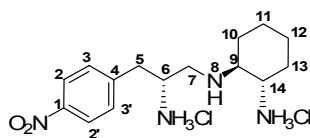
R_f : 0

[M+H]⁺ : 307,05

RMN¹H (CD₃OD) : 1,30 (m, 5H, CH₂(11)/CH₂(12)/CH(13)); 1,81 (m, 2H, CH(10)/CH(13)); 2,05 (d, 1H, CH(10)); 2,93 (td, 1H, CH(14), $^3J = 11,4$ Hz et 4,18 Hz) ; 3,23 (dd, 2H, CH₂(5), $^3J = 7,5$ Hz et 2,8 Hz) ; 3,75 (td, 1H, CH(9), $^3J = 10,8$ Hz et 4,0 Hz) ; 4,13 (t, 1H, CH(6), $^3J = 7,5$ Hz) ; 7,54 (d, 2H, CH(3/3'), $^3J = 8,8$ Hz) ; 8,22 (d, 2H, CH(2/2'), $^3J = 8,8$ Hz).

IR (cm⁻¹) : 3400-3000, 2940, 2864, 1677, 1518, 1345.

➤ **hydrochlorure de *N*-[(2*R*)-amino-3-(*p*-nitrophényl)-propyl]-*trans*-(1*S*,2*S*)-cyclohexane-1,2-diamine 19**

**19**

1 équivalent d'hydrochlorure de *N*-[(2*R*)-amino-3-(*p*-nitrophényl)-propanone]-*trans*-(1*S*,2*S*)-cyclohexane-1,2-diamine **18** sec (1,5 g ; 4,5 mmoles) est mis dans un ballon sous courant d'azote. Le ballon est alors placé dans un bain de glace. 13 équivalents de BH₃ contenu dans une solution de BH₃.THF (1M) (63,7 mL ; 63,7 mmoles) sont additionnés au goutte à goutte à l'aide d'une seringue directement sur le produit. Le mélange mousse. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant quelques minutes. Le milieu est refroidi à 0°C dans un bain de glace. Afin de neutraliser l'excès de BH₃.THF, du MeOH est ajouté lentement. Le solvant est évaporé à sec. La pâte obtenue est placée sous cloche à vide à 40°C pendant 12h. Une huile marron est ainsi obtenue.

40 mL de dioxane anhydre sont ajoutés dans le ballon sous atmosphère inerte. L'huile marron est en suspension. Le ballon est placé dans un bain de glace. HCl gazeux est ensuite mis à buller. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 5h, puis est filtré et rincé avec Et₂O anhydre.

Le produit désiré **19** est purifié sur colonne chromatographique et obtenu avec un rendement quantitatif. Le sel est conservé sous cloche à vide.

Eluant : MeOH / NH₄OH (10/1)

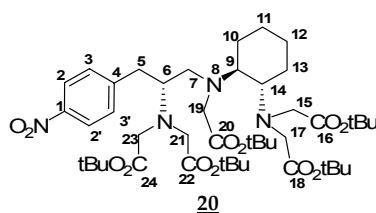
R_f : 0,1

[M+H]⁺ : 293,4

RMN¹H (CD₃OD) : 1,20-1,90 (m, 6H, CH₂(11)/ CH₂(12)/ CH₂(13)); 2,30 (m, 2H, CH₂(10)); 3,10 (dd, 1H, CH(14), ³J=9,2 Hz et 14,3 Hz); 3,45 (m, 5H, CH₂(5)/ CH₂(7)/ CH(9)); 4,16 (m, 1H, CH(6)); 7,70 (d, 2H, CH(3/3'), ³J=8,8 Hz); 8,24 (d, 2H, CH(2/2'), ³J=8,8 Hz).

IR : 3400- 3000, 2940, 1518, 1345.

➤ **Ester *N*-[(2*R*)-amino-3-(*p*-nitrophényl)-propyl]-*trans*-(1*S*,2*S*)-cyclohexane-1,2-diamine-*N,N',N'',N'''*-pentaacétate de *tert*-butyle **20**.**



1 équivalent d'hydrochlorure **19** (0,26 g ; 0,8 mmoles) est solubilisé dans 50 mL de CH₃CN anhydre. Le mélange est agité quelques minutes à température ambiante sous un courant d'azote. 10 équivalents de KI (1,34 g ; 8 mmoles) et 12 équivalents de K₂CO₃ (1 g ; 9,6 mmoles) sont ensuite ajoutés dans le ballon. 6 équivalents de *tert*-butyl-bromoacétate (0,78 mL ; 5,3 mmoles) sont additionnés au mélange réactionnel. La réaction est agitée à température ambiante toute une nuit.

Le solvant est évaporé à sec. L'huile orangée obtenue est solubilisée dans du CHCl₃ puis est lavée avec H₂O et H₂O saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis évaporée.

Le produit **20** est purifié sur colonne chromatographique et obtenu avec un rendement de 48% (0,33 g).

Eluant : CH₂Cl₂ / CH₃CN (7/3)

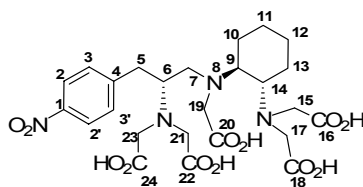
R_f : 0,3

[M+H]⁺ : 863,9

RMN¹H (CDCl₃) : 1,10-1,60 (m, 49H, tBu (16/ 18/ 20/ 22/ 24); CH₂ (11/12)); 1,68 (m, 2H, CH₂(13)); 2,04 (m, 2H, CH₂(10)); 2,61 (m, 5H, CH(14)/CH₂(5/7)); 2,96 (m, 1H, CH(9)); 3,25 (s, 2H, CH₂(15)); 3,30 (m, 1H, H(6)); 3,40 (s, 4H, CH₂(17/19)); 3,55 (s, 4H, CH₂(21/23)); 7,55 (d, 2H, CH(3/3'), ³J= 8,6 Hz); 8,07 (d, 2H, CH(2/2'), ³J=8,6 Hz).

IR : 2980, 1728, 1520, 1368, 1345, 1233, 1153.

➤ **Acide N-[(2R)-amino-3-(p-nitrophényl)-propyl]-trans-(1S,2S)-cyclohexane-1,2-diamine-N,N',N'',N''',N'''-pentaacétique **21**.**

**21**

20 mL d'acide trifluoroacétique sont ajoutés à 1,5 g de l'ester **20** (1,73 mmol) à 0°C. La réaction est agitée pendant 12h à température ambiante.

Le mélange réactionnel est évaporé à sec. Le produit est solubilisé dans H₂O et extrait plusieurs fois avec CHCl₃. La phase aqueuse est lyophilisée. Le produit désiré **21** est obtenu avec un rendement de 90% (0,91 g).

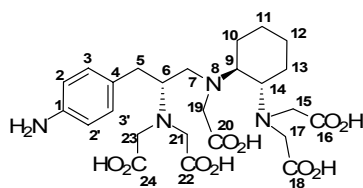
Eluant : CH₂Cl₂ / CH₃CN (7/3)

R_f : 0

ES⁻ : [M-H]⁺ : 581

RMN¹H (CD₃OD) : 1,40 (m, 4H, CH₂(11/12)) ; 1,70 (m, 2H, CH₂(13)); 2,20 (m, 2H, CH₂(10)); 3,00-4,50 (m, 17H, CH(14)/CH(9)/CH(6)/CH₂(5/7)/CH₂(15/17/19/21/23)); 7,6 (d, 2H, CH(3/3'), ³J=8,6 Hz); 8,20 (d, 2H, CH(2/2'), ³J=8,6 Hz).

➤ **Acide N-[(2R)-amino-3-(p-aminophényl)-propyl]-trans-(1S,2S)-cyclohexane-1,2-diamine-N,N',N'',N'''-pentaacétique **22****

**22**

L'acide N-[(2R)-amino-3-(p-nitrophényl)-propyl]-trans-(1S,2S)-cyclohexane-1,2-di amine-N,N',N'',N'''-pentaacétique **21** (0,9 g ; 1,54 mmol) est solubilisé dans 20 mL de MeOH et placé dans le générateur. 90 mg de Pd/C est ajouté dans le générateur. L'atmosphère du générateur est ensuite saturée en hydrogène. La réaction est agitée à température ambiante et à pression atmosphérique pendant 12h.

Le mélange réactionnel est filtré sur célite afin d'éliminer le catalyseur. Le filtrat est ensuite évaporé à sec. Le rendement de la réaction est quasi-quantitatif (99%, 0,84 g).

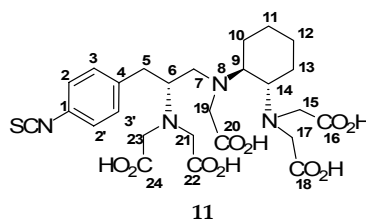
Eluant : MeOH (100)

R_f : 0

[M+H]⁺ : 553

RMN¹H (CD₃OD) : 1,40 (m, 4H, CH₂(11/12)); 1,70 (m, 2H, CH₂(13)); 2,20 (m, 2H, CH₂(10)); 3,00-4,50 (m, 17H, CH(14)/CH(9)/CH(6)/CH₂(5/7)/CH₂(15/17/19/21/23)); 7,45 (dd, 4H, Ar, ³J=17,0 et 8,5 Hz).

➤ **Acide *N*-[(2*R*)-amino-3-(*p*-isothiocyanatophényl)-propyl]-*trans*-(1*S*,2*S*)-cyclohexane-1,2-diamine-*N,N',N'',N''',N''''*-pentaacétique 11**



1 équivalent d'acide *N*-[(2*R*)-amino-3-(*p*-aminophényl)-propyl]-*trans*-(1*S*,2*S*)-cyclohexane-1,2-diamine-*N,N',N'',N''',N''''*-pentaacétique 22 (7 mg ; 12,6

μmoles) est placé dans un ballon et solubilisé dans 1ml de H₂O. 62

équivalents de thiophosgène (60μl ; 0,78 mmoles) sont ensuite ajoutés en solution dans 5 ml de CHCl₃. Le milieu réactionnel est agité vigoureusement pendant 2h.

