

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Chimie organique – Radiochimie

Par

Marion BERDAL

**Exploration de nouvelles voies de radiomarquage avec l'astate-211
sous forme nucléophile : application à la préparation de
radioimmunoconjugués pour la thérapie alpha vectorisée des cancers**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 20 Novembre 2020

Unité de recherche : CRCINA, UMR 1232 Inserm, ERL 6001 CNRS

Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Marie-Pierre Heck Directrice de Recherche – Université Paris-Saclay – CEA

Jean-Michel Chezal Professeur d'Université – Université Clermont Auvergne, UMR 1240 Inserm

Composition du Jury :

Président : Catherine Ghezzi Directrice de Recherche – LRB, UMR 1039 Inserm

Examineur : Yann Seimbille Assistant Professeur – University Medical Center Rotterdam – ERASMUS MC

Co-encadrant : François Guérard Chargé de Recherche – CRCINA, UMR 1232 Inserm, ERL 6001 CNRS

Dir. de thèse : Jean-François Gestin Directeur de Recherche – CRCINA, UMR 1232 Inserm, ERL 6001 CNRS

The Show Must Go On

Queen – 1991

Remerciements

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements :

Au Dr. Marie-Pierre Heck et au Pr. Dr. Jean-Michel Chezal pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse.

Aux autres membres du jury, Dr. Catherine Ghezzi et Dr. Yann Seimbille pour avoir accepté de juger mon travail.

A mon directeur de thèse Jean-François Gestin pour m'avoir encadré tout au long de cette thèse. Tes conseils m'ont été d'une aide précieuse, aussi bien sur le plan professionnel que personnel. J'espère avoir réussi à suffisamment maîtriser les trois S pour te rendre fier ! Je n'oublierais jamais ces nombreuses conversations sur la musique et j'attends le premier concert des Nobody Knows avec impatience !

A mon encadrant de thèse François Guérard pour son encadrement sans faille dans ce projet. Tu as su être là quand il le fallait et les conseils que tu m'as prodigués étaient toujours pertinents et d'une grande aide. Grâce à la confiance et l'indépendance que tu m'as accordée, j'ai pu gagner en autonomie et mener mon travail comme je le voulais, ce qui m'a aidé à avoir plus confiance en moi. Je suis sortie de cette expérience grandie et c'est en très grande partie à toi que je le dois et je tiens à te remercier encore pour ça.

A Françoise Kraeber-Bodéré et à Michel Chérel pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe de recherche. Merci Michel pour toutes ces conversations scientifiques toujours très enrichissantes.

A Joëlle Gaschet, Séverine Marionneau-Lambot et Sébastien Gouard pour avoir réalisé les manip *in vivo* qui ont apportées un réel plus à mon projet. Merci pour votre disponibilité, votre patience et pour vos explications sur l'univers des biodistributions. Je tiens à rajouter Yannick Guilloux dans ces remerciements qui a également répondu présent lorsque j'avais des questions sur la biologie. Grâce à vous tous, j'ai pu découvrir certains aspects de cette science avec laquelle je n'étais pas familière et que je trouve très intéressante.

A Alain Faivre-Chauvet. Tu as toujours su te rendre disponible et accessible pour expliquer les choses, avec toute la patience nécessaire et toujours dans la bonne humeur. Merci à également à Patricia Remaud-Le-Saec pour sa bonne humeur qui contribue à apporter une si bonne ambiance dans l'équipe. Merci à Marie Mougin-Degraef pour sa gentillesse. Ce fût un plaisir d'apprendre la technique de dialyse à tes côtés.

A toute l'équipe d'Arronax pour avoir fourni l'astate-211 et sans qui ce sujet de thèse n'aurait pas pu être possible.

A Stéphanie Olivo et à Cindy Maillason pour toute la partie administrative. Vous avez toujours été à l'écoute et prête à m'expliquer les choses avec gentillesse et patience, merci pour ça.

A tous les membres de l'équipe 13 du CRCINA. L'ambiance bienveillante de cette équipe m'a permis de réaliser ma thèse dans les meilleures conditions possibles.

A mes compagnons de laboratoire. Les soirées passées ensemble resteront à jamais dans ma mémoire, particulièrement ce laser game surprise qui était formidable. Je commence par remercier les biologistes avec Justine Perrin, Marisa Capitao, Cassandra Métivier et Anne Lise Maubert. Justine, merci de m'avoir fait découvrir la Fabrik à Jeu. Je me souviendrai de ces parties de Harry Potter autour d'une bonne Bièraubeurre qui étaient littéralement magique.

A Benjamin Le Crom pour ses conversations sur la physique, les cours sur les effets relativistes et bien évidemment ses boutades. C'était vraiment agréable de parler avec quelqu'un d'aussi passionné.

A Anne-Sophie Navarro pour les longues conversations sur des sujets variés, allant de 2001 l'Odyssée de l'espace à la musique de campagne de Jacques Chirac, pour les parties de tarot, les conseils cinématographiques et j'en passe... Ce fût également un véritable plaisir d'être ton cobaye pour tes diapos de cours pour les podologues. Et longue vie au Tatou !

A tous mes collègues chimistes. Une équipe de rêve avec qui il était toujours agréable de travailler, chacun n'hésitant pas à apporter son aide aux autres, le tout dans la meilleure des ambiances possible. Merci à Mathilde Ligeour, avec qui je n'ai passé que peu de temps mais qui fût tout de même très appréciable. Merci à Clémence Maingueneau pour sa bonne humeur et sa sympathie. C'était toujours agréable de discuter avec toi pendant ces fameuses pauses goûtées que tu as eu la bonne idée d'instaurer. Merci à Ludovic Le Saux, qui était un camarade de laboratoire formidable et grâce à qui nous avons pu passer des soirées mémorables grâce à ses idées et à son goût pour les organiser. Ludovic, c'est à toi que je lègue la lourde responsabilité de perpétuer la tradition des blagues et des calambours dans le laboratoire. Je sais que tu feras un excellent travail, jeune padawane.

Un remerciement tout particulier à mon partenaire de soirée astate, Romain Eychenne. Toujours prêt à rendre service, toujours de bon conseil, même si tu ne sais pas apprécier le métal finlandais à sa juste valeur, je te pardonne. Les soirées astate qui vont jusqu'au bout de la nuit en ta compagnie resteront mémorables avec des playlists d'anthologies, allant des musiques les plus absurdes jusqu'aux meilleures jamais créées, sans oublier le Patrick Sébastien pour fêter mon

anniversaire dès minuit entre deux radiomarquages. Ces moments feront partis des meilleurs souvenirs de ma thèse et je te remercie pour ça.

A Laurent Navarro, mon autre partenaire de soirée astate qui a toujours su se montrer disponible, toujours de bon conseil et de qui j'ai beaucoup appris. Tu as participé à mon évolution en m'apprenant à avoir plus confiance en moi et pour ça, tu as toute ma reconnaissance. J'ai apprécié toutes les conversations qu'on a pu avoir, que ce soit sur les mangas, sur la physique ou encore sur l'espace, qui étaient plus que passionnantes.

Je remercie également l'équipe Suédoise qui m'a accueilli au sein de son laboratoire et tout particulièrement Sture Lindegren et Emma Aneheim qui se sont montrés à l'écoute et prêt à m'aider pour que je puisse dompter le module de radiosynthèse. Ces deux mois passés là-bas étaient absolument formidables et je ne les oublierai jamais. Un remerciement spécial à Emma Linden pour les cours de suédois pendant les pauses déjeunées qui étaient très amusants.

Je souhaite également remercier le groupe Queen pour avoir créé des chansons qui m'ont permis de tenir en soirée astate qui m'ont donné la motivation et l'inspiration nécessaire à l'écriture de ce manuscrit.

Je remercie naturellement mes amis, notamment Camille Hautois qui m'a toujours soutenu. Les sorties qu'on a pu faire le week-end ou encore les après-midi jeux vidéo en ta compagnie m'ont permis de décompresser et donc un grand merci pour ça. Je tiens également à remercier Féfé qui a toujours été là. Par sa simple conversation, elle me permettait de me détendre, de penser à autre chose et cela a été d'une grande aide.

C'est tout naturellement que je fini ces remerciements avec ma famille qui m'a toujours aidé et soutenu. Je les remercie d'avoir trouvé le temps d'assister à ma soutenance. Votre présence à tous, même par visio, m'a beaucoup touchée. J'ai également une pensée pour ceux qui nous ont quitté et j'espère qu'ils sont fiers de moi, quelque part.

Table des matières

Liste des abréviations	
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	1
I. La vectorisation immunologique au service de la médecine nucléaire	2
I.1. Le choix du radionucléide.....	3
I.2. Les vecteurs immunologiques	6
I.2.1. Les anticorps.....	6
I.2.2. Les vecteurs immunologiques dérivés des anticorps.....	8
I.3. Le ciblage tumoral	9
I.3.1. Le ciblage direct.....	10
I.3.2 Le pré-ciblage	10
I.4. Utilisation des anticorps en radioimmunothérapie et en imagerie	11
I.4.1. Les anticorps en imagerie.....	12
I.4.2. Les anticorps en RIT.....	13
II. L'astate-211, un choix prometteur pour la thérapie alpha vectorisée	16
II.1. Propriétés physiques de l'astate-211	16
II.2. Méthodes de production de l'astate-211	18
II.2.1. Bombardement d'une cible de bismuth-209 par des particules alpha	18
II.2.1.1. Purification par voie sèche	19
II.2.1.2. Purification par voie humide	19
II.2.2. Les générateurs d'astate-211.....	20
II. 3. Propriétés chimiques de l'astate	20
II.3.1. Les effets relativistes et leurs influences sur les propriétés de l'astate.....	20
II.3.2. L'apport de la chimie théorique dans l'étude de l'astate	23
II.3.3. Nature des liaisons formées par l'astate.....	23
II.3.4. Les différentes espèces chimiques de l'astate	26
II.4. Propriétés biologiques de l'astate.....	27

II.5. Utilisation de l'astate-211 en thérapie alpha vectorisée	29
II.5.1. Etudes <i>in vitro</i>	29
II.5.2. Etudes précliniques	29
II.5.3. Essais cliniques	32
III. Chimie de radiomarquage à l'astate-211	34
III.1. Les méthodes actuelles de radiomarquage à l'astate-211.....	34
III.1.1. Formation de liaisons Carbone(sp ²)-Astate.....	35
III.1.1.1. Substitution électrophile aromatique directe.....	35
III.1.1.2. Sel de diazonium	35
III.1.1.3. Echange d'halogène	37
III.1.1.4. Halogénodémétallation électrophile	39
III.1.1.5. Sels d'iodonium	42
III.1.1.6. Les dérivés du bore	45
III.1.1.7. L'utilisation du SAB dans le radiomarquage de protéines	47
III.1.2. La liaison Bore-Astate.....	50
III.1.3. Complexes métalliques	51
III.1.4. La chimie de chélation de l'astate	54
III.2. Limites actuelles des radiomarquages d'anticorps à l'astate.....	56
RESULTATS ET DISCUSSIONS	60
Introduction du sujet de recherche	61
1. Exploration de nouvelles classes de précurseurs pour le radiomarquage à l'astate-211 et à l'iode-125 par substitution nucléophile	62
2. Mise au point d'une méthode de radiomarquage d'anticorps en une étape par halodéboronation nucléophile.....	65
I. Exploration de nouvelles classes de précurseurs pour le radiomarquage à l'astate-211 et à l'iode-125 par substitution nucléophile.....	66
I.1. Synthèses des précurseurs modèles	67
I.1.1. Précurseurs soufrés.....	67