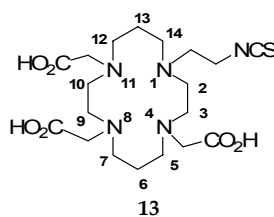
La phase aqueuse contenant le produit est séparée de la phase organique.

L'excès de thiophosgène contenu dans la phase organique est neutralisé avec un mélange EtOH-NaOH. La phase aqueuse est acidifiée puis évaporée à sec. Le produit 11 est obtenu avec un rendement de 90% (6,7 mg).

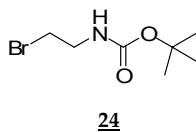
[M+H]⁺ : 594

RMN¹H (CD₃OD) : 1,40 (m, 4H, CH₂(11/12)); 1,70 (m, 2H, CH₂(13)); 2,20 (m, 2H, CH₂(10)); 3,00-4,50 (m, 17H, CH(14)/CH(9)/CH(6)/CH₂(5/7)/CH₂(15/17/19/21/23)); 7,37 (m, 4H, Ar).

II.2.2. Synthèse du TE3A-NCS 13



➤ ***N*-(Boc)-2-bromoéthylamine 24.**



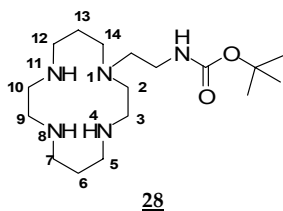
1 équivalent d'hydrobromure de 2-bromoéthylamine 23 (5,5 g ; 26,8 mmol) est dissous dans un tricol dans 30 mL de H₂O. 1 équivalent de di-*tert*-butyl dicarbonate en solution dans 30 mL de CH₂Cl₂ est ajouté dans le tricol puis 40 mL de NaOH 1M. Le mélange réactionnel est agité vigoureusement pendant 12h à température ambiante.

La phase organique est séparée et lavée par une solution de HCl 1M puis par une saumure. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et le solvant évaporé. Le produit 24 est ainsi obtenu avec un rendement de 80% (solide blanc ; 4,8 g).

[M+H]⁺ : 224,1

RMN¹H (CDCl₃) : 1,37 (s, 9H, CH₃ (Boc)); 3,37 (t, 2H, CH₂-N, ³J=5,5 Hz); 3,43 (t, 2H, CH₂-Br, ³J=5,5 Hz); 5,16 (s, 1H, NH).

➤ ***2-N'*-(1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane)-*N*-Boc-éthylamine 28.**



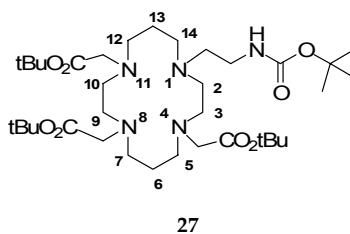
1 équivalent de 1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane **25** (2 g ; 9,78 mmol), plus couramment appelé cyclam, est placé en suspension dans 50 mL de toluène anhydre sous azote. 0,25 équivalent de *N*-(*Boc*)-2-bromoéthylamine **24** (0,55 g ; 2,45 mmol), dissous dans 30 mL de toluène anhydre, est additionné goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité à 70°C pendant 24h. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est extrait par H₂O. Les phases aqueuses sont rassemblées et extraites par CH₂Cl₂. La phase organique est lavée une fois par H₂O. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le résidu obtenu **28** est séché sous pompe à vide. On obtient ainsi un solide blanc (0,72 g ; 86%).

[M+H]⁺ : 344,3 ; [M+Na]⁺ : 366,3

RMN¹H (CDCl₃) : 1,45 (s, 9H, CH₃ (*Boc*)); 1,73 (m, 4H, 2×CH₂(6/13)); 2,51 (m, 4H, CH₂(2/14)); 2,62-2,76 (m, 17H, CH₂(3/5/7/9/10/12)/CH₂-CH₂-NBoc/2 NH); 3,28 (m, 2H, CH₂-NBoc); 6,23 (s, 1H, NHBoc).

RMN¹³C (CDCl₃) : 26,0/28,4 (C₆/C₁₃); 28,5 (3×CH₃); 38,4 (CH₂-NBoc); 47,3/ 47,6/ 48,6/ 49,3/ 49,5/ 51,2 (C_{3/5/7/9/10/12}); 52,4/ 54,1/ 54,9 (C_{2/14}; N-CH₂); 78,9 (C(*Boc*)); 156 (CO).

➤ **Ester *N'*-[*N*-(*Boc*)-éthylamino]-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane-*N''*,*N'''*,*N''''*-triacétate de *tert*-butyle **27**.**



1 équivalent de 2-*N'*-(1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane)-*N*-*Boc*-éthylamine **28** (0,3 g ; 0,87 mmol) est dissous dans 20 mL de CH₃CN anhydre sous azote. 10 équivalents de Na₂CO₃ anhydre (0,92 g) et 4 équivalents de 2-bromoacétate de *tert*-

butyle sont ajoutés. Le milieu réactionnel est chauffé à 60°C pendant 8h puis agité toute une nuit à température ambiante.

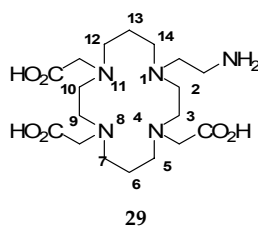
Les sels sont filtrés et le filtrat extrait 3 fois au *n*-hexane. La phase CH₃CN est évaporée. On obtient ainsi le produit désiré **27** avec un rendement de 92% (0,55 g ; solide blanc).

[M+H]⁺ : 686,6 ; **[M+Na]⁺** : 708,6

RMN¹H (CDCl₃) : 1,43 (m, 36H, 12×CH₃); 1,55 (m, 2H, CH₂(6)); 1,69 (m, 2H, CH₂(13)); 2,38-2,76 (m, 18H, CH₂(2/3/5/7/9/10/12/14)/CH₂-CH₂-NBoc); 3,02 (m, 2H, CH₂-NBoc); 3,18 (s, 2H, CH₂-COOtBu); 3,27 (s, 2H, CH₂-COOtBu); 3,36 (s, 2H, CH₂-COOtBu); 6,78 (s, 1H, NHBoc).

RMN¹³C (CDCl₃) : 24,9/25,2 (C₆/C₁₃); 28,1/28,2/28,2/28,5 (12×CH₃); 39,3 (CH₂-NBoc); 47,7/49,4/49,6/50,7/51,8/51,9/52,3/53/55,2/55,9/57,1 (C_{2/3/5/7/9/10/12/14}/4×CH₂-N); 78,2 (C (Boc)); 80,4/80,6/80,7 (3×C(tBu)); 156,5 (CO (Boc)); 170,5/170,9/171,3 (3×CO).

➤ **Acide *N*-(éthylamino)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane-*N'*,*N''*,*N'''*-tri acétique **29**.**



0,124 g (0,18 mmol) de l'ester *N'*-[*N*-(Boc)-éthylamino]-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane-*N''*,*N'''*,*N''''*-triacétate de *tert*-butyle **27** sont dissous dans 2 mL d'acide trifluoroacétique dans un ballon surmonté d'un réfrigérant. 5 équivalents de triisopropylsilane (186 μ L) sont ensuite additionnés dans le ballon. Le milieu réactionnel est agité pendant 12h à température ambiante.

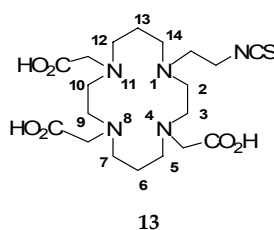
Le TFA est évaporé. Le résidu est repris dans H₂O, lavé par Et₂O puis par AcOEt. La phase aqueuse est évaporée pour donner une huile incolore avec un rendement de 96% (72 mg).

ES⁻ : [M-H]⁺ : 417

RMN¹H (D₂O) : 1,97 (m, 4H, CH₂(6/13)); 3,07-3,31 (m, 20H, CH₂(2/3/5/7/9/10/12/14)/CH₂-CH₂-COOH); 3,72 (s, 2H, -CH₂-COOH); 3,74 (s, 2H, -CH₂-COOH); 3,77 (s, 2H, -CH₂-COOH).

RMN¹³C (D₂O) : 19,8/20,0 (C₆/C₁₃); 32,7 (CH₂-NH₂); 47,6/47,9/49,1/49,3/49,6/49,8/50,0/50,4/50,6 (C_{2/3/5/7/9/10/12/14}/CH₂-CH₂-N); 52,7/ 52,8/ 52,9 (3×CH₂-COOH); 169,9/170,3/170,5 (3×COOH).

➤ **Acide *N*-(éthylisothiocyanato)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane-*N'*,*N''*,*N'''*-triacétique 13.**



1 équivalent d'acide *N*-(éthylamino)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane-*N'*,*N''*,*N'''*-triacétique 29 (0,5 g ; 1,2 mmol) est mis en solution dans 5 mL de H₂O en présence de 5 équivalents de NEt₃ (0,8 mL ; 6 mmol). 2 équivalents de thiophosgène (183 μ L ; 2,4 mmol) sont ensuite ajoutés en solution dans 3 mL de CHCl₃. Le milieu réactionnel est agité pendant 1h.

La phase aqueuse est extraite. Le thiophosgène présent dans la phase organique est neutralisée par EtOH-NaOH. La phase aqueuse est basifiée avec K₂CO₃ jusqu'à pH 9 et extraite plusieurs fois par CHCl₃ afin d'éliminer la NEt₃. La phase aqueuse est ensuite acidifiée par HCl 1M puis évaporée à sec. Le produit 13 est alors obtenu avec un rendement de 87% (0,48 g ; 1 mmol).