I.1.2. Précurseurs iodés	68
I.2. Radiomarquages et comparaison des différentes classes de précurseurs	69
I.2.1. Comparaison des différents précurseurs	69
I.2.2. Conclusions.....	76
I.3. Optimisation du radiomarquage <i>via</i> les sels de triarylsulfonium sur le composé modèle	76
I.4. Investigation du radiomarquage à l'astate-211 <i>via</i> les ylures d'aryliodonium	80
I.4.1. Optimisation du radiomarquage à l'astate-211 du composé modèle	80
I.4.2. Variation des substituants.....	85
I.4.2.1. Synthèse des précurseurs.....	85
I.4.2.2. Radiomarquage des précurseurs à l'astate-211.....	88
I.4.2.3. Conclusion sur les ylures d'aryliodonium.....	89
I.5. Optimisation du radiomarquage <i>via</i> les acides arylboroniques.....	90
I.6. Conclusion	91
II. Mise au point d'une méthode de radiomarquage d'anticorps en une étape par halodéboronation nucléophile	93
II.1. Mise au point sur un composé modèle	93
II.2. Radiomarquage d'anticorps pré-modifiés par des acides boroniques	101
II.2.1. Modification des anticorps.....	101
II.2.2. Radiomarquage de l'anticorps anti-CD22	103
II.2.3. Radiomarquage de l'IgG 9E7.4	110
II.3. Etudes biologiques	119
II.3.1. Immunoréactivité	119
II.3.2. Etudes de biodistribution	120
II.4. Automatisation du procédé de radiomarquage.....	125
II.4.1. Adaptation manuelle du procédé de radiomarquage à l'automatisation.....	126
II.4.2. Transfert de la procédure sur l'automate de synthèse.....	128
II.5. Conclusion	131
CONCLUSION GENERALE.....	133

PARTIE EXPERIMENTALE	140
I. Synthèse organique	141
I.1. Informations générales	141
I.2. Synthèses organiques.....	142
I.2.1. Composés auxiliaires	142
I.2.2. Diarylthioéther	145
I.2.3. Biarylsulfoxyde	146
I.2.4. Biarylsulfone.....	147
I.2.5. Sel de triarylsulfonium.....	148
I.2.6. Sel de biaryliodonium	149
I.2.7. Ylures d'aryliodonium.....	150
I.2.8. Acide arylboronique	157
II. Radiochimie	158
II.1. Informations générales	158
II.1.1. Isotopes radioactifs	158
II.1.2. Analyses chromatographiques	158
II.2. Radiomarquages à l'iode-125 et à l'astate-211 des composés organiques	159
II.2.1. Comparaison des différents précurseurs	159
II.2.1.1. Méthode générale avec K222/K ₂ CO ₃ sans catalyseur	159
II.2.1.2. Méthode générale avec K222/K ₂ CO ₃ avec catalyseur	160
II.2.1.3. Méthode générale sans K222/K ₂ CO ₃ sans catalyseur	160
II.2.1.4. Méthode générale sans K222/K ₂ CO ₃ avec catalyseur	160
II.2.2. Radiomarquage de l'acide 4-chlorobenzène boronique 6.....	161
II.2.2.1. Radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 de l'acide 4-chlorobenzène boronique 6 en milieu organique.....	161
II.2.2.2. Radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 de l'acide 4-chlorobenzène boronique 6 en milieu aqueux	161

II.2.2.3. Exemples d'analyse HPLC de ^{125}I -radioiodation et de ^{211}At -astatation de l'acide 4-chlorobenzène boronique	161
II.2.3. Radiomarquage des sels de biaryliodonium 41 et 42 pour le marquage du 9E7.4 en deux étapes	162
II.2.3.1. Radiomarquage à l'iode-125 du triflate de 3-(succinimidylloxycarbonyl)phényl(2-thiényl)iodonium (42)	162
II.2.3.2. Radiomarquage à l'astate-211 du triflate de 3-(succinimidylloxycarbonyl)phényl(4-méthoxyphényl)iodonium (41)	163
II.3. Radiomarquage d'anticorps	163
II.3.1. Bioconjugaison de l'acide (3-(((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)phényl)boronique (40) sur les anticorps	163
II.3.2. Analyse LC-ESI-HRMS	163
II.3.3. Radiomarquage à l'iode-125 de l'anti-CD22-AB	164
II.3.4. Radiomarquage à l'astate-211 de l'anti-CD22-AB	165
II.3.5. Radiomarquage à l'iode-125 du 9E7.4-AB	165
II.3.6. Radiomarquage à l'astate-211 du 9E7.4-AB	165
II.3.7. Radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 du 9E7.4 <i>via</i> la méthode en deux étapes	166
III. Immunoréactivités	167
IV. Etudes <i>in vivo</i>	168
IV.1. Etudes de biodistributions	168
IV.2. Analyses statistiques	168
V. Automatisation	169
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	170
ANNEXE	205

Liste des abréviations

AB : Acide arylBoronique

ACN : acétonitrile

AcOH : Acide acétique

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AES : Affinity Enhancement System

A_m : activité molaire

Ar : Aromatique

ARN : Acide RiboNucléique

A_s : activité spécifique

Bq : becquerel

Bn : benzyle

BSA : Bovin Serum Albumin

cal : Calorie

CCM : Chromatographie sur couche mince

CE : Capture électronique

CI : Conversion interne

Da : Dalton

DIPE : Ether diisopropylique

DIBAC : Dibenzoazacyclooctyne

DMF : *N,N*-diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DOTA : Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique

DTPA : Acide diéthylènetriaminepentacétique

DTT : Dithiothréitol

e⁻ : électron

EBR : Effet Biologique Relatif

EDCI : 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

ESI : Ionisation par Electronébulisation

ET : Etat de Transition

eV : électronVolt

Fab : Fragment d'anticorps

FDG : [¹⁸F]fluoro-déoxyglucose

FIR : Fraction ImmunoRéactive

Gly-Gly : Glycylglycine

Gy : Gray

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

HSAB : Hard and Soft Acids and Basis

Hz : Hertz

ICP – AES : Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy

ICP – MS : Inductively Coupled Plasma – Mass Spectroscopy

Ig : Immunoglobuline

IgG : Immunoglobine G

IMPY : 6-iodo-2-(4'-diméthylamino)phénylimidazo[1,2-*a*]pyridine

IR : Infra Rouge

ITLC-SG : Instant Thin Layer Chromatography-Silica Gel

K222 : Kryptofix K222

LNH : Lymphome Non Hodgkinien

mAb : Anticorps monoclonal

MABG : MetaAstatobenzylGuanidine

*m*CPBA : Acide métachloroperbenzoïque

Me : méthyle

MeOH : Méthanol

MES : acide 2-(*N*-morpholino)éthanosulfonique

MOPS : acide 3-morpholino-1-propanesulfonique

n : nombre d'expériences

NCS : *N*-chlorosuccinimide

NHS : *N*-hydroxysuccinimide

NIS : *N*-iodosuccinimide

NOTA : Acide 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique

NTA : Acide 2,2',2''-nitrilotriacétique

Ox : oxydant

PBS : Tampon Phosphate Salin

PEEK : PolyEtherEtherKetone

pH : Potentiel Hydrogène

ppm : partie par million

PSMA : Prostate-Specific Membrane Antigen

Rdt : Rendement

RIT : RadiolImmunoThérapie

RIV : Radiothérapie Interne Vectorisée

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS : Reactive Oxygen Species

RRC : Rendement RadioChimique

RX : Rayon X

SAB : Astatobenzoate de succinimidyle

SAGMB : 3-astato-4-guanidinométhylbenzoate de *N*-succinimile

SAPC : 5-astato-3-pyridinecarboxylate de *N*-succinimidyle

SAPS : *N*-(4-astatophénéthyl)succinimate de *N*-succinimidyle

SIB : Iodobenzoate de succinimidyle

S_NAr : Substitution nucléophile aromatique

S_EAr : Substitution électrophile aromatique

ScFv : Single-chain variable Fragment

T.A. : Température Ambiante

TCEP : Tris(2-carboxyéthyl)phosphine

TDM : Tomo-DensitoMétrie

TEL : Transfert d'Energie Linéique

TEMP : Tomographie par Emission Monophotonique

TEMPO : (2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)oxy

TEP : Tomographie par Emission de Positons

TFA : Acide Trifluoroacétique

TfOH : Acide Triflique

TsOH : Acide *paratoluènesulfonique*

Tris : 2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol

$t_{1/2}$: Temps de demi-vie

UV : Ultra-Violet

VSEPR : Valence Shell Electron Pair Repulsion

Introduction Bibliographique

I. La vectorisation immunologique au service de la médecine nucléaire

Il y a plus d'un siècle, Paul Ehrlich établit le concept de « magic bullet », qui consiste à traiter une maladie par l'association d'un agent thérapeutique avec une molécule capable de cibler spécifiquement la pathologie. Ce concept a inspiré le principe de la vectorisation, qui repose sur l'utilisation de médicaments radioactifs, appelés radiopharmaceutiques et qui peut être utilisée à des fins diagnostiques ou thérapeutiques. Ces médicaments sont dans certains cas composés uniquement d'un radionucléide qui est capable de s'acheminer de lui-même jusqu'à sa cible. L'iode en est le parfait exemple, car il s'accumule naturellement dans la thyroïde. Cette propriété a pu être exploitée dans le cadre de pathologies liées à cet organe pour l'établissement d'un diagnostic (iode-123), ainsi qu'à des fins de traitement (iode-131). Cependant, la plupart des radionucléides requièrent d'être liés à une molécule vectrice afin d'atteindre leur cible. De nombreux types de vecteurs ont fait l'objet d'études. Certaines recherches sont portées sur des vecteurs de type colloïdes¹. D'autres sur l'utilisation de peptides capables de reconnaître des récepteurs présents à la surface de cellules tumorales². Dans cette catégorie, la somatostatine et ses dérivés ont largement été étudiés. Un autre axe se base sur l'accélération de l'activité des cellules cancéreuses qui entraîne une surconsommation de certaines molécules, telles que des acides aminés ou encore le glucose. C'est pourquoi ils sont apparus comme des vecteurs potentiels. La [¹¹C]méthylméthionine est un aminoacide utilisé pour le diagnostic³. Mais le plus répandu de tous les traceurs à ce jour est un dérivé du glucose, le [¹⁸F]fluoro-déoxyglucose ([¹⁸F]FDG).

La vectorisation immunologique s'intéresse aux vecteurs issus du système immunitaire, comme les anticorps. Leur capacité à reconnaître des récepteurs surexprimés à la surface des cellules cancéreuses en font des candidats de choix pour l'imagerie et la thérapie vectorisée. Les développements technologiques, la création de nouveaux vecteurs immunologiques toujours plus adaptés et l'amélioration des procédures pour leur administration a permis l'optimisation des traitements ainsi que l'obtention d'images de meilleure résolution.

Pour que le radiopharmaceutique soit le plus efficace possible, il se doit d'être capable de se fixer de façon très précise sur la tumeur ou l'organe cible afin de visualiser ou de traiter la pathologie tout en limitant au maximum l'irradiation sur les tissus sains. Dans l'objectif de se rapprocher au plus d'une efficacité optimale, le choix du couple vecteur/radionucléide est primordial.

I.1. Le choix du radionucléide

Afin qu'un radionucléide soit jugé d'intérêt potentiel pour la médecine nucléaire, il doit remplir un certain nombre de critères. Tout d'abord son temps de demi-vie, c'est-à-dire le temps au bout duquel la moitié de ses noyaux s'est désintégrée, doit être suffisamment long afin de permettre la préparation du radiopharmaceutique, son injection et son acheminement jusqu'à sa cible, mais également suffisamment court pour éviter l'irradiation des tissus sains sur le long terme. La nature du noyau formé suite à la désintégration (appelé noyau fils), doit de préférence être stable afin d'assurer une meilleure radioprotection. La demi-vie du radionucléide doit être également adaptée à la demi-vie du vecteur. Si un vecteur a une pharmacocinétique lente, on lui préférera des radionucléides aux temps de demi-vie plus long. Un dernier critère est sa disponibilité. Il doit être facilement accessible afin de permettre une application en routine. Si un radionucléide remplit tous ces critères, son utilisation dépendra de son mode de désintégration. En effet, il en existe plusieurs sortes (figure 1) :

Les rayonnements γ :

Ce sont des ondes électromagnétiques produites lors de la désexcitation d'un noyau radioactif. D'énergies pouvant varier entre quelques keV et plusieurs MeV, ce sont ceux de plus basse énergies qui sont intéressants en médecine nucléaire. Ils sont également extrêmement pénétrants et ne peuvent être stoppés que par des matériaux très épais ou denses, tels que le plomb.

Les rayonnements β^+ :

Ces rayonnements correspondent à l'émission d'une particule β^+ , également appelée positon, qui est l'antiparticule de l'électron, c'est-à-dire qu'elle possède la même masse et le même spin que ce dernier, mais une charge opposée. Les particules β^+ émises lors de la désintégration du noyau s'annihilent lorsqu'elles rencontrent un électron libre ou faiblement lié, provoquant l'émission de deux rayonnements γ de directions opposées et d'une énergie de 511 keV chacun.

Les rayonnements β^- :

Les particules β^- possèdent la même masse et la même charge qu'un électron. Ce rayonnement est très peu pénétrant, pouvant aller de quelques centaines de micromètres à quelques millimètres seulement, et des matériaux denses fins, tels qu'une feuille d'aluminium, suffisent à l'arrêter. L'énergie d'ionisation de ces particules augmente au fur et à mesure de sa trajectoire, qui est rectiligne dans un premier temps, puis devient aléatoire.

Les rayonnements α :

Les particules α correspondent à des noyaux d'hélium (${}^4_2\text{He}$). Ce type de radioactivité est observé principalement chez les atomes lourds. Les rayonnements sont très peu pénétrants, allant de quelques dizaines à une centaine de micromètres, mais leur énergie d'ionisation est encore plus importante que pour les particules β^- (4 à 10 MeV).

L'émission par électron Auger :

Deux phénomènes peuvent résulter de l'émission d'un électron Auger. Le premier est la capture électronique (CE), qui correspond à la capture d'un électron périphérique par le noyau de l'atome. Le second est la conversion interne (CI) qui se produit lorsqu'un excès d'énergie du noyau est transmis à un électron périphérique, entraînant son expulsion. Suite à ces deux phénomènes, le cortège électronique se réarrange, émettant alors un électron Auger ou des rayons X. Ces émetteurs sont extrêmement peu pénétrants.

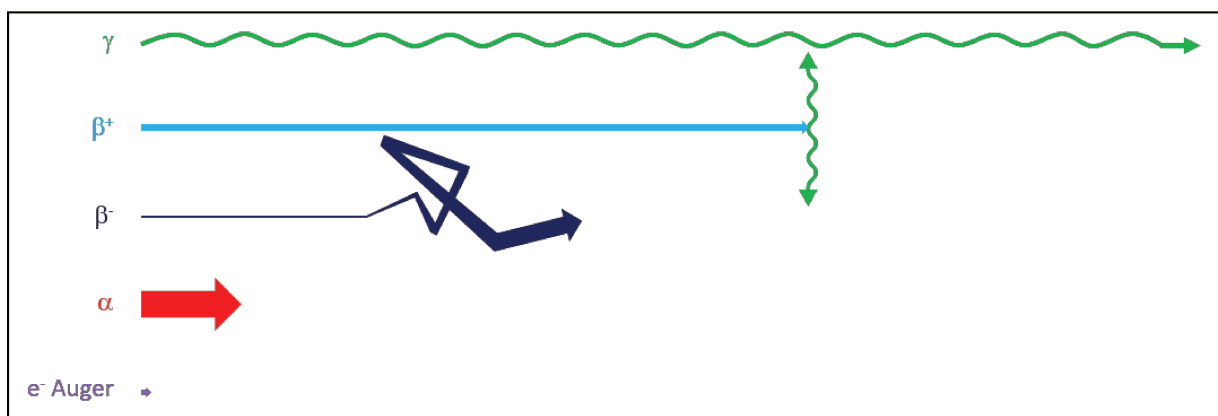


Figure 1. Les différents types d'émissions radioactives.

Afin d'utiliser la radioactivité dans le cadre de la médecine nucléaire, il convient d'associer le bon type d'émission à l'application souhaitée. Les émissions très peu pénétrantes et fortement ionisantes sont utilisées à des fins thérapeutiques en thérapie interne. On retrouve dans cette catégorie les émetteurs β^- , α et les électrons Auger. La forte énergie de ces émissions peut provoquer, entre autre, la cassure de brins d'ADN (simple cassure dans le cas des rayonnements β^- et double cassure dans le cas des rayonnements α et des électrons Auger), dont l'accumulation peut entraîner la mort des cellules. A ces effets directs s'ajoutent des effets indirects des rayonnements ionisants, principalement médiés par la radiolyse de l'eau présente dans les cellules, engendrant des espèces oxydantes également délétères pour la survie cellulaire. Les émetteurs β^- , étant les plus pénétrants, et ayant une énergie d'ionisation plus grande au fur et à mesure qu'ils s'éloignent, ils sont utilisés pour le traitement de tumeurs plus volumineuses. Les particules alpha sont beaucoup moins pénétrantes,

mais plus fortement ionisantes. Elles ont alors un transfert d'énergie linéique (TEL)^a bien plus élevé (TEL compris entre 0,1 et 1 keV/μm pour les particules β contre 50-230 keV/μm pour les α⁴). Ces particules sont plus adaptées pour le traitement de petites tumeurs isolées. Quant aux électrons Auger, ils possèdent une énergie d'ionisation parfois très faible, mais leur faible taux de pénétration leur confère un TEL très élevé (4 à 26 keV/μm⁴). Cependant, cela limite leur utilisation à des cas où le radionucléide peut être acheminé au plus proche de l'ADN présent dans le noyau de la cellule.

Pour l'imagerie, les émetteurs γ de faibles énergies et β⁺ sont utilisés. Leur basse énergie et leur fort taux de pénétration permet de les détecter à l'aide d'appareils depuis l'extérieur du patient, en limitant l'impact sur les tissus de l'organisme, permettant de visualiser l'emplacement des tumeurs. Une première technique pour visualiser les rayonnements γ est la scintigraphie. Elle repose sur l'utilisation de gamma-caméras, également appelées caméra de scintillation et permet d'obtenir une image en deux dimensions. Reposant sur le même principe, la tomographie par émission monophotonique (TEMP) a ensuite vu le jour. La caméra effectue une rotation autour du patient, permettant d'obtenir des images en trois dimensions. Les énergies d'émissions γ en TEMP sont généralement comprises entre 100 et 400 keV.

Une troisième technique d'imagerie existe, la tomographie par émission de positons (TEP). Celle-ci est basée sur les photons γ émis lors de l'annihilation des rayonnements β⁺. En effet, ils sont de faibles énergies (511 keV) et sont orientés de façon opposée. Ils peuvent alors être détectés par une couronne de détection autour du patient. La détection simultanée de deux photons par deux détecteurs diamétralement opposés permet de localiser l'emplacement de la tumeur. La résolution de l'image obtenue est d'autant meilleure que l'énergie émise par le positon est faible, car le trajet parcouru par la particule avant son annihilation avec un électron sera plus court.

De nombreux radionucléides ont été investigués pour les différentes applications (tableau 1). L'un des premiers à avoir été utilisé en médecine nucléaire est l'iode-131, pour le traitement du cancer de la thyroïde. On peut également citer le fluor-18, aujourd'hui largement utilisé en imagerie TEP.

^a Le transfert d'énergie linéique correspond à l'énergie transférée par une particule ionisante traversant la matière par unité de distance. Elle est exprimée en keV/μm

Tableau 1. Exemples de radionucléides d'intérêts pour la médecine nucléaire.

Radionucléide	$t_{1/2}$	Type d'émission	$E_{\max}$ (MeV)	Application
Technétium-99m	6,01 h	γ	0,14	Scintigraphie
Iode-123	13,2 h	γ	0,16	Scintigraphie
Fluor-18	1,83 h	β^+	0,63	TEP
Cuivre-64	12,7 h	β^+	0,65	TEP
Iode-131	8,02 j	β^-	0,61	Thérapie
Lutétium-177	6,65 j	β^-	0,50	Thérapie
Yttrium-90	64,1 h	β^-	2,3	Thérapie
Bismuth-213	45,6 min	α	8,4	Thérapie
Actinium-225	10,0 j	α	5,1 – 5,8	Thérapie
Astate-211	7,2 h	α	5,9 – 7,5	Thérapie
Iode-125	59,4 j	e^- Auger	0,027	Thérapie

I.2. Les vecteurs immunologiques

Parmi les différents vecteurs utilisés pour la vectorisation, ceux issus du système immunitaire font l'objet d'un grand engouement et les anticorps correspondent aux protéines les plus représentatives de cette catégorie.