ES⁻ : [M-H]⁺ : 459

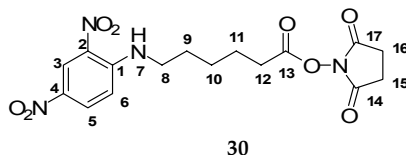
RMN¹H (D₂O) : 1,97 (m, 4H, CH₂(6/13)); 3,10-3,31 (m, 18H, CH₂(2/3/5/7/9/10/12/14)/CH₂-CH₂-COOH); 3,69 (t, 2H, CH₂-NCS) 3,72 (s, 2H); 3,74 (s, 2H); 3,76 (s, 2H).

RMN¹³C (D₂O) : 20,0/21,8 (C₆/C₁₃); 45,0 (CH₂-NCS); 50,0-58,0 (C_{2/3/5/7/9/10/12/14}/CH₂-CH₂-N/3×CH₂-COOH); 132,5 (NCS); 170,0/170,3/170,5 (3×COOH).

II.3. Synthèses des haptènes.

II.3.1. Synthèse de l'haptène DNP-cap-CO-NHS 30

➤ **Ester 6-(2,4-dinitrophénylamino)-caproate de *N*-hydroxysuccinimidyle 30**



1 équivalent d'acide 6-(2,4-dinitrophénylamino)-caproïque 32 (0,2 g ; 0,67 mmoles) est placé dans un ballon sous courant de N₂, puis est solubilisé dans 5 mL de CH₃CN anhydre. 2 équivalents de NEt₃ (0,19 mL ; 1,3 mmoles) sont ensuite ajoutés au milieu réactionnel. 2,5 équivalents de *N,N,N',N'*-tétraméthyl-*O*-(*N*-succinimidyl)-uronium tétrafluoroborate 33 (0,5 g ; 1,68 mmoles) sont additionnés à température ambiante. La réaction est agitée à température ambiante. On observe au bout de quelques minutes un changement de couleur (rose au marron foncé). Au bout de 15 minutes, la réaction est totale.

Le solvant est évaporé à sec. Le produit 30 est obtenu après purification sur colonne chromatographique avec un rendement de 98% (solide jaune ; 0,26 g ; 0,66 mmoles).

Eluant : CHCl₃/ MeOH : 9/1

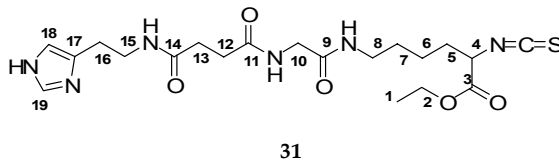
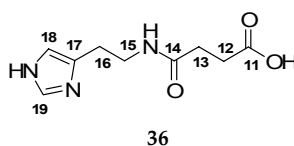
R_f = 0,9

[M+H]⁺ : 396,7

RMN¹H (CDCl₃) : 1,59 (quint, 2H, CH₂(10), ³J=7,02 Hz); 1,78 (m, 4H, CH₂(9/11)); 2,69 (t, 2H, CH₂(12), ³J=7 Hz); 2,86 (s, 4H, CH₂(15/16)); 3,44 (dd, 2H, CH₂(8), ³J=12,5 et 7,0 Hz); 6,93 (d, 1H, CH(6), ³J=9,8 Hz); 8,28 (d, 1H, CH(5), ³J=9,5 Hz); 8,57 (s, 1H, NH) ; 9,16 (s, 1H, CH(3)).

RMN¹³C (CDCl₃) : 24,2 (C_{15/16}); 24,5 (C₁₁); 26,5 (C₁₀); 29,9 (C₉); 31 (C₁₂); 44,1 (C₈); 115,3 (C₆); 119,5 (C₃); 128,0 (C₅); 133,1 (C₂); 137,7 (C₄); 144,7 (C₁); 167,5 (C₁₃); 169,0 (2×C=O).

IR : 3343, 2952, 1814, 1787, 1733, 1614, 1590, 1519, 1334, 1271, 1211, 1074.

II.3.2. Synthèse de l'haptène HSGL-NCS 31.➤ Acide 4-histamidylsuccinique 36

1 équivalent d'histamine 34 (0,2 g ; 1,75 mmol) est dissous dans 5 mL de DMF anhydre. 2 équivalents d'anhydride succinique 35 (0,35 g ; 3,5 mmol) sont dissous dans un tricol sous atmosphère azotée avec 5 ml de DMF anhydre. La solution contenant l'histamine 34 est alors ajoutée goutte à goutte dans le tricol. Le milieu réactionnel est agité 3 heures à température ambiante. Le DMF est évaporé. Le résidu est repris dans l'éthanol absolu et plongé dans un bain de glace. Le solide obtenu est séché une nuit sous cloche à vide. Le produit 36 est obtenu avec un rendement de 82% (solide beige ; 0,3 g).

Eluant : MeOH : 1

R_f = 0,4

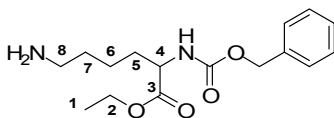
ES⁺ : [M+H]⁺ : 212 ; [2M+Na]⁺ : 445 **ES⁻** : [M-H]⁻ : 209,9 ; [2M-H]⁻ : 421

RMN¹H (CD₃OD) : 2,44 (t, 2H, CH₂(13), ³J=6,4 Hz); 2,51 (t, 2H, CH₂(12), ³J=6,4 Hz); 2,81 (t, 2H, CH₂(16), ³J=6,8 Hz); 3,41 (t, 2H, CH₂(15), ³J=6,8 Hz); 7,03 (s, 1H, CH(18)); 8,05 (s, 1H, CH(19)).

RMN¹³C (CD₃OD) : 26,7 (C₁₆); 31,9+32,5 (C_{12/13}); 40,0 (C₁₅); 118,1 (C₁₈); 134,5+135,5 (C_{17/19}); 175,2 (CO₁₄); 178,2 (CO₁₁).

IR : 3295,3110, 2748, 2260, 1658, 1566, 1412, 1364, 1220.

➤ N-□-(benzyloxycarbonyl)-lysinate d'éthyle 38.



6,1 g (21,3 mmol) de *N*-ε-(CBz)-lysine **37** sont mis en suspension dans 150 mL de EtOH absolu. Le milieu réactionnel est refroidi dans un bain de glace. Un flux de HCl_{gaz} est appliqué dans la solution éthanolique jusqu'à dissolution complète du réactif. Après 5h d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé. Le résidu est dissous dans AcOEt puis lavé par une solution de Na₂CO₃ à pH 12. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le produit **38** est obtenu sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 97% (6,37 g ; 20,7 mmol).

Eluant : CHCl₃/MeOH : 9/1

R_f = 0,5

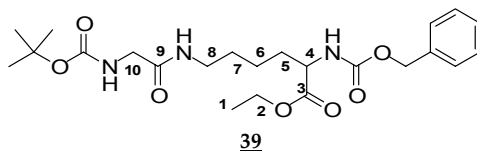
[M+H]⁺ : 309,7

RMN¹H (CDCl₃) : 1,16 à 1,98 (m, 11H, dont 1,21 (t, CH₃, ³J=7 Hz) + CH₂(5/6/7) + NH₂); 2,60 (t, 2H, CH₂(8), ³J=6,7 Hz); 4,12 (q, 2H, CH₂(2), ³J=7 Hz); 4,30 (m, 1H, CH(4)); 5,05 (s, 2H, CH₂-Bz); 5,50 (d, 1H, NH, ³J=6,1 Hz); 7,29 (s, 5H, Bz).

RMN¹³C (CDCl₃) : 14,1 (C₁); 22,4 (C₆); 28,8+32,4 (C_{5/7}); 41,5 (C₈); 53,8 (C₄); 61,3 (C₂); 66,9 (C₉); 127,9-128,5 (5×CH_{Ar}); 136,3 (C_{Ar}); 155,9 (NH-CO); 172,5 (C₃).

IR : 3332-3035, 2947, 2860, 1718, 1535, 1332, 1263, 1213, 1135, 1029.

➤ ***N*-(Boc)-glycyl-*N*-ε-(benzyloxycarbonyl)-lysinate d'éthyle **39**.**



1,1 équivalents de *N*-ε-(benzyloxycarbonyl)-lysinate d'éthyle **38** (6,37 g ; 20,3 mmol) sont dissous dans 50 mL de CHCl₃ anhydre sous azote. 1 équivalent de *N*-Boc-glycine est ajouté, puis 1,5 équivalents de NMM (3,1 mL), de HOBt (3,81 g) sont additionnés au milieu réactionnel. Puis après dissolution totale du milieu, 1,5 équivalents de EDC.HCl (5,4 g) sont ajoutés. Après agitation durant 12h à température ambiante, le solvant est évaporé, le résidu repris dans AcOEt et lavé

avec HCl 0,2N puis deux fois par H₂O. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le produit brut est purifié sur colonne chromatographique (Eluant : CHCl₃/MeOH : 95/5). Le produit **39** est obtenu sous forme d'une huile incolore qui cristallise après séchage sous cloche à vide en un solide blanc (99,4% ; 8,69 g).

Eluant : CH₂Cl₂/AcOEt : 1/1

R_f = 0,25

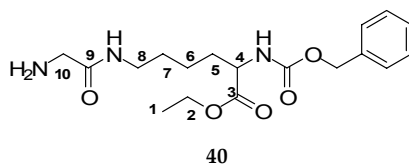
[M+Na]⁺ : 488,5

RMN¹H (CDCl₃) : 1,23 à 1,85 (m, 18H, dont 1,23 (t, CH₃, ³J=7 Hz) et 1,44 (s, 3×CH₃) + CH₂(5/6/7)); 3,24 (m, 2H, CH₂(8)); 3,74 (d, 2H, CH₂(10), ³J=5,8 Hz); 4,19 (q, 2H, CH₂(2), ³J=7 Hz); 4,31 (m, 1H, CH(4)); 5,11 (s, 2H, CH₂-Bz); 5,28 (m, 1H, NH); 5,55 (d, 1H, NH, ³J=8,2 Hz); 6,34 (m, 1H, NH); 7,35 (s, 5H, Bz).