I.2.1. Les anticorps

Les anticorps, ou immunoglobuline (Ig) sont des glycoprotéines produites par les plasmocytes en réponse d'une infection par le système immunitaire des mammifères. Lorsqu'un corps étranger (bactérie, virus...) s'introduit dans l'organisme, les anticorps ont pour rôle de le reconnaître et de déclencher la réaction immunitaire. Cette capacité à reconnaître spécifiquement un agent pathogène est ce qui a provoqué leur attractivité dans le domaine de la médecine vectorisée. Il existe différentes classes d'anticorps, aux propriétés variables : les IgA, IgD, IgE, IgM, mais les plus abondantes et les plus utilisées sont les IgG (figure 2).

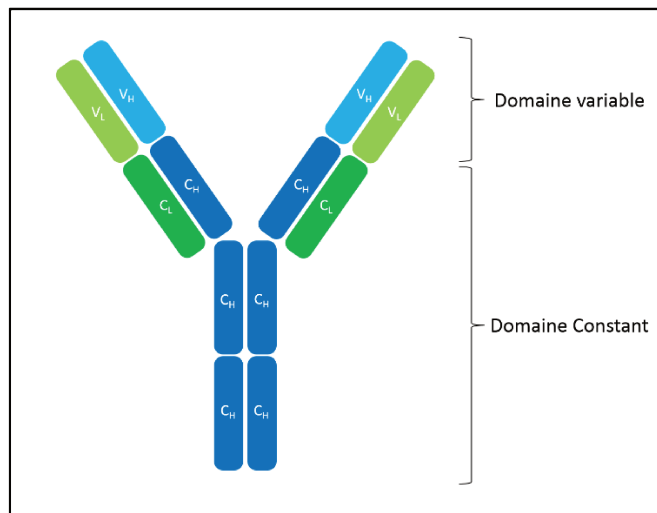


Figure 2. Schéma d'un anticorps. Les parties les plus claires représentent les zones de reconnaissance de l'anticorps (notées V), et les parties les plus foncées sont les zones constantes (notées C). Le bleu correspond aux chaînes lourdes (notées H) et le vert aux chaînes légères (notées L).

En forme de Y, ils sont composés de deux chaînes lourdes d'environ 50 kDa et deux chaînes légères d'environ 25 kDa reliées entre elles par des ponts disulfures. L'extrémité des chaînes légères est la zone de reconnaissance. C'est cette partie qui est capable de reconnaître spécifiquement une protéine présente à la surface d'un agent pathogène nommée antigène. Elle varie suivant l'antigène ciblé, c'est pourquoi elle est également appelée zone variable. Le reste de l'anticorps représente la zone constante et est responsable de l'action immunitaire qui vise à détruire l'agent pathogène.

Il est possible de produire des anticorps spécifiques d'un antigène voulu en laboratoire. La technique utilisée de nos jours a été élaborée par Köhler et Milstein en 1975⁵. Elle consiste à injecter l'antigène d'intérêt à une souris afin de déclencher une réponse immunitaire. Les plasmocytes sécrétant les anticorps dirigés contre l'antigène injecté sont alors prélevés, puis fusionnés avec des cellules tumorales immortelles, à savoir des cellules myélomateuses. On obtient alors des hybridomes, qui ont hérité du plasmocyte leur capacité à produire l'anticorps spécifique, et de la cellule tumorale celle de proliférer plus rapidement et indéfiniment. Ces hybridomes sont par la suite isolés et leur culture permet l'obtention d'un seul type d'anticorps, qu'on appelle anticorps monoclonal (mAb).

Le développement de cette méthode de production a permis l'émergence des anticorps dans le domaine de la médecine, notamment pour la vectorisation. Cependant, ces protéines d'origine murine peuvent provoquer des réactions immunitaires lorsqu'elles sont injectées à un être humain, ce qui limite alors leur efficacité. Cela a conduit à la création de nouvelles générations d'anticorps : les anticorps chimériques, qui correspondent à des anticorps humains dont la zone variable a été remplacée par leur homologue murin, puis les anticorps humanisés qui sont des anticorps humains

dont seules les parties hypervariables nécessaires à la reconnaissance de l'antigène sont murines. Ces anticorps réduisent considérablement la réponse immunitaire⁶.

1.2.2. Les vecteurs immunologiques dérivés des anticorps

Si les anticorps sont les vecteurs immunologiques les plus utilisés en médecine nucléaire, ils ne sont pas parfaits. En effet, leur grande taille leur confère une pharmacocinétique lente, les rendant inadaptés à la vectorisation de radionucléides de temps de demi-vie plus courts. En oncologie nucléaire, l'action qui consiste à détruire la cellule réside dans le radionucléide. Par conséquent, la zone constante de l'anticorps n'est pas nécessaire. La supprimer permet alors d'obtenir des vecteurs plus petits qui circulent plus rapidement dans l'organisme, limitant la dose reçue par les tissus sains. De plus, ils pénètrent plus facilement dans les tumeurs.

Il est possible de fragmenter les anticorps par des techniques de digestion enzymatique, ou par rupture des ponts disulfures par l'utilisation de réducteurs tels que le dithiotréitol (figure 3). Cela permet l'obtention de fragments que l'on appelle Fab, Fab' ou encore F(ab)'₂.

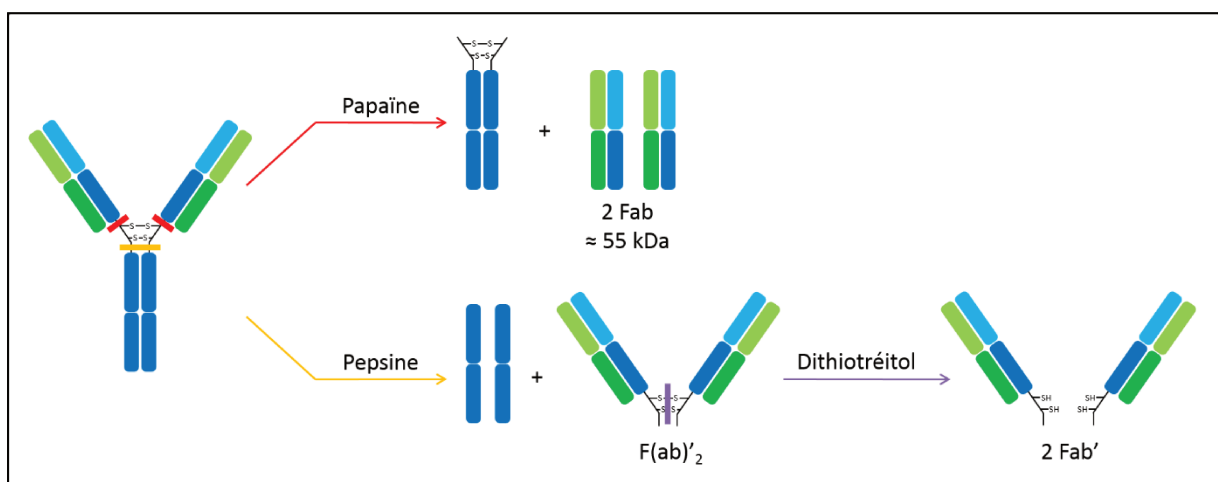


Figure 3. Création de fragments d'anticorps.

L'ingénierie des anticorps ne s'est pas arrêtée là, et par un jeu de fragmentation et de recombinaison, de nombreux autres vecteurs ont vu le jour. Il est notamment possible d'isoler les parties variables des anticorps et de les recombinaison ensemble. On obtient ce qu'on appelle un fragment ScFv. Ils peuvent être utilisés tels quels, ou associés à d'autres fragments de régions variables ou constantes pour former de nouveaux vecteurs (figure 4).

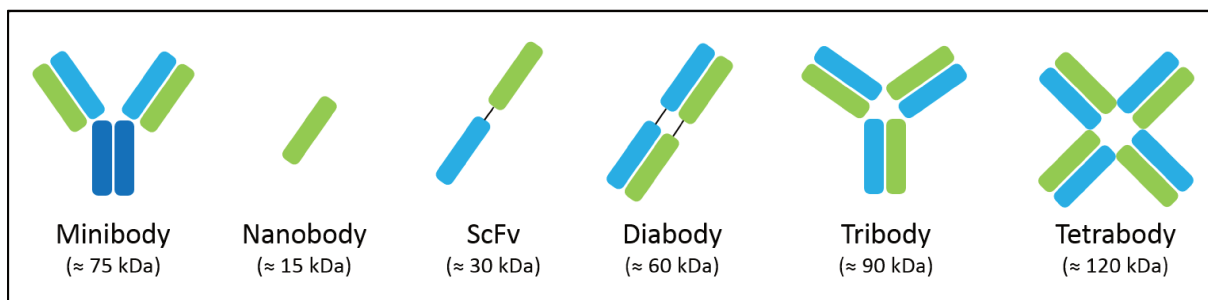


Figure 4. Exemples de vecteurs immunologiques issus de l'ingénierie des anticorps.

Cependant leur plus petite taille accélère leur évacuation de l'organisme et la dose à la tumeur est alors diminuée. Leur affinité pour l'antigène peut également être diminuée par rapport aux anticorps dans le cas des vecteurs qui possèdent un nombre réduit de zones de reconnaissance.

I.3. Le ciblage tumoral

Lorsqu'un vecteur immunologique est injecté dans l'organisme, l'efficacité de son ciblage dépend de plusieurs facteurs, notamment liés à l'antigène ciblé. Plus ce dernier sera exprimé en quantités importantes à la surface de la tumeur, plus l'anticorps aura de sites auxquels il pourra se fixer, augmentant l'efficacité du traitement dans le cas thérapeutique et la résolution de l'image dans le cas de l'imagerie. Le ciblage est d'autant plus efficace que le radiopharmaceutique possède une activité molaire (A_m) importante^b. Idéalement, l'antigène visé ne se trouve que sur les tumeurs, ce qui est le cas pour ceux résultants de la mutation créée par les cancers. Cependant, ces mutations sont spécifiques à chaque individu. Si créer un anticorps spécifique pour chaque patient serait la solution dans la théorie, cela n'est pas réalisable en pratique. C'est pourquoi les antigènes qui sont visés seront communs à un plus grand nombre d'individus. Ils sont présents également à la surface de cellules saines, mais sont surexprimés dans le cas des cellules tumorales.

Concrètement, lorsqu'il s'agit d'administrer un traitement vectorisé à un patient, deux possibilités existent : le ciblage direct ou le pré-ciblage (figure 5).

^bActivité par mole d'une molécule radiomarquée exprimée en Bq/mol

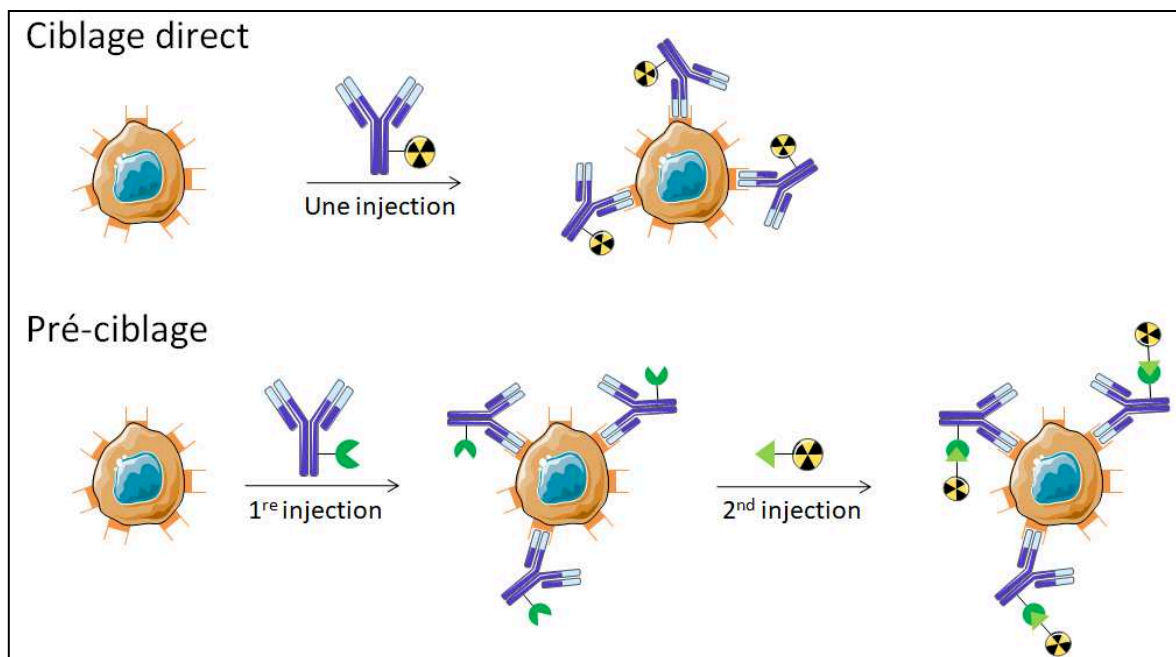


Figure 5. Principe de vectorisation d'un radionucléide avec un anticorps.

I.3.1. Le ciblage direct

Le ciblage direct, ou ciblage en un temps, est une méthode qui consiste à injecter le radionucléide préalablement lié à son vecteur. Elle est la plus simple à mettre en œuvre car elle ne nécessite qu'une seule injection. Le radiopharmaceutique est alors injecté en intratumoral, ou par voie intraveineuse. Cependant, les tissus sains sont irradiés pendant la circulation du radiopharmaceutique dans le sang, notamment dans le cadre de la thérapie. Ce phénomène est d'autant plus important que le vecteur est de grande taille, avec une pharmacocinétique lente, comme c'est le cas pour les anticorps. Afin de pallier ce problème, des méthodes de pré-ciblages ont été développées.

I.3.2 Le pré-ciblage

Le pré-ciblage est une méthode d'injection du radiopharmaceutique en deux, voire trois temps⁷. Elle consiste à injecter dans une première étape le vecteur préalablement couplé à un nouveau site capable d'interagir *in vivo* avec une petite molécule porteuse du radionucléide d'intérêt. Cette petite molécule est injectée dans un second temps lorsque le vecteur s'est accumulé à la tumeur et que le taux de vecteur circulant encore dans l'organisme a suffisamment décru. La petite taille de la molécule radiomarquée lui permet de circuler rapidement jusqu'au vecteur, ce qui limite l'irradiation sur les tissus sains dans le cadre de la thérapie et permet d'obtenir plus rapidement une image avec une résolution satisfaisante dans le cadre de l'imagerie. De plus, les molécules non liées avec le vecteur sont de la même manière rapidement éliminées de l'organisme. Le pré-ciblage permet également d'utiliser des radionucléides de temps de demi-vie plus courts, qui seraient en temps normal

incompatibles avec la pharmacocinétique du vecteur, en particulier lorsqu'il s'agit d'un anticorps. Plusieurs systèmes de pré-ciblage ont été mis au point^{8,9} :

- Le système avidine/biotine ou streptavidine/biotine, qui consiste à préalablement modifier le vecteur avec une avidine, une streptavidine ou une biotine, puis la molécule complémentaire radiomarquée est injectée dans un second temps¹⁰.

- Le système anticorps bispécifique/haptène, qui utilise un anticorps dont une zone de reconnaissance est spécifique de l'antigène ciblé tandis que l'autre est spécifique de l'haptène radiomarqué. Initialement utilisé avec des haptènes monovalents, aujourd'hui ce système est plus répandu avec des haptènes bivalents qui ont montré une meilleure efficacité du ciblage, ce qui lui a valu le nom de technique AES (Affinity Enhancement System)¹¹.

- La méthode des oligonucléotides^c complémentaires qui repose sur leur forte interaction et qui a l'avantage de ne pas provoquer de réaction immunitaire. Les fragments d'ADN et d'ARN natifs étant sensibles aux nucléases qui peuvent entraîner leur dégradation *in vivo*, des oligomères synthétiques, les oligomères phosphorodiamidates morpholino (MORFs), ou des acides peptidiques nucléiques (PNAs) sont utilisés¹².

- La chimie click qui fait appel à des fonctions non présentes sur les molécules issues du vivant. Certaines de ces réactions sont dites bio-orthogonales, c'est-à-dire qu'elles peuvent s'opérer rapidement *in vivo*, d'où le fort intérêt qu'elles suscitent pour le pré-ciblage. Une des réactions les plus fréquentes est la réaction de Diels-Alder à demande inverse (IEDDA) utilisant le système *transcyclooctène/tétrazine*¹³.

I.4. Utilisation des anticorps en radioimmunothérapie et en imagerie

Le développement d'une méthode de production d'anticorps monoclonaux au milieu des années 1970s a été le véritable point de départ de l'étude des anticorps en radioimmunothérapie (RIT) et en imagerie. L'ingénierie qui en a découlée a permis de créer des vecteurs toujours plus efficaces avec les anticorps chimériques et humanisés, ainsi que le développement de vecteurs plus petits avec les fragments d'anticorps. Les nouvelles techniques de pré-ciblages ont conduit à l'amélioration de l'efficacité thérapeutique ainsi que le temps nécessaire à l'obtention d'images de bonne résolution. Malgré les nombreuses études à leur sujet, très peu d'anticorps radiomarqués sont utilisés de façon

^cCourts fragments d'ADN ou d'ARN

routinière en clinique. Cependant, beaucoup font l'objet d'une recherche active et bon nombre d'essais cliniques aboutissent à des résultats prometteurs.

I.4.1. Les anticorps en imagerie

L'imagerie avec les anticorps a tout d'abord débuté avec la scintigraphie et la TEMP. Couplés à des radionucléides émetteurs γ tels que le technétium-99m^{14,15}, l'indium-111^{16,17}, ou encore l'iode-131^{18,19}, le radiopharmaceutique permet de déterminer la zone où se situe la tumeur. L'imagerie TEMP est souvent couplée à une technique de tomo-densitométrie (TDM) afin d'obtenir une visualisation anatomique et de pouvoir plus précisément situer la tumeur (figure 6).

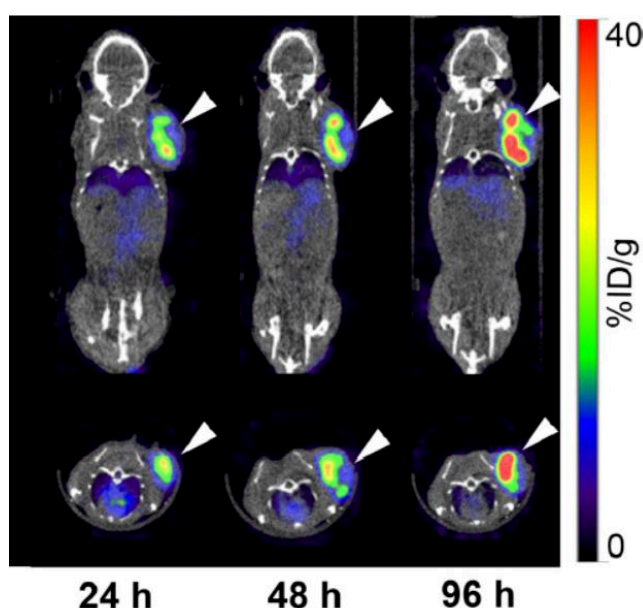


Figure 6. Images TEMP/TDM d'une souris xénogreffée par une lignée cellulaire de cancer gastrique AGS avec un anticorps anti-CDH17 radiomarqué à l'indium-111. En haut les images coronaires. En bas les images transaxiales. Les flèches blanches indiquent la tumeur. Image publiée dans *Annals of Nuclear Medicine*. Fujiwara, K. et al. ¹¹¹In-labeled anti-cadherin17 antibody D2101 has potential as a noninvasive imaging probe for diagnosing gastric cancer and lymph-node metastasis. *Ann. Nucl. Med.* **34**, 13–23 (2020)²⁰. Publication en libre accès sous les termes de la licence Creative Commons CC BY (lien vers la licence en annexe).

Dans le cadre d'une application en clinique, la TEMP est utilisée pour visualiser les tumeurs afin de guider une opération chirurgicale. Cependant, bien que ce soit un moyen accessible et peu coûteux, elle reste limitée par sa sensibilité et sa faible résolution. De plus, elle ne permet pas à l'heure actuelle l'accès à des mesures quantitatives²¹. C'est principalement pour cette dernière raison que l'immuno-TEP (figure 7) a été favorisée afin de pouvoir réaliser des études de pré-thérapie. En effet, chaque patient est unique et la médecine d'aujourd'hui s'applique à utiliser le traitement le mieux adapté à un patient donné. L'immuno-TEP rentre parfaitement dans cette optique car elle permet de déterminer quel patient pourra répondre à un traitement en RIT, mais aussi de prédire l'impact de ce même traitement sur les cibles et les tissus sains par quantification de la répartition de l'activité *in vivo* et par des calculs dosimétriques. Il sera ainsi possible d'adapter la dose à délivrer au patient. Pour cela, le radiopharmaceutique utilisé pour l'imagerie TEP et le traitement en RIT doit avoir une biodistribution similaire et le radionucléide doit avoir des propriétés chimiques proches. On parle alors

d'une approche théranostique. Cette technique d'imagerie a fait l'objet de nombreuses études précliniques et cliniques et permet l'imagerie de plusieurs pathologies²².

De nombreux radionucléides peuvent être utilisés en immuno-TEP. L'iode-124 ($t_{1/2} = 100$ h) et le zirconium-89 ($t_{1/2} = 78,4$ h) possèdent un temps de demi-vie suffisamment long pour être compatible avec la demi-vie biologique des anticorps. Le pré-ciblage a notamment permis l'utilisation de radionucléides de temps de demi-vie plus courts avec les anticorps, comme le fluor-18 ($t_{1/2} = 1,83$ h) ou le gallium-68 ($t_{1/2} = 1,13$ h)²³.