RMN¹³C (CDCl₃) : 14,1 (C₁); 22,4 (C₆); 28,2 (C_{Boc}); 28,8+32,1 (C_{5/7}); 38,9 (C₈); 44,3 (C₁₁); 53,6 (C₄); 61,4 (C₂); 66,9 (CH₂-Bz); 80,1 (C_{IV Boc}); 128,0-128,1 (5×CH_{Ar}); 136,2 (C_{Ar}); 155,4 + 156,0 (CO_{carbamate}); 169,5 (C₉); 172,4 (C₃).

IR : 3297, 3053, 2975, 2933, 2879, 1718, 1689, 1525, 1371, 1249, 1170.

➤ **Glycyl-N-□-(benzyloxycarbonyl)-lysinate d'éthyle 40.**



6 équivalents d'acide trifluoacétique (8,58 mL) sont ajoutés lentement sur 8,65 g (21,29 mmol) de N-(Boc)-glycyl-N-□-(benzyloxycarbonyl)-lysinate d'éthyle **39** refroidi dans un bain de glace. On chauffe à 35°C jusqu'à dissolution complète du réactif de départ puis on agite 1h à 30°C.

Le TFA est évaporé et le résidu est repris dans CH₂Cl₂, lavé par une solution de NaHCO₃ saturée. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. L'huile obtenue est lavée dans Et₂O et filtrée. Après séchage sous cloche à vide, le produit final **40** est obtenu avec un rendement de 99,7% (huile jaune, 6,77 g).

Eluant : MeOH : 1

R_f = 0,3

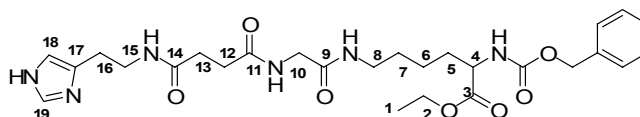
[M+H]⁺ : 366,7 ; **[2M+H]⁺** : 731,7

RMN¹H (CDCl₃) : 1,19 à 1,79 (m, 11H, dont 1,23 (t, CH₃, ³J=7 Hz) + CH₂(5/6/7) + NH₂); 3,20 (m, 2H, CH₂(8)); 3,42 (s, 2H, CH₂(10)); 4,17 (q, 2H, CH₂(2), ³J=7 Hz); 4,30 (m, 1H, CH(4)); 5,08 (s, 2H, CH₂-Bz); 5,61 (d, 1H, NH, ³J=8,3 Hz); 5,55 (d, 1H, NH, ³J=8,2 Hz); 7,33 (s, 5H, Bz) ; 7,48 (m, 1H, NH).

RMN¹³C (CDCl₃) : 14,0 (C₁); 22,4 (C₆); 28,8+32,0 (C_{5/7}); 38,7 (C₈); 43,4 (C₁₀); 53,7 (C₄); 61,4 (C₂); 66,8 (CH₂-Bz); 127,9-128,5 (5×CH_{Ar}); 136,2 (C_{Ar}); 155,1 (CO_{carbamate}); 170,7 (C₉); 172,5 (C₃).

IR : 3346, 3046, 2951, 2937, 2868, 1718, 1660, 1533, 1432, 1261, 1030.

➤ **Histaminosuccinylglycyl-N-□-(benzyloxycarbonyl)-lysinate d'éthyle 41.**



41

1 équivalent d'acide 4-histamidylsuccinique **36** (0,15 g ; 0,71 mmol) est dissous dans 5 mL de DMF anhydre à 90°C sous azote. Après retour à température ambiante, 1,2 équivalents de glycyl-N-□-(benzyloxycarbonyl)-lysinate d'éthyle **40** (0,311 g) sont ajoutés au milieu réactionnel puis 1,5 équivalents de NMM (118 □L), de HOBt (0,144 g), de EDC.HCl (0,205 g).

Après 5h d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé. Le résidu est purifié sur colonne chromatographique (Eluant : CHCl₃/MeOH : 7/3). Le produit pur est obtenu avec un rendement de 79% (solide blanc ; 0,312 g).

Eluant : CHCl₃/MeOH : 7/3

R_f = 0,26

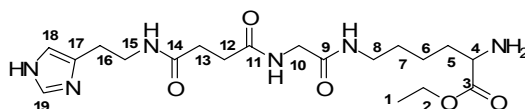
[M+H]⁺ : 560,2

RMN¹H (CD₃OD) : 1,09 à 1,66 (m, 9H, dont 1,12 (t, CH₃, ³J=7 Hz) + CH₂(5/6/7)); 2,37 (m, 4H, CH₂(12/13)); 2,65 (t, 2H, CH₂(16), ³J=7 Hz); 3,08 (t, 2H, CH₂(8), ³J=6,7 Hz); 3,29 (t, 2H, CH₂(15), ³J=7 Hz); 3,79 (s, 2H, CH₂(10)); 4,02 (m, 3H, CH(4) + CH₂(2)); 4,96 (s, 2H, CH₂-Bz); 6,76 (d, 1H, CH₁₈, ³J=1,1 Hz); 7,17 (s, 5H, Bz); 7,56 (d, 1H, CH₁₉, ³J=1,1 Hz).

RMN¹³C (CD₃OD) : 14,8 (C₁); 24,4 (C₆); 28,1+30,0+32,1+32,4+32,5 (C_{5/7/12/13/17}); 40,3+40,8 (C_{8/15}); 44,0 (C₁₀); 55,9 (C₄); 62,6 (C₂); 67,9 (CH₂-Bz);

119,0 (C₁₈); 129,1-129,8 (5×CH_{Ar}); 136,4 (C_{Ar}); 138,5 (C₁₉); 159,0 (CO_{carbamate}); 172,1+174,6+174,9 (C₉+C₁₁+C₁₄); 175,9 (C₃).
 IR : 3300, 3074, 2951, 2939, 2868, 1740, 1682, 1554, 1346, 1217, 1072.

➤ ***N*-□-(histaminosuccinylglycyl)-lysinate d'éthyle 42.**



42

0,4 g (0,71 mmol) d'histaminosuccinylglycyl-*N*-□-(benzyloxycarbonyl)-lysinate d'éthyle 41 sont dissous dans 20 mL de MeOH et placés dans le réacteur à hydrogénation. 0,12 g (0,3% massique) de Palladium 5% sur charbon sont additionnés. Le milieu réactionnel est agité pendant 12h sous hydrogène à pression atmosphérique.

Une filtration sur célite est appliquée pour éliminer le catalyseur. Le filtrat est évaporé. Le produit déprotégé 42 est obtenu quasi-quantitativement (solide blanc ; 0,299 g ; 99,3%).

Eluant : MeOH : 1

R_f = 0,12

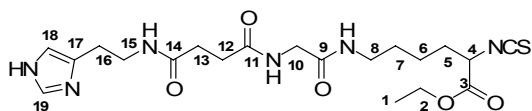
[M+H]⁺ : 425 ; **[M+Na]⁺** : 447

RMN¹H (CD₃OD) : 1,24 à 1,70 (m, 9H, CH₃ + CH₂(5/6/7)); 2,50 (m, 4H, CH₂(12/13)); 2,77 (t, 2H, CH₂(16), ³J=7 Hz); 3,21 (t, 2H, CH₂(8), ³J=7 Hz); 3,41 (t, 2H, CH₂(15), ³J=7 Hz); 3,80 (s, 2H, CH₂(10)); 4,00 (t, 1H, CH(4), ³J=6,4 Hz); 4,28 (q, 2H, CH₂(2), ³J=7,2 Hz); 6,85 (d, 1H, CH₁₈, ³J=1,1 Hz); 7,59 (d, 1H, CH₁₉, ³J=1,1 Hz).

RMN¹³C (CD₃OD) : 14,5 (C₁); 18,4 (C₆); 23,7+27,7+29,9+31,8+32,1 (C_{5/7/12/13/17}); 40,1+40,5+43,7 (C_{8/10/15}); 55,0 (C₄); 62,0 (C₂); 118,2 (C₁₈); 136,1 (C₁₉); 171,9+174,6+175,6 (C₉+C₁₁+C₁₄); 177,0 (C₃).

IR : 3290-3050, 2953, 2939, 2878, 1738, 1675, 1554, 1344, 1226, 994.

➤ **Isothiocyanate de la *N*-□-(histaminosuccinylglycyl)-lysinate d'éthyle 31.**

**31**

1 équivalent de *N*- α -(histaminosuccinylglycyl)-lysinate d'éthyle **42** (0,1 g ; 0,23 mmol) est solubilisé dans 2 mL de H₂O en présence de 1,5 équivalents de NEt₃ (48 μ L ; 0,34 mmol). 2 équivalents de thiophosgène (36 μ L ; 0,47 mmol) sont additionnés en solution dans 5 mL de CHCl₃. La réaction est agitée vigoureusement durant 1h. La phase aqueuse est récupérée et évaporée à sec. Le résidu est rincé plusieurs fois à l'Et₂O, puis solubilisé en HCl 0,5 M. La solution aqueuse est évaporée à sec. Le produit est placé sous cloche à vide. On obtient ainsi le produit désiré **31** avec un rendement de 85% (93 mg).

Eluant : MeOH : 1

R_f = 0,12

[M+Na]⁺ : 489

RMN¹H (CD₃OD) : 1,21 à 1,80 (m, 9H, CH₃ + CH₂(5/6/7)); 2,50 (m, 4H, CH₂(12/13)); 2,64 (t, 2H, CH₂(16), ³J=7 Hz); 3,18 (t, 2H, CH₂(8), ³J=7 Hz); 3,37 (t, 2H, CH₂(15), ³J=7 Hz); 3,80 (s, 2H, CH₂(10)); 4,28 (q, 2H, CH₂(2), ³J=7,2 Hz); 4,50 (t, 1H, CH(4), ³J=6,4 Hz); 6,80 (d, 1H, CH₁₈, ³J=1,1 Hz); 7,56 (d, 1H, CH₁₉, ³J=1,1 Hz).