Figure 7. Immuno-TEP d'un patient diagnostiqué atteint du carcinome médullaire thyroïdien métastatique. Les flèches rouges représentent un foyer considéré pathologique. Les images ont été réalisées par une méthode de pré-ciblage utilisant l'anticorps trivalent bispécifique TF2 anti-CEA-anti-histamine-succinyl-glycine et l'haptène bivalent histamine-succinyl-glycine IMP288 radiomarké au gallium-68. Image publiée dans *Journal of Nuclear Medicine*. Bodet-Milin, C. et al., *Immuno-PET Using Anticarcinoembryonic Antigen Bispecific Antibody and ^{68}Ga -Labeled Peptide in Metastatic Medullary Thyroid Carcinoma: Clinical Optimization of the Pretargeting Parameters in a First-in-Human*, *J. Nucl. Med.* 57, 1505–1511 (2016) © SNMMI²⁴.

I.4.2. Les anticorps en RIT

La RIT est aujourd'hui considérée comme un traitement prometteur. Appliquée plus récemment dans le domaine des maladies infectieuses^{25,26}, c'est en cancérologie qu'elle est la plus utilisée, seule ou en complément d'un autre traitement²⁷. Cependant, seules des études menées sur les lymphomes non hodgkinien (LNH) à cellules B ont abouti à l'approbation de deux médicaments dédiés à la RIT ciblant l'antigène CD20 : l' ^{131}I -tositumomab et l' ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan. Le premier a été retiré de la vente tandis que le deuxième peut être utilisé en clinique pour le traitement du lymphome folliculaire dans le cas de rechute, de maladie réfractaire ou comme renforcement du traitement après une chimiothérapie^{28–30} (figure 8).

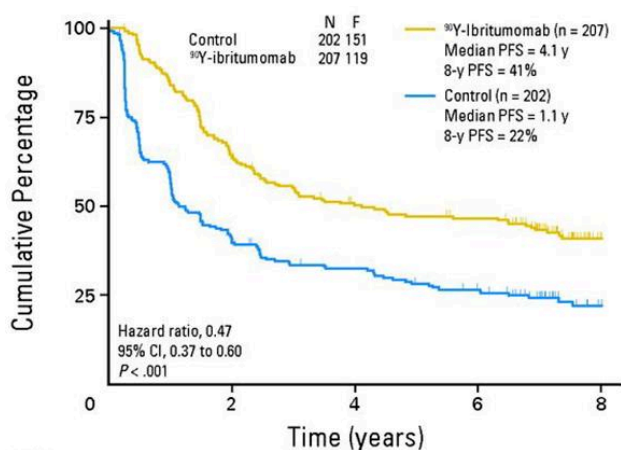


Figure 8. courbe de survie sans progression globale pour le traitement du lymphome folliculaire dans une étude de phase III. Les patients ont été traités avec du rituximab, puis ont reçu soit une injection d' ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan comme traitement de consolidation (courbe jaune), soit aucun traitement supplémentaire comme contrôle (courbe bleu). Image réutilisée avec la permission de American Society of Clinical Oncology (2020). Tout droit réservés. Morschhauser, F. et al., J. Clin. Oncol. **31**, 2013, 1977-1983³⁰. Numéro de licence : 4918860502919

Des études cliniques allant jusqu'à la phase II pour le traitement d'autres types de LNH avec ce même médicament^{31,32}, ou avec des anticorps anti-CD22³³ ont données des résultats prometteurs.

La RIT peut être opérée par une seule injection du radiopharmaceutique, mais également par injection fractionnée qui permet de cumuler une plus grande dose à la tumeur et ainsi améliore l'efficacité du traitement^{34,35}. On peut notamment citer les essais cliniques de phase II menés par Tagawa *et al* qui utilisent l'anticorps humanisé J591 anti-PSMA radiomarqué au lutétium-177 pour le traitement du cancer de la prostate³⁶⁻³⁹. L'injection fractionnée a permis d'injecter 14 % d'activité supplémentaire par rapport à une injection seule, ce qui s'est accompagné d'une meilleure efficacité du traitement avec une moyenne de survie qui passe de 21,8 à 45,3 mois.

La limite principale de l'utilisation des anticorps en RIT est leur grande taille qui induit une pharmacocinétique lente. Leur efficacité est alors particulièrement limitée dans le cas de tumeurs solides macroscopiques, qui demandent une dose proche de la toxicité pour obtenir un effet antitumoral satisfaisant. Cette barrière peut être levée grâce aux techniques de pré-ciblage⁴⁰. Le système AES utilisant les anticorps bispécifiques avec des haptènes bivalents radiomarqués est particulièrement prometteur et a été longuement étudié dans des essais cliniques, notamment sur le carcinome médullaire de la thyroïde⁴¹. Une étude de phase II menée par Salaun *et al* a montré que le traitement de cette pathologie par une méthode de pré-ciblage permettait le contrôle de la maladie pour 76 % des patients, avec une médiane de survie sans progression de 13,6 mois et une survie globale de 43,9 mois⁴².

Jusqu'à présent seuls deux émetteurs β^- ont été approuvés pour une utilisation en RIT : l'iode-131 et l'yttrium-90. D'autres émetteurs β^- sont en pleine émergence, tels que le lutétium-177. Cependant, les émetteurs α semblent plus appropriés pour le traitement des cancers hématologiques, des maladies résiduelles ou des tumeurs micrométastatiques de par leur haut TEL et leur faible taux de pénétration qui entraînent une forte destruction des cellules tumorales tout en limitant la toxicité

sur les tissus sains. Récemment, le premier émetteur alpha, le radium-223 a été cliniquement validé pour le traitement de lésions osseuses (Xofigo) et de nombreux autres émetteurs α font encore aujourd'hui l'objet d'études précliniques et cliniques⁴³. Parmi eux figure l'astate-211, souvent cité comme l'un des plus prometteurs pour la RIT- α de par ses propriétés physiques.

II. L'astate-211, un choix prometteur pour la thérapie alpha vectorisée

L'astate est découvert en 1940 par Corson *et al.* Lors du bombardement d'une cible de bismuth-209 avec des particules alpha accélérées à 32 MeV⁴⁴. Il s'agit du 85^e élément du tableau périodique, faisant de lui le plus lourd des halogènes (détrôné depuis par le ténnessé découvert en 2010). Ses 32 isotopes connus possèdent un nombre de nucléons variant entre 191 et 223 et sont tous radioactifs, ce qui fait de l'astate un radioélément. Ses isotopes sont tous de courte demi-vie allant de quelques millisecondes à quelques heures, les plus stables étant l'astate-210 ($t_{1/2} = 8,1$ h), suivi de l'astate-211 ($t_{1/2} = 7,2$ h), puis de l'astate-209 ($t_{1/2} = 5,4$ h). C'est de cette caractéristique que lui vient son nom, qui vient du grec *astatos* (αστατος), ce qui signifie « instable ». De ce fait, il est difficile de travailler avec cet élément et c'est pourquoi ses caractéristiques chimiques sont encore très méconnues aujourd'hui. Il est présent en très petites quantités dans la croûte terrestre, de l'ordre de quelques milligrammes à quelques grammes selon différentes estimations, ce qui en fait l'élément naturel le plus rare sur Terre.

Malgré les difficultés pour l'étudier, l'astate suscite un grand intérêt pour la médecine nucléaire. Parmi les isotopes d'intérêt, l'astate-211 est le plus étudié. En effet, ses propriétés en font un excellent candidat pour la radiothérapie interne vectorisée.

II.1. Propriétés physiques de l'astate-211

L'astate-211 possède une période de 7,2 h, ce qui n'est ni trop long, ni trop court pour une application en médecine nucléaire. Il décroît suivant deux branches. Il peut soit se désintégrer en bismuth-207 avec 42 % de probabilité par émission d'une particule α d'une énergie de 5,9 MeV. Le bismuth-207 n'est pas stable, et possède un temps de demi-vie de 32,9 ans et décroît par capture électronique (CE) en plomb-207, stable. D'autre part, l'astate-211 a 58 % de probabilité de se désintégrer en polonium-211, qui décroît presque instantanément ($t_{1/2} = 516$ ms) en plomb-207 par l'émission d'une particule α d'une énergie de 7,5 MeV (figure 9).

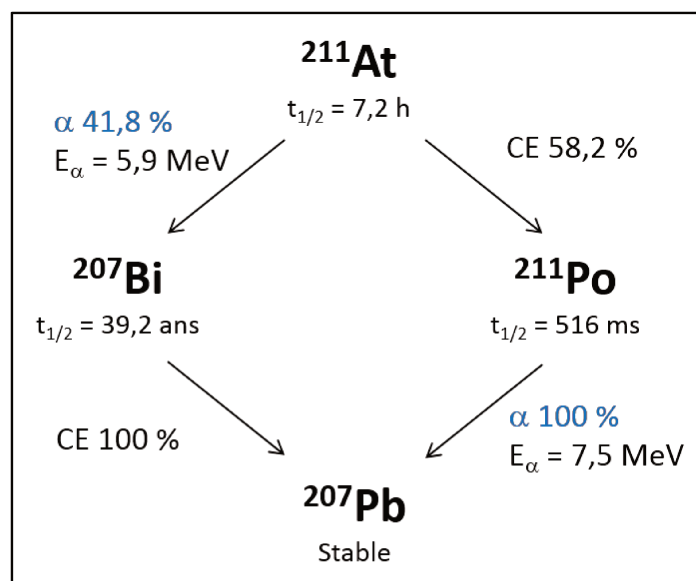


Figure 9. Schéma de décroissance de l'astate-211.

Ainsi, chaque désintégration de l'astate-211 produit directement ou indirectement une particule α , ce qui en fait un candidat idéal pour la radiothérapie interne vectorisée (RIV).

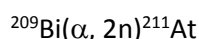
Dans le cadre de la RIV, il est important que les noyaux fils issus de la désintégration de l'astate-211 ne génèrent aucun problème. En effet, le bismuth-207 et le polonium-211 créés peuvent se détacher du vecteur. D'un côté, le bismuth-207 s'accumule dans le foie et les reins. Cependant, la radiotoxicité qu'il engendre reste très faible en raison de son long temps de demi-vie ($t_{1/2} = 39,2$ ans). A titre d'exemple, lors de l'injection de 347 MBq d'astate-211, ce qui est la plus haute dose administrée à un humain à ce jour, une quantité négligeable de 310 kBq de bismuth-207 est produite. De l'autre côté, le polonium-211 a quant à lui un temps de demi-vie extrêmement court. Les particules α émises lors de sa désintégration se trouvent alors dans un environnement proche de la création du radioisotope, limitant les risques de toxicité sur les tissus alentours. Cependant, sa légère diffusion diminue la dose totale de particule α délivrée à la cible. Une étude menée par Palm *et al* démontre que la dose absorbée est divisée par deux dans leur modèle de cellules disséminées⁴⁵.

Lors de sa désintégration en polonium-211, l'astate émet des rayons X avec des énergies comprises entre 76 et 93 keV. Ces derniers peuvent être mesurés avec un détecteur gamma, ce qui permet de déterminer une activité. Ils peuvent également être utilisés en imagerie TEMP afin de faciliter le suivi *in vivo* de l'astate-211^{46,47}.

II.2. Méthodes de production de l'astate-211

II.2.1. Bombardement d'une cible de bismuth-209 par des particules alpha

L'astate-211 ne fait pas parti des isotopes existant à l'état naturel. Il est produit en cyclotron par bombardement d'une cible de Bismuth-209 par des particules alpha suivant la réaction nucléaire suivante :



Afin de produire de l'astate-211, le faisceau de particule alpha dirigé sur la cible de bismuth doit avoir une énergie comprise entre 21 et 40 MeV, la section efficace maximale étant à 31 MeV. Cependant, cette énergie conduit également à la formation d'astate-210, qui se désintègre en polonium-210, émetteur alpha très radiotoxique pour la moelle osseuse, avec un long temps de demi-vie ($t_{1/2} = 138$ ans). Par conséquent, il faut éviter de former cet isotope pour une application en RIV. C'est pourquoi les tirs d'irradiation se font entre 25 et 28 MeV afin de limiter la formation de ce radionucléide à un taux acceptable (ratio $^{210}\text{At}/^{211}\text{At}$ autour de 10^{-4}) tout en préservant un bon rendement⁴⁸. Une troisième réaction est possible lors de l'irradiation de la cible de bismuth. En effet, à partir de 26,7 MeV, on observe la formation de polonium-210. Cependant, le former lors de l'irradiation n'est pas un problème car il est facilement éliminé lors de l'étape de purification de l'astate⁴⁹ (figure 10).

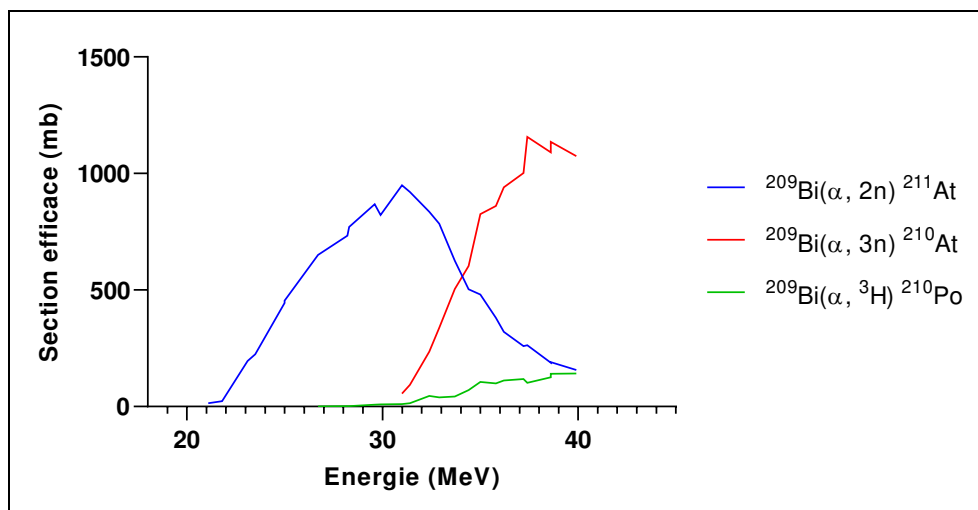


Figure 10. Sections efficaces des réactions possibles lors de l'irradiation du bismuth-209⁵⁰.

Une fois l'irradiation terminée, la cible est composée d'astate, mais également de bismuth et de polonium qu'il convient de retirer afin d'obtenir le radionucléide le plus pur possible. Il existe à ce jour deux méthodes de purification de l'astate : la voie sèche par distillation ou la voie humide par

dissolution de la cible suivit soit d'une extraction liquide/liquide, soit d'une purification sur colonne de tellure ou plus récemment par l'utilisation de résines préfiltres.

II.2.1.1. Purification par voie sèche

La cible est placée dans un four et chauffée à des températures comprises entre 650 et 900 °C ce qui fait passer l'astate à l'état gazeux ($T_{\text{ébullition}} = 337\text{ °C}$). Il est récupéré par un flux de gaz (azote ou argon), puis est mis en solution par barbotage dans le solvant voulu ou directement dans le milieu réactionnel du radiomarquage⁵¹, ou alors par condensation dans un tube en PolyEtherEtherKetone (PEEK) refroidi par de la carboglace, puis dissous dans le solvant adéquat⁵². L'astate est obtenu en solution aqueuse (généralement du sulfite de sodium ou de l'hydroxyde de sodium), ou en solvant organique (méthanol, chloroforme ou acétonitrile). Le procédé de distillation prend une trentaine de minutes avec des rendements d'environ 80 %.

II.2.1.2. Purification par voie humide

La cible est tout d'abord dissoute avec de l'acide concentré, tels que l'acide chlorhydrique, l'acide perchlorhydrique ou encore l'acide nitrique. Trois méthodes de purifications sont ensuite appliquées :

- Extraction liquide/liquide : L'excès d'acide est évaporé et le résidu contenant l'astate et le bismuth est dissous en milieu acide, puis l'astate est extrait avec un solvant organique (éther diisopropylique (DIPE)⁵³, éther butylique⁵⁴, dodécane⁵⁵ ou méthylisobutylcétone^{56,57}). L'astate est ainsi obtenu en 1h15 en solution avec des rendements autour de 90 % et une bonne pureté radiochimique. Cependant, le choix du solvant dans lequel le radioisotope est obtenu est limité à ceux cités précédemment. Une version automatisée a récemment été mise au point, avec des rendements aux alentours de 79 % et une bonne reproductibilité⁵⁸.

- Purification sur colonne de tellure⁵⁹ : Après la dissolution de la cible en acide nitrique concentré, la solution est introduite sur une colonne de tellure et la purification se fait par l'élution successive d'une solution d'acide chlorhydrique, puis de l'eau, et l'astate est finalement récupéré dans une solution d'hydroxyde de sodium avec un rendement entre 79 et 88 % et une haute pureté. Une version semi-automatisée a également été mise au point, augmentant les rendements jusqu'à 97 % en 90 minutes.

- Purification sur résines préfiltres⁶⁰ : La cible dissoute en HNO_3 est traitée avec de l'hydroxyde de sodium, de l'acide chlorhydrique concentré et $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ avant d'être chargée sur la résine. La purification se fait par élution successives d'acide chlorhydrique, de $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ et d'eau et l'astate-211 est finalement récupéré en hydroxyde de sodium. Les rendements de cette procédure sur des

larges cibles sont de 55 % en un temps inférieur à 1h30 avec une haute pureté radiochimique (aucune trace de bismuth détectée en ICP-AES).

II.2.2. Les générateurs d'astate-211

Une autre façon d'obtenir de l'astate-211 est à partir du radon-211 par capture électronique. Quelques exemples dans la littérature font mention d'un générateur^d $^{211}\text{Rn}/^{211}\text{At}^{61-64}$. L'avantage d'un tel générateur réside dans la demi-vie plus longue du radon-211 ($t_{1/2} = 14,6$ h) comparé à l'astate-211, ce qui peut faciliter la distribution de ce dernier sur des sites plus éloignés que le lieu de production. Cependant l'accès au radon-211 reste très limité en raison de la rareté des accélérateurs nécessaires pour le produire. Par conséquent, ces méthodes ne sont encore qu'à un stade exploratoire.

II. 3. Propriétés chimiques de l'astate

Les propriétés chimiques de l'astate ne sont pas encore très bien connues, en raison de nombreux facteurs, le premier d'entre eux étant l'absence d'isotope stable. De plus, les quantités produites sont de l'ordre du nanogramme dans les meilleurs cas. Les méthodes spectroscopiques utilisées classiquement en chimie, telles que la spectrométrie de masse, la résonance magnétique nucléaire (RMN), les spectroscopies ultra-violettes (UV), infrarouge (IR) ou rayons X (RX), ne peuvent pas être utilisées avec d'aussi faibles quantités. S'ajoute à cela le fait qu'il sera toujours présent à l'état de trace en solution (concentration inférieure à 10^{-10} mol/L), étant en concurrence avec les impuretés présentes dans le milieu. Enfin, son étude nécessite un accélérateur de particules possédant les caractéristiques nécessaires à sa production, et il en existe pour le moment très peu dans le monde. C'est pourquoi un nombre limité de laboratoires ont l'opportunité de travailler sur l'astate. En dépit de toutes ces limites, un certain nombre de caractéristiques ont pu être établies.

L'astate faisant parti des halogènes, il possède une réactivité similaire aux autres membres de la famille, en particulier l'iode, son plus proche élément. Cependant il diffère de ces derniers en de nombreux points. Il possède notamment des propriétés métalliques qui le rendent apte à former des complexes. Il possède donc une dualité halogène/métal. Ces différences ne s'arrêtent pas là et elles peuvent s'expliquer par les effets relativistes auxquels l'astate est soumis.

II.3.1. Les effets relativistes et leurs influences sur les propriétés de l'astate

Lorsque l'on regarde les propriétés de certains éléments chimiques parmi les plus lourds, des anomalies apparaissent. La couleur de l'or, qui n'a pas un aspect grisé similaire aux autres métaux, ou

^d Un générateur est un système contenant un radionucléide père de celui d'intérêt. Ce dernier pourra être récupéré la plupart du temps par un système d'élution.

encore le fait que le mercure soit le seul métal liquide à température ambiante et à pression atmosphérique. Ces différences peuvent s'expliquer par les effets relativistes. Ces effets surviennent lorsque les atomes ont un numéro atomique Z important, ce qui va influencer sur la vitesse de leurs électrons. La vitesse moyenne des électrons d'un atome $\langle v_e \rangle$ rapportée à la vitesse de la lumière c (137,036 u.a.) peut être calculée avec la relation suivante :

$$\sqrt{\langle v_e^2 \rangle} = \frac{Z}{137}$$

Or, la masse d'un électron est dépendant de sa vitesse, comme l'indique la relation :

$$m = \frac{m_0}{\sqrt{1 - \frac{v^2}{c^2}}}$$

Avec m_0 la masse de l'électron au repos et v la vitesse de l'électron. Plus Z augmente, plus la vitesse des électrons augmente. Dans le cas des atomes lourds, comme l'astate, cette vitesse devient non négligeable par rapport à la vitesse de la lumière, et la masse de l'électron devient alors significativement différente de sa masse au repos. Cela a une influence, notamment au niveau des orbitales qui ont alors leur géométrie modifiée. Cela s'explique mathématiquement avec les équations suivantes :

$$\langle r \rangle = \frac{3}{2} \frac{a_0}{Z} \qquad a_0^{eff} = \frac{4\pi\epsilon_0\hbar}{1,22m_e e^2}$$

Avec $\langle r \rangle$ le rayon moyen des orbitales, ϵ_0 la permittivité du vide $\hbar$ la constante de Dirac, e la charge réduite, m_e la masse de l'électron et a_0 le rayon de Bohr correspondant à la longueur séparant l'électron du proton. On constate que si m_e augmente, la valeur de a_0 diminue et par conséquent, le rayon moyen des orbitales diminue, ce qui se traduit par leur contraction. On constate donc que lorsqu'il s'agit d'étudier les éléments lourds, la mécanique moléculaire classique qui néglige la vitesse des électrons par rapport à celle de la lumière n'est pas adaptée et il faut faire appel à la mécanique quantique relativiste.