RMN¹³C (CD₃OD) : 14,8 (C₁); 18,4 (C₆); 23,7+29,4+29,8+32,0+36,8 (C_{5/7/12/13/17}); 40,1+40,4+43,7 (C_{8/10/15}); 60,9 (C₂); 65,4 (C₄); 118,2 (C₁₈); 130,9 (NCS); 136,1 (C₁₉); 171,4+174,6+175,6 (C₉+C₁₁+C₁₄); 177,0 (C₃).

IR : 3300, 2951, 2939, 2868, 2100, 1738, 1680, 1554, 1344, 1217, 994.

II.4. Synthèses des différents "constructs".

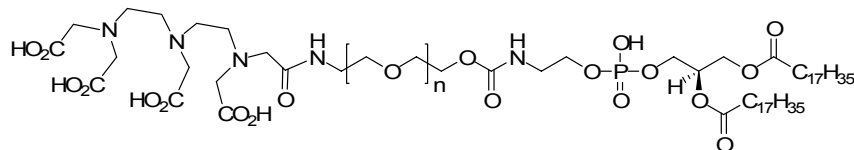
II.4.1. Synthèses des "constructs" chélatants.

Mode opératoire général.

5 équivalents d'agents chélatants sont solubilisés dans un ballon dans 0,5 mL de DMSO à 50°C. Une solution chloroformique contenant 1 équivalent de DSPE-PEG_n-NH₂ **7a/7b** et 5 équivalents de NEt₃ est additionnée lentement dans le ballon. La réaction est agitée à 50°C pendant 2h.

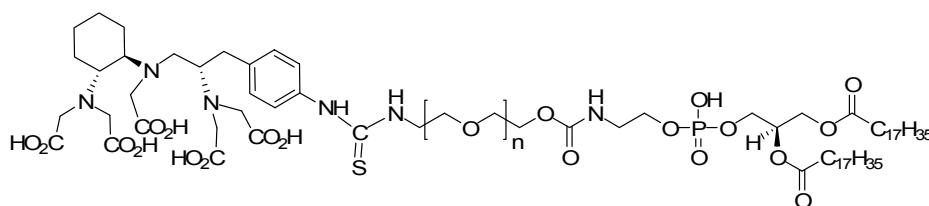
Le solvant est concentré. Une précipitation dans Et₂O à 0°C est appliquée. Le précipité est filtré et rincé par Et₂O.

➤ **DTPA-PEG_n-DSPE 43a/43b**

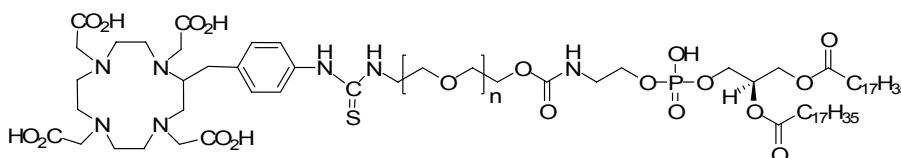


	PEG₂₀₀₀ 43a	PEG₆₀₀₀ 43b
	Réactifs de départ : 0,1 g (0,036 mmol) DSPE-PEG ₂₀₀₀ -NH ₂ 64 mg (0,18 mmol) DTPA-DA Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 7/3 R_f = 0 Masse obtenue : 84,7 mg Rdt : 75%	Réactif de départ : 50 mg (8 □ mol) DSPE-PEG ₆₀₀₀ -NH ₂ 16,3 mg (45,6 □ mol) DTPA-DA Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 R_f = 0 Masse obtenue : 40 mg Rdt : 75,6%
SM	[M + Na] ⁺ : 3151,7	[M + Na] ⁺ : 6609,4
RMN¹H (CDCl₃)	0,85 (m, 6H, 2×CH ₃); 1,25 (m, 62H, CH ₂ (DSPE)); 1,57 (m, 4H, CH ₂ -CH ₂ -CO); 2,26 (m, 4H, CH ₂ -CO); 2,60 (s, 8H, CH ₂ -N (DTPA)); 3,00-5,00 (m, 200H); 5,20 (s, 1H, NH); 6,30 (s, 1H, NH).	0,88 (m, 6H, 2×CH ₃); 1,25 (m, 62H, CH ₂ (DSPE)); 1,50 (m, 4H, CH ₂ -CH ₂ -CO); 2,50-5,00 (m, 570H); 5,24 (s, 1H, NH); 6,50 (s, 1H, NH).
RMN¹³C (CDCl₃)	14,1 (2×CH ₃); 22,8 (2×CH ₂ -CH ₃); 25,3 (2×CH ₂ -CH ₂ -CO (DSPE)); 28,9-32,0 (CH ₂ (DSPE)/ 2×CH ₂ -CO); 40,3 (CH ₂ -NH (DSPE)/CH ₂ -NH (PEG)); 50,7 (CH ₂ DTPA) ; 58,0 (CH ₂ -CO DTPA) ; 61,0 (CH ₂ -O-C=O (PEG)); 63,9-72,6 (CH ₂ -O-C=O (DSPE)/CH-CH ₂ -O-P=O)/NH-CH ₂ -CH ₂ -O-P=O)/ (CH ₂ -O-CH ₂) ₄₃ / CH(DSPE)/NH-CH ₂ -CH ₂ -O); 156,0 (NH-CO); 173,0 (2×O-C=O) ; 173,2 (COOH).	14,1 (2×CH ₃); 23,0 (2×CH ₂ -CH ₃); 25,4 (2×CH ₂ -CH ₂ -CO (DSPE)); 29,5-34,0 (24×CH ₂ (DSPE)/ 2×CH ₂ -CO); 40,5 (CH ₂ -NH (DSPE)/CH ₂ -NH (PEG)); 50,2 (CH ₂ DTPA) ; 56,9 (CH ₂ -CO DTPA) ; 61,8 (CH ₂ -O-C=O (PEG)); 63,3-71,0 (CH ₂ -O-C=O (DSPE)/ CH-CH ₂ -O-P=O)/NH-CH ₂ -CH ₂ -O-P=O/ (CH ₂ -O-CH ₂) ₁₃₅ /CH (DSPE)/ NH-CH ₂ -CH ₂ -O); 155,8 (NH-C=O); 172,8 (2×O-C=O) ; 173,0 (COOH).

➤ **CHXA''DTPA-PEG-DSPE 44a/44b**

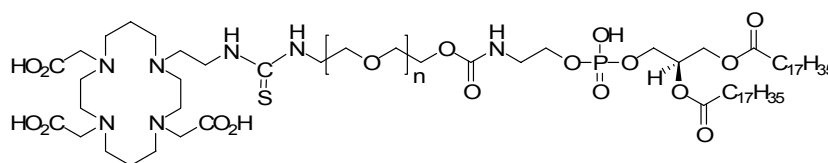


	PEG ₂₀₀₀ 44a	PEG ₆₀₀₀ 44b
	Réactifs de départ : 30 mg (10,1 μ mol) DSPE-PEG ₂₀₀₀ -NH ₂ 32 mg (54,1 μ mol) CHXA [®] DTPA-NCS Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 7/3 Rf = 0 Masse obtenue : 34,6 mg Rdt : 95%	Réactif de départ : 20 mg (3,2 μ mol) DSPE-PEG ₆₀₀₀ -NH ₂ 9,5 mg (45,6 μ mol) CHXA [®] DTPA-NCS Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 Rf = 0 Masse obtenue : 21 4 mg Rdt : 98%
SM	[M + Na] ⁺ : 3388,6	[M + Na] ⁺ : 6869,6
RMN¹H (CDCl₃)	0,83 (m, 6H, 2 $\times$ CH ₃); 1,23 (m, 62H, CH ₂ (DSPE)); 1,40 (m, 4H, CH ₂ CHX); 1,57 (m, 4H, CH ₂ -CH ₂ -CO); 1,71 (m, 2H, CH ₂ CHX); 2,00-5,00 (m, 220H); 6,50 (s, 1H, NH); 7,00 (m, 4H, Ar).	0,82 (m, 6H, 2 $\times$ CH ₃); 1,20 (m, 62H, CH ₂ (DSPE)); 1,32 (m, 4H, CH ₂ CHX); 1,53 (m, 4H, CH ₂ -CH ₂ -CO); 2,00-5,00 (m, 570H); 6,30 (s, 1H, NH); 7,10 (m, 4H, Ar).
RMN¹³C (CDCl₃)	14,0 (2 $\times$ CH ₃); 22,5 (2 $\times$ CH ₂ -CH ₃); 25,1 (2 $\times$ CH ₂ -CH ₂ -CO (DSPE)); 27,0-32,0 (CH ₂ (DSPE)/2 $\times$ CH ₂ -CO/CH ₂ CHX); 40,5 (CH ₂ -NH (DSPE)/CH ₂ -NH (PEG)); 54,0-55,0 (CH CHXDTPA/CH ₂ -CO CHXDTPA); 61,0 (CH ₂ -O-C=O (PEG)); 63,5-73,0 (CH ₂ -O-C=O (DSPE)/CH-CH ₂ -O-P=O)/NH-CH ₂ -CH ₂ -O-P=O)/(CH ₂ -O-CH ₂) ₄₃ /CH(DSPE)/NH-CH ₂ -CH ₂ -O); 127,0 (Ar); 155,8 (NH-CO); 173,0 (2 $\times$ O-C=O); 173,3 (COOH); 176,5 (C=S).	14,1 (2 $\times$ CH ₃); 22,4 (2 $\times$ CH ₂ -CH ₃); 25,2 (2 $\times$ CH ₂ -CH ₂ -CO (DSPE)); 28,0-33,0 (CH ₂ (DSPE)/2 $\times$ CH ₂ -CO/CH ₂ CHX); 40,5 (CH ₂ -NH (DSPE)/CH ₂ -NH (PEG)); 54,2-55,3 (CH CHXDTPA/CH ₂ -CO CHXDTPA); 60,5 (CH ₂ -O-C=O (PEG)); 63,0-72,4 (CH ₂ -O-C=O(DSPE)/CH-CH ₂ -O-P=O)/NH-CH ₂ -CH ₂ -O-P=O)/(CH ₂ -O-CH ₂) ₁₃₅ /CH(DSPE)/NH-CH ₂ -CH ₂ -O); 126,8 (Ar); 156,0 (NH-CO); 173,0 (2 $\times$ O-C=O/COOH); 177,0 (C=S).

➤ DOTA-PEG-DSPE **45a/45b**

	PEG ₂₀₀₀ 45a	PEG ₆₀₀₀ 45b
	Réactifs de départ : 22 mg (7,9 μ mol) DSPE-PEG ₂₀₀₀ -NH ₂ 21,7 mg (39,4 μ mol) DOTA-NCS Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 7/3 Rf = 0	Réactif de départ : 10 mg (1,6 μ mol) DSPE-PEG ₆₀₀₀ -NH ₂ 4,4 mg (8 μ mol) DOTA-NCS Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 Rf = 0

	Masse obtenue : 24,2 mg Rdt : 92%	Masse obtenue : 9,8 mg Rdt : 90%
SM	$[M + Na]^+ : 3346,4$	$[M + Na]^+ : 6827,4$
RMN¹H (CDCl₃)	0,83 (m, 6H, 2×CH ₃); 1,27 (m, 62H, CH ₂ (DSPE)); 1,57 (m, 4H, CH ₂ -CH ₂ -CO); 2,25-2,50 (m, 18H, CH ₂ -CH ₂ -CO/CH ₂ -CO/CH ₂ -N (DOTA)); 3,00-5,00 (m, 200H); 6,00 (s, 2H, NH); 6,60 (m, 4H, Ar).	0,84 (m, 6H, 2×CH ₃); 1,28 (m, 62H, CH ₂ (DSPE)); 1,50-2,60 (s, 20H, CH ₂ -CH ₂ -CO/CH ₂ -CO/CH ₂ -N (DOTA)); 3,30-4,50 (m, 550H); 6,00 (s, 2H, NH); 6,70 (m, 4H, Ar).
RMN¹³C (CDCl₃)	14,1 (2×CH ₃); 22,5 (2×CH ₂ -CH ₃); 25,2 (2×CH ₂ -CH ₂ -CO (DSPE)); 29,0-30,0 (CH ₂ (DSPE)/2×CH ₂ -CO); 40,8 (CH ₂ -NH (DSPE)/CH ₂ -NH (PEG)); 50,0-57,0 (CH ₂ /CH DOTA); 62,0-73,1 (CH ₂ -O-C=O (PEG)/CH ₂ -O-C=O (DSPE)/CH-CH ₂ -O-P=O/ NH-CH ₂ -CH ₂ -O-P=O/ (CH ₂ -O-CH ₂) ₄₃ /CH (DSPE)/NH-CH ₂ -CH ₂ -O); 126,6 (Ar); 155,6 (NH-C=O); 173,0 (2×O-C=O; COOH); 178,0 (C=S).	14,2 (2×CH ₃); 22,9 (2×CH ₂ -CH ₃); 25,4 (2×CH ₂ -CH ₂ -CO (DSPE)); 29,7 (CH ₂ (DSPE)); 34,0 (2×CH ₂ -CO); 41,0 (CH ₂ -NH (DSPE)/CH ₂ -NH (PEG)); 51,0-56,7 (CH ₂ /CH DOTA); 62,0-73,0 (CH ₂ -O-C=O (PEG)/CH ₂ -O-C=O (DSPE)/CH-CH ₂ -O-P=O/ NH-CH ₂ -CH ₂ -O-P=O/ (CH ₂ -O-CH ₂) ₁₃₅ /CH (DSPE)/NH-CH ₂ -CH ₂ -O); 125,9 (Ar); 156,0 (NH-C=O); 172,9 (2×O-C=O; COOH); 177,0 (C=S).

➤ **TE3A-PEG-DSPE 46a/46b**

	PEG₂₀₀₀ 46a	PEG₆₀₀₀ 46b
	Réactifs de départ : 20 mg (7,2 □mol) DSPE-PEG ₂₀₀₀ -NH ₂ 16,5 mg (35,8 □mol) TE3A-NCS Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 7/3 Rf = 0 Masse obtenue : 20,9 mg Rdt : 90%	Réactif de départ : 10 mg (1,6 □mol) DSPE-PEG ₆₀₀₀ -NH ₂ 4 mg (45,6 □mol) TE3A-NCS Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 Rf = 0 Masse obtenue : 9,8 mg Rdt : 92%
SM	$[M + Na]^+ : 3253,4$	$[M + Na]^+ : 6734,4$
RMN¹H (CDCl₃)	0,83 (m, 6H, 2×CH ₃); 1,27 (m, 62H, CH ₂ (DSPE)); 1,50 (m, 4H, CH ₂ -CH ₂ -CO); 2,00 (m, 4H); 2,30 (m, 2H, CH ₂ -CO); 3,00-5,00 (m, 200H); 6,30 (s, 1H, NH).	0,84 (m, 6H, 2×CH ₃); 1,28 (m, 62H, CH ₂ (DSPE)); 1,53 (m, 4H, CH ₂ -CH ₂ -CO); 2,10 (m, 4H); 2,20 (m, 4H, CH ₂ -CO); 3,30-5,10 (m, 550H); 6,50 (s, 1H, NH).
RMN¹³C (CDCl₃)	14,1 (CH ₃); 20,0-22,0 (CH ₂ -CH ₃ / CH ₂ TE3A); 25,3 (CH ₂ -CH ₂ -CO (DSPE)); 29,0-30,0 (CH ₂ (DSPE)/CH ₂ -CO); 40,2 (CH ₂ -NH (DSPE)); 41,8 (CH ₂ -NH (PEG)); 44,8 (CH ₂ -NHCS); 50,0-58,0 (CH ₂ TE3A); 62,1 (CH ₂ -O-C=O (PEG)); 63,0-74,0 (CH ₂ -O-C=O (DSPE)/CH-CH ₂ -O-P=O/ NH-CH ₂ -CH ₂ -O-P=O/ (CH ₂ -O-CH ₂) ₄₃ /CH (DSPE)/NH-CH ₂ -CH ₂ -O); 156,0 (NH-C=O); 173,1 (O-C=O/COOH); 180,7	14,2 (CH ₃); 20,4-23,0 (CH ₂ -CH ₃ / CH ₂ TE3A); 25,2 (CH ₂ -CH ₂ -CO (DSPE)); 29,7-30,5 (CH ₂ (DSPE)/CH ₂ -CO); 40,3 (CH ₂ -NH (DSPE)); 41,0 (CH ₂ -NH (PEG)); 45,0 (CH ₂ -NHCS); 51,0-58,0 (CH ₂ TE3A); 62,0 (CH ₂ -O-C=O (PEG)); 63,0-73,0 (CH ₂ -O-C=O (DSPE)/CH-CH ₂ -O-P=O/ NH-CH ₂ -CH ₂ -O-P=O/ (CH ₂ -O-CH ₂) ₁₃₅ /CH (DSPE)/NH-CH ₂ -CH ₂ -O); 155,8 (NH-C=O); 172,9 (O-C=O/COOH); 179,8 (C=S).

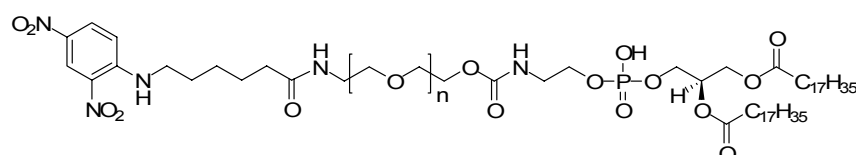
	(C=S).	
--	--------	--

II.4.2. Synthèses des “constructs” haptènes.

Mode opératoire général.

1 équivalent de DSPE-PEG_n-NH₂ **7a/7b** et 5 équivalents de NEt₃ est mis en solution dans du CHCl₃ dans un ballon. 5 équivalents d’haptène activé sont solubilisés dans un solvant approprié (CHCl₃ pour DNP-cap-CO-NHS **30**/ MeOH pour HSGL-NCS **31**) et additionnés dans le ballon. Le mélange réactionnel est agité à 50°C pendant 2h. Le solvant est concentré. Une précipitation dans Et₂O à 0°C est appliquée. Le précipité est filtré et rincé par Et₂O.

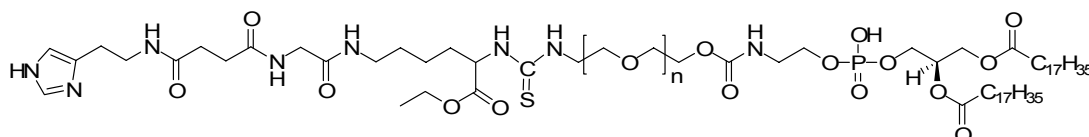
➤ DNP-PEG_n-DSPE **47a/47b**



	PEG ₂₀₀₀ 47a	PEG ₆₀₀₀ 47b
	Réactifs de départ : 0,1 g (0,036 mmol) DSPE-PEG ₂₀₀₀ -NH ₂ 70,5 mg (0,18 mmol) DNP-cap-CO-NHS Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 R_f = 0,2 Masse obtenue : 0,108 g Rdt : 98%	Réactif de départ : 50 mg (8 □mol) DSPE-PEG ₆₀₀₀ -NH ₂ 15,7 mg (40 □mol) DNP-cap-CO-NHS Eluant : CHCl ₃ / MeOH : 9/1 R_f = 0,15 Masse obtenue : 52 mg Rdt : 100%
SM	[M + Na] ⁺ : 3073,4	[M + Na] ⁺ : 6554,4
RMN¹H (CDCl₃)	0,83 (m, 6H, 2×CH ₃); 1,27 (m, 64H); 1,78 (m, 4H, CH ₂ -CH ₂ -CO); 2,30 (m, 8H); 3,00-4,40 (m, 190H); 5,20 (s, 1H, NH); 6,40 (s, 1H, NH); 6,90 (d, 1H,	0,84 (m, 6H, 2×CH ₃); 1,28 (m, 64H); 1,80 (m, 4H, CH ₂ -CH ₂ -CO); 2,32 (m, 8H); 3,00-4,00 (m, 560H); 5,30 (s, 1H, NH); 6,52 (s, 1H, NH); 6,91 (d, 1H, ³ J=

	$^3J = 9,75 \text{ Hz}$; 8,20 (d, 1H, $^3J = 9,78 \text{ Hz}$) ; 8,50 (s, 1H, NH) ; 9,10 (s, 1H).	9,77 Hz); 8,22 (d, 1H, $^3J = 9,78 \text{ Hz}$) ; 8,52 (s, 1H, NH) ; 9,00 (s, 1H).
RMN¹³C (CDCl ₃)	14,1 (2×CH ₃); 22,8 (2×CH ₂ -CH ₃); 24,0-26,0 (CH ₂ -CH ₂ -CO (DSPE)/CH ₂ DNP); 29,0-31,0 (CH ₂ (DSPE)/ CH ₂ -CO/ CH ₂ DNP); 40,5 (CH ₂ -NH (DSPE)); 42,0 (CH ₂ -NH (PEG)); 44,0 (CH ₂ DNP); 62,2 (CH ₂ -O-C=O (PEG)); 63,0 (CH ₂ -O-C=O (DSPE)); 64,5 (CH-CH ₂ -O-P=O)/NH-CH ₂ -CH ₂ -O-P=O); 68,0-73,0 ((CH ₂ -O-CH ₂) ₄₃ /CH (DSPE)/NH-CH ₂ -CH ₂ -O); 115,2 (Ar DNP) ; 119,6 (Ar DNP) ; 128 (Ar DNP) ; 133,2 (Ar DNP) ; 137,6 (Ar DNP); 144,5 (Ar DNP); 155,6 (NH-CO); 167,0 (C=O); 169,0 (C=O); 173,1 (2×O-C=O).	14,1 (2×CH ₃); 23,1 (2×CH ₂ -CH ₃); 24,0-26,5 (CH ₂ -CH ₂ -CO (DSPE))/ CH ₂ DNP); 29,7-33,0 (CH ₂ (DSPE)/ CH ₂ -CO/ CH ₂ DNP); 40,2 (CH ₂ -NH (DSPE)); 41,0 (CH ₂ -NH (PEG)); 62,0 (CH ₂ -O-C=O (PEG)); 63,8 (CH ₂ -O-C=O (DSPE)); 64,0-70,0 (CH-CH ₂ -O-P=O/ NH-CH ₂ -CH ₂ -O-P=O/(CH ₂ -O-CH ₂) ₁₃₅ /CH (DSPE)); 72,9 (NH-CH ₂ -CH ₂ -O); 115,0 (Ar DNP) ; 119,4 (Ar DNP) ; 128,1 (Ar DNP) ; 133,1 (Ar DNP) ; 137,7 (Ar DNP); 144,7 (Ar DNP); 156,0 (NH-CO); 167,5 (C=O); 169,0 (C=O); 173,1 (2×O-C=O).

➤ **HSGL-PEG_n-DSPE 48a/48b**

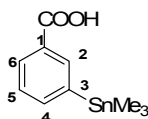


	PEG₂₀₀₀ <u>48a</u>	PEG₆₀₀₀ <u>48b</u>
	Réactifs de départ : 20 mg (7,1 μ mol) DSPE-PEG ₂₀₀₀ -NH ₂ 16,7 mg (36 μ mol) HSGL-NCS Eluent : CHCl ₃ / MeOH : 8/2 R_f = 0,1 Masse obtenue : 19,8 mg Rdt : 85%	Réactif de départ : 10 mg (1,6 μ mol) DSPE-PEG ₆₀₀₀ -NH ₂ 4 mg (8 μ mol) DTPA-DA Eluent : CHCl ₃ / MeOH : 8/2 R_f = 0,05 Masse obtenue : 8,6 mg Rdt : 80%
SM	[M + Na] ⁺ : 3260,4	[M + Na] ⁺ : 6741,4
RMN¹H (CDCl ₃)	0,82 (m, 6H, 2×CH ₃); 1,20-1,80 (m, 71H, CH ₂ (DSPE)/CH ₃ /CH ₂ HSGL/CH ₂ -CH ₂ -CO); 2,20 (m, 4H, CH ₂ -CO); 2,50 (m, 2H, CH ₂ HSGL) ; 3,00-4,50 (m, 197H); 5,20 (s, 1H, NH) ; 6,50 (s, 1H, NH); 6,80 (d, 1H, Ar HSGL, $^3J=1,1 \text{ Hz}$) ; 7,57 (d, 1H, Ar HSGL, $^3J=1,1 \text{ Hz}$).	0,84 (m, 6H, 2×CH ₃); 1,20-1,75 (m, 71H, CH ₂ (DSPE)/CH ₃ /CH ₂ HSGL/CH ₂ -CH ₂ -CO); 2,25 (m, 4H, CH ₂ -CO); 2,50 (m, 2H, CH ₂ HSGL); 3,00-4,30 (m, 565H); 5,20 (s, 1H, NH); 6,40 (s, 1H, NH); 6,70 (d, 1H, Ar HSGL, $^3J=1,1 \text{ Hz}$) ; 7,60 (d, 1H, Ar HSGL, $^3J=1,1 \text{ Hz}$).
RMN¹³C (CDCl ₃)	14,1 (2×CH ₃); 14,8 (CH ₃); 18,4 (CH ₂ HSGL) ; 22,5 (CH ₂ -CH ₃ DSPE); 23,5-36,5 (CH ₂ -CH ₂ -CO (DSPE)/ CH ₂ HSGL/CH ₂ (DSPE)/CH ₂ -CO); 40,1-43,7 (CH ₂ -NH (DSPE)/CH ₂ -NH(PEG)/CH ₂ HSGL); 60,8 (CH ₂ -CH ₃ HSGL) ; 62,1 (CH ₂ -O-C=O (PEG)); 62,9 (CH ₂ -O-C=O (DSPE)); 64,7 (CH-CH ₂ -O-P=O)/NH-CH ₂ -CH ₂ -O-P=O); 65,4 (CH HSGL) ; 68,0-73,0 ((CH ₂ -O-	14,1 (2×CH ₃); 14,7 (CH ₃); 18,3 (CH ₂ HSGL) ; 22,6 (CH ₂ -CH ₃ DSPE); 24,0-37,0 (CH ₂ -CH ₂ -CO (DSPE)/ CH ₂ HSGL/CH ₂ (DSPE)/CH ₂ -CO); 40,0-43,7 (CH ₂ -NH (DSPE)/CH ₂ -NH(PEG)/CH ₂ HSGL); 60,7 (CH ₂ -CH ₃ HSGL) ; 62,2 (CH ₂ -O-C=O (PEG)); 62,8 (CH ₂ -O-C=O (DSPE)); 64,5 (CH-CH ₂ -O-P=O)/NH-CH ₂ -CH ₂ -O-P=O); 65,2 (CH HSGL) ; 67,0-73,0 ((CH ₂ -O-

	$\text{CH}_2)_{43}/\text{CH (DSPE)/NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O);}$ 118,3 (CH HSGL) ; 136,1 (CH HSGL) ; 155,6 (NH-CO); 171,0-176,0 (C=O); 182,0 (C=S).	$\text{CH}_2)_{135}/\text{CH (DSPE)/NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O);}$ 118,2 (CH HSGL) ; 136,2 (CH HSGL) ; 155,6 (NH-CO); 170,5-176,0 (C=O); 183,0 (C=S).
--	---	--

II.5. Synthèses des précurseurs lipophiles.

➤ Acide 3-(triméthylstannyl)-benzoïque 58.

58

1 équivalent de l'acide 3-iodo-benzoïque 57 (0,32 g ; 1,27 mmol) est solubilisé dans 10 mL de dioxane anhydre. 2,4 équivalents d'hexaméthyl-distannane (1 g ; 3,1 mmol) puis 1,5% de dichlorobis(triphénylphosphine) palladium (II) (13,4 mg ; 0,19 mmol) sont ajoutés dans le ballon. Le milieu réactionnel est agité à 60°C sous azote pendant 12h.

Le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans du CHCl_3 et filtré sur célite. Le produit de la réaction 58 est obtenu après colonne chromatographique sur gel de silice (éluant : CHCl_3 /Acétone : 7/3) avec un rendement de 88% (solide blanc ; 0,32 g ; 1,11 mmol).

Eluant : CHCl_3 /Acétone : 7/3

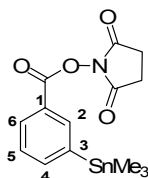
R_f = 0,38

ES⁺ : $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 308,9 **ES⁻ :** $[\text{M}-\text{H}]^-$: 284,8

RMN¹H (CDCl₃) : 0,35 (s + 2 pics satellites de Sn, 9H, 3×CH₃); 7,45 (t, 1H, CH(5), ³J=7,6 Hz); 7,74 (d, 1H, CH(4), ³J=7,3 Hz); 8,10 (d, 1H, CH(6), ³J=7,6 Hz); 8,20 (s, 1H, CH(2)); 11,00 (s, 1H, COOH).

RMN¹³C (CDCl₃) : 2,4 (CH₃); 128,2 (C₅); 129,8 (C₆); 130,4 (C₁); 137,5 (C₂); 141,1 (C₄); 141,8 (C₃); 172,0 (CO).

➤ 3-(triméthylstannyl)-benzoate de N-hydroxysuccinimidyle 59.

**59**

1 équivalent d'acide 3-(triméthylstannyl)-benzoïque **58** (0,32 g ; 1,11 mmol) est dissous dans 5 mL de CH₃CN anhydre sous atmosphère azotée. 1,5 équivalents de NEt₃ (232 μ L ; 1,65 mmol) et 2 équivalents de *N,N,N',N'*-tétraméthyl-*O*-(*N*-succinimidyl)-uronium tétrafluoroborate ou TSTU (0,67 g ; 2,2 mmol) sont ajoutés dans le ballon. Le mélange réactionnel est agité 30 min à température ambiante. Le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans du CHCl₃ et lavé 2 fois par une saumure. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis évaporée. Le mélange obtenu est purifié sur colonne chromatographique (Eluent : CHCl₃/AcOEt : 95/5). Le produit de la réaction **59** est ainsi obtenu avec un rendement de 92% (huile incolore ; 0,39 g ; 1 mmol).

Eluent : CHCl₃/AcOEt : 95/5

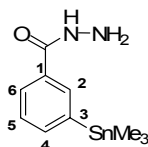
R_f = 0,7

[M+Na]⁺ : 405

RMN¹H (CDCl₃) : 0,34 (s + 2 pics satellites de Sn, 9H, 3×CH₃); 2,92 (s, 4H, 2×CH₂); 7,47 (t, 1H, CH(5), ³J=7,8 Hz); 7,79 (d, 1H, CH(4), ³J=7,2 Hz); 8,10 (d, 1H, CH(6), ³J=7,8 Hz); 8,24 (s, 1H, CH(2)).

RMN¹³C (CDCl₃) : 2,4 (CH₃); 22,4 (2×CH₂); 128,2 (C₅); 129,8 (C₆); 130,4 (C₁); 137,5 (C₂); 141,1 (C₄); 141,8 (C₃); 168,5 (2×CO); 172,0 (CO).

➤ **3-(triméthylstannyl)benzohydrazide 60.**

**60**

1 équivalent de 3-(triméthylstannyl)-benzoate de *N*-hydroxysuccinimidyle **59** (0,12 g ; 0,32 mmol) est solubilisé dans 5 mL de CH₃CN anhydre sous azote. 1,5 équivalents de NEt₃ (67 μ L ; 0,48 mmol) puis 4 équivalents de NH₂-NH₂.H₂O (15,5 μ L ; 0,32 mmol) sont ajoutés dans le ballon. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante durant 1h.

Un précipité blanc se forme au cours de la réaction. Ce précipité est filtré. Le filtrat est évaporé. Le produit de la réaction **60** est purifié sur colonne chromatographique (Eluant : $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$: 95/5) avec un rendement quantitatif (95,6 mg ; 0,32 mmol).

Eluant : $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$: 95/5

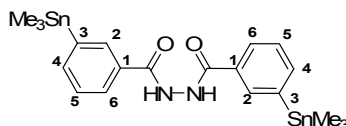
R_f = 0,3

[M+H]⁺ : 299 ; **[M+Na]⁺** : 323

RMN¹H (CDCl₃) : 0,30 (s + 2 pics satellites de Sn, 9H, 3×CH₃); 2,79 (s, 2H, NH₂); 7,38 (t, 1H, CH(5), ³J=7,6 Hz); 7,62 (m, 1H, CH(4)); 8,10 (m, 1H, CH(6)); 7,90 (s, 1H, CH(2)); 7,95 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (CDCl₃) : -9,5 (CH₃); 127,1 (C₅); 128 (C₆); 130,8 (C₁); 134,4 (C₂); 139,7 (C₄); 143,3 (C₃); 165,3 (CO).

➤ **Di-*N,N'*-1,2-(3-(triméthylstannyl)benzo)-hydrazide **54**.**



54

1 équivalent de 3-(triméthylstannyl)benzohydrazide **60** (43 mg ; 0,14 mmol) et 2 équivalent de NEt_3 (40,4 μL ; 0,28 mmol) sont mis en solution dans 2 mL de CHCl_3 anhydre. 1 équivalent de 3-(triméthylstannyl)-benzoate de *N*-hydroxysuccinimidyle **59** (55,3 mg ; 0,14 mmol) en solution dans 2 mL de CHCl_3 est ensuite additionné au mélange réactionnel. La réaction est agitée 1h à température ambiante.

Le solvant est concentré. Le produit **54** est enfin purifié sur colonne chromatographique (Eluant : CHCl_3 : 100) avec un rendement de 95% (75 mg ; 1,33 mmol).

Eluant : CHCl_3 : 100

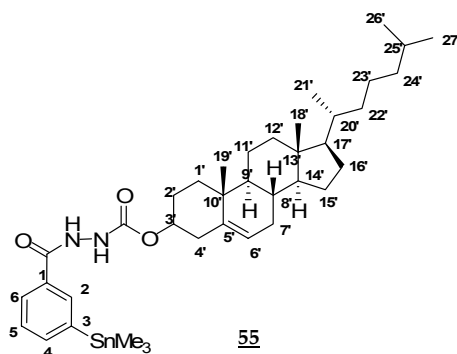
R_f = 0,5

[M+H]⁺ : 566 ; **[M+Na]⁺** : 589

RMN¹H (CDCl₃) : 0,31 (s + 2 pics satellites de Sn, 18H, 6×CH₃); 7,35 (t, 2H, CH(5), ³J=7,3 Hz); 7,64 (d, 2H, CH(4), ³J=7,6 Hz); 7,80 (d, 2H, CH(6), ³J=7 Hz); 8,00 (s, 2H, CH(2)); 9,80 (s, 2H, NH).

RMN¹³C (CDCl₃) : -9,45 (CH₃); 127,1 (C₅); 128,0 (C₆); 130,8 (C₁); 134,4 (C₂); 139,7 (C₄); 143,3 (C₃); 155,9 (CO); 164,9 (CO).

➤ ***N*-(3-(triméthylstannyl)benzo)-*N'*-(cholestéryl carbamate)-hydrazide 55.**



1 équivalent de 3-(triméthylstannyl)benzohydrazide 60 (0,97 g ; 0,32 mmol) est mis en solution dans 5 mL de CHCl_3 en présence de 1,5 équivalents de NEt_3 (67 μL ; 0,48 mmol). 0,9 équivalent de cholestéryl chloroformate 61 (0,13 g ; 0,29 mmol) dans 5 mL de CHCl_3 est ajouté dans le ballon. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2h.

Le solvant est évaporé. Le résidu est recristallisé dans l'acétone. Le solide est filtré et rincé avec de l'acétone à 0°C. On obtient ainsi le produit 55 pur avec un rendement de 97% (solide blanc ; 0,2 g ; 0,28 mmol).

Eluant : CHCl_3 : 100

R_f = 0,65

[M+H]⁺ : 711 ; **[M+Na]⁺** : 735

RMN¹H (CDCl₃) : 0,43 (s + 2 pics satellites de Sn, 9H, 3×CH₃); 0,68 (s, 6H, CH₃(26'/27')); 0,80-2,10 (m, 36H); 2,40 (m, 2H, CH₂(4')); 4,70 (m, 1H, CH(3')); 5,40 (d, 1H, CH(6'), ³J=4,87 Hz); 7,40 (m, 1H, CH(5)); 7,70 (m, 2H, CH(4)/CH(6)); 7,90 (s, 1H, CH(2)); 7,96 (s, 2H, NH).

RMN¹³C (CDCl₃) : -8,9 (CH₃); 19,5-51,0 (C_{cholestéryl}); 122,0 (C_{6'}); 126,7 (C_{5'}); 127,1 (C₅); 128,0 (C₆); 130,8 (C₁); 134,4 (C₂); 139,7 (C₄); 143,3 (C₃); 165,3 (CO).

RADIOMARQUAGE ET VECTORISATION DE NANOCAPSULES LIPIDIQUES POUR DES APPLICATIONS EN RADIOIMMUNOTHERAPIE DES CANCERS.

La radioimmunothérapie (RIT) est limitée dans certains cas par la faible dose délivrée à la tumeur par des anticorps ou des haptènes. Afin d'augmenter la dose délivrée, les nanocapsules lipidiques (LNC) peuvent vectoriser des radionucléides avec une activité spécifique plus importante et peuvent être utilisées dans un système en deux temps, par l'insertion au niveau de membrane de différents haptènes et par l'utilisation d'anticorps bispécifiques anti-tumeur×anti-haptène. Le radiomarquage des LNC peut être réalisé de deux manières différentes: soit par incorporation au niveau du cœur lipidique de molécules lipophiles radiomarquées; soit par insertion au niveau de la membrane de complexes hydrophiles stables. Afin d'augmenter le temps de circulation des LNC, des "constructs" poly(éthylène glycol) ont été synthétisés (DSPE-PEG-haptènes, DSPE-PEG-BCA et DSPE-PEG-BH). La faisabilité des différents radiomarquages des LNC au ^{99m}Tc , ^{111}In et ^{125}I a été démontrée au cours de cette thèse.

Mots clés : Nanocapsules lipidiques, radioimmunothérapie, poly(éthylène glycol), radionucléides, anticorps bispécifiques, radioimmunoconjugué, agent chélatant bifonctionnel, précurseurs lipophiles.

RADIOLABELING AND TARGETING OF LIPIDIC NANOCAPSULES FOR APPLICATIONS IN RADIOIMMUNOTHERAPY OF CANCERS.

Radioimmunotherapy (RIT) is limited in some cases by the low radioactive doses delivered to tumor cells by antibodies or pretargeted haptens. In order to increase this dose, lipidic nanocapsules (LNC) are proposed as radionuclide vectors that could be targeted to cancer cells by a bispecific anti-tumour×anti-hapten antibody after incorporation of different haptens in the LNC membrane. The LNC radiolabeling can be performed on the core with lipophilic molecules or on LNC shell with hydrophilic complexes. In order to increase the residence time in blood, different "constructs" have been synthesized (DSPE-PEG-haptens, DSPE-PEG-BCA, and DSPE-PEG-BH). The feasibility of different radiolabeling with ^{99m}Tc , ^{111}In and ^{125}I have been demonstrated in this thesis.

Keywords: Lipidic nanocapsules, radioimmunotherapy, poly(ethylene glycol), radionuclides, bispecific antibody, radioimmunoconjugate, bifunctional chelating agent, lipophilic precursors.