Parmi tous les effets relativistes connus, il en est un qui semble avoir une grande influence sur l'astate : le couplage spin-orbite⁶⁵⁻⁶⁸. Il correspond à l'interaction entre le moment cinétique intrinsèque d'une particule (le spin), dans notre cas d'un électron, et son mouvement. On peut alors définir le moment cinétique total $\vec{J}$ tel que :

$$\vec{J} = \vec{L} + \vec{S}$$

Avec $\vec{L}$ le moment angulaire de la particule et $\vec{S}$ son spin. Dans le cas de l'électron, le spin est égal à $\pm 1/2$. Si on prend pour exemple les orbitales p, le nombre quantique de moment angulaire l est égal à 1. Les orbitales de même nombre principal et secondaire sont initialement au même niveau d'énergie. Du fait du couplage spin-orbite, certaines orbitales ont un nombre quantique angulaire total égal à soit $1/2$ soit $3/2$, avec une énergie différente. C'est ce qu'on appelle la levée de dégénérescence.

Le couplage spin-orbite a un impact sur de nombreuses propriétés, telles que l'électronégativité de l'atome, sa réactivité, sa structure ou encore la nature des liaisons qu'il pourra former. Il est notamment responsable des propriétés métalliques de l'astate, bien qu'il appartienne à la famille des halogènes. Ce comportement est expliqué en 2013 par Hermann *et al*, qui à l'aide de calculs théoriques, justifient cet aspect par l'influence du couplage spin-orbite bien plus marqué qu'avec son plus proche homologue, l'iode⁶⁹. A l'état condensé, l'astate aurait une structure cristalline cubique face centrée.

Dans certains cas, des propriétés peuvent être influencées par des effets relativistes qui ne dépendent pas du spin de l'électron. On les appelle les effets relativistes scalaires. C'est le cas notamment de la géométrie des composés de types XF_3 ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}, \text{At}$) dans lesquels on observe une différence entre l'astate et les autres halogènes. Si ClF_3 , BrF_3 et IF_3 adoptent uniquement une symétrie en forme de T (C_{2v}) dû à l'effet *pseudo*-Jahn-Teller^{e,71}, l'astate semble pouvoir également adopter une géométrie planaire (D_{3h}), avec une énergie entre ces deux formes proches ($\Delta E = 3,2 \text{ kJ/mol}$) (figure 11).

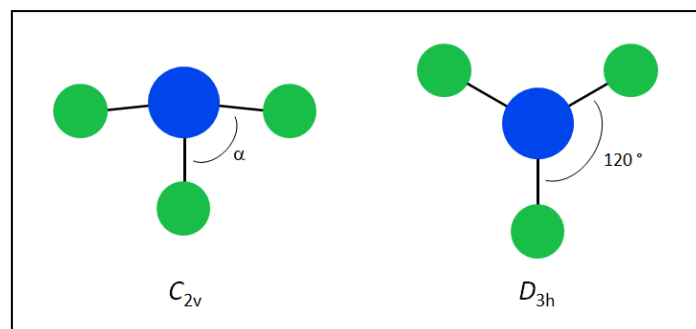


Figure 11. Géométries C_{2v} et D_{3h} .

Sergentu *et al* ont démontré la très faible influence du couplage spin-orbite sur la géométrie adoptée par le composé AtF_3 ⁷². Les effets relativistes scalaires, additionnés à la corrélation électronique (interaction entre les électrons dans un système quantique) suffisent à expliquer la différence de symétrie entre l'astate et les autres halogènes par inhibition de l'effet *pseudo*-Jahn-Teller

^e L'effet Jahn-Teller décrit la distorsion géométrique de molécules en raison de leur configuration électronique. L'effet *pseudo*-Jahn-Teller est une extension de ce théorème qui inclue les états excités dans l'interaction entre les états électroniques et vibrationnels (couplage vibronique) d'une particule⁷⁰.

de la géométrie D_{3h} . De plus, cette observation peut être expliquée par la simple théorie VSEPR. Dans une géométrie C_{2v} , les doublets non liants se situent en position équatoriale, alors que dans le système D_{3h} , ils sont en position axiale. Il apparaît que plus l'halogène est gros, plus ses doublets non liants ont tendance à passer de la position équatoriale à la position axiale pour limiter la répulsion induite par ces derniers⁷³.

II.3.2. L'apport de la chimie théorique dans l'étude de l'astate

Afin d'étudier l'astate, les méthodes expérimentales sont souvent couplées à des études théoriques. Comme les électrons de l'astate sont soumis à des effets relativistes, ces derniers sont donc à prendre en compte lors de l'étude théorique de cet élément. Des méthodes de calculs ont ainsi été développées^{66,74,75}. Il convient parmi toutes ces méthodes de les associer de façon à se rapprocher au plus de la réalité. A titre d'exemple, de nombreuses études ont été réalisées pour déterminer l'affinité électronique de l'astate, c'est-à-dire l'énergie gagnée lorsque l'atome neutre obtient un électron, formant ainsi l'anion correspondant. Suivant les calculs théoriques employés et les effets relativistes pris en compte, les valeurs obtenues varient de 2,210 à 3,183 eV^{67,76–84}. Si les calculs théoriques permettent de donner une idée de certaines propriétés, il est toujours préférable de les comparer avec des résultats expérimentaux. Ce n'est que récemment que l'affinité électronique de l'astate a été mesurée de cette façon avec une valeur de 2,416 eV⁸⁵.

II.3.3. Nature des liaisons formées par l'astate

Les effets relativistes ont une grande influence sur la nature des liaisons formées par l'astate. Le couplage spin-orbite a tendance à les affaiblir. Premièrement, Pilmé *et al* ont notamment montré qu'il diminue l'électronégativité de l'astate. Cela a pour conséquence de diminuer le caractère covalent et de favoriser le transfert de charge des liaisons⁸⁶. Ils observent notamment le cas de At-CH_3 , qui développe ce type de liaison avec l'effet du couplage spin-orbite, alors que sans ce dernier, la liaison serait de nature covalente, comme c'est le cas pour At-BH_2 . Cette différence de la nature de la liaison expliquerait la plus grande stabilité observée pour les composés astatés liés à des atomes de bore plutôt qu'à des atomes de carbone. Deuxièmement, l'indice de liaison est également impacté par cet effet spin-orbite, qui a tendance à le diminuer légèrement. Ce point a été démontré à plusieurs reprises lors d'études de composés de type At-X ($\text{X} = \text{F}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}, \text{At}$)^{87,88}. Pech *et al* démontrent également que le couplage spin-orbite augmente les longueurs de liaisons de ces complexes.

Un autre type de liaison investigué est la liaison halogène. Elle est employée dans plusieurs domaines, tels que l'organocatalyse, la chimie médicale, ou encore l'ingénierie cristalline. La définition IUPAC indique qu'il s'agit d'une interaction entre une région électrophile associée à un atome halogéné

au sein d'une molécule et d'une région nucléophile d'une autre ou de la même molécule⁸⁹. Classiquement, ce type de liaison peut être noté $R-X \cdots B$, où R est un groupement lié à X, X l'halogène agissant comme le donneur de liaison halogène et B le site nucléophile accepteur (figure 12).

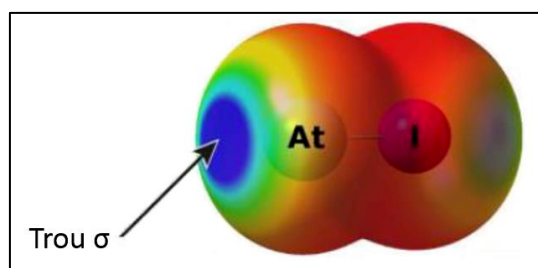


Figure 12. Potentiel électrostatique moléculaire de AtI. Les valeurs négatives sont représentées en rouge et les valeurs positives en bleu.

Image modifiée à partir de celle de Graton, J. et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 29616–29624 (2018)⁹⁰ avec la permission des sociétés propriétaires de Physical Chemistry Chemical Physics. Autorisation transmise via Copyright Center Clearance, Inc.

La région avec un potentiel électrostatique moléculaire positif située au sommet de l'halogène, dans l'axe de la liaison R-X est appelé trou σ ⁹¹. C'est cette zone électrophile caractéristique des liaisons halogènes qui est capable d'interagir avec les espèces riches en électrons. La force de ces liaisons dépend de ce paramètre, directement impacté par la polarisabilité de l'halogène et de la capacité du groupement R à attirer les électrons. En effet, il a été montré avec l'iode, le brome, le chlore et dans une moindre mesure le fluor, que plus l'halogène est polarisable, plus la valeur du trou- σ augmente, ce qui renforce le caractère donneur⁹². Les liaisons halogènes formées ont alors une énergie plus grande dans l'ordre suivant : $F < Cl < Br < I$. Par conséquent, la logique voudrait que l'astate soit l'halogène qui possède le meilleur caractère donneur.

Cependant des études menées par Julien Pilmé et Nicolas Galland montrent un résultat contraire. En étudiant une série de dihalogènes XY (X, Y = F, Cl, Br, I, At) et se servant de l'ammoniac comme base de Lewis, ils observent que At_2 forme des liaisons halogènes moins fortes que I_2 ⁹⁰. Des résultats similaires sont obtenus par l'étude de la force des liaisons halogènes formées entre Y_3C-X (Y = F, Cl, Br, I, At et X = I, At) et un halogénure, avec I_3C-I formant des liaisons plus fortes que At_3C-At ⁹³. Un autre laboratoire observe le même résultat, avec une série Cl-X (X = Cl, Br, I, At) avec pour base l'ammoniac⁹⁴. Ces résultats s'expliquent par l'action du couplage spin-orbite très marqué, qui conduit à de nombreuses modifications. Il contribue notamment à augmenter les longueurs des liaisons mises en jeu. Il diminue également le transfert de charge le long de ces liaisons. Il diminue également « l'aplatissement polaire ». C'est un phénomène qui rend compte de la répartition de la densité électronique autour d'un atome lié. Les électrons s'accumulent autour de l'atome dans les directions perpendiculaires à la liaison, et il y a un affaiblissement de la densité dans la région en prolongation de la liaison. Tout cela conduit à une accumulation de la charge sur l'astate, ce qui affaiblit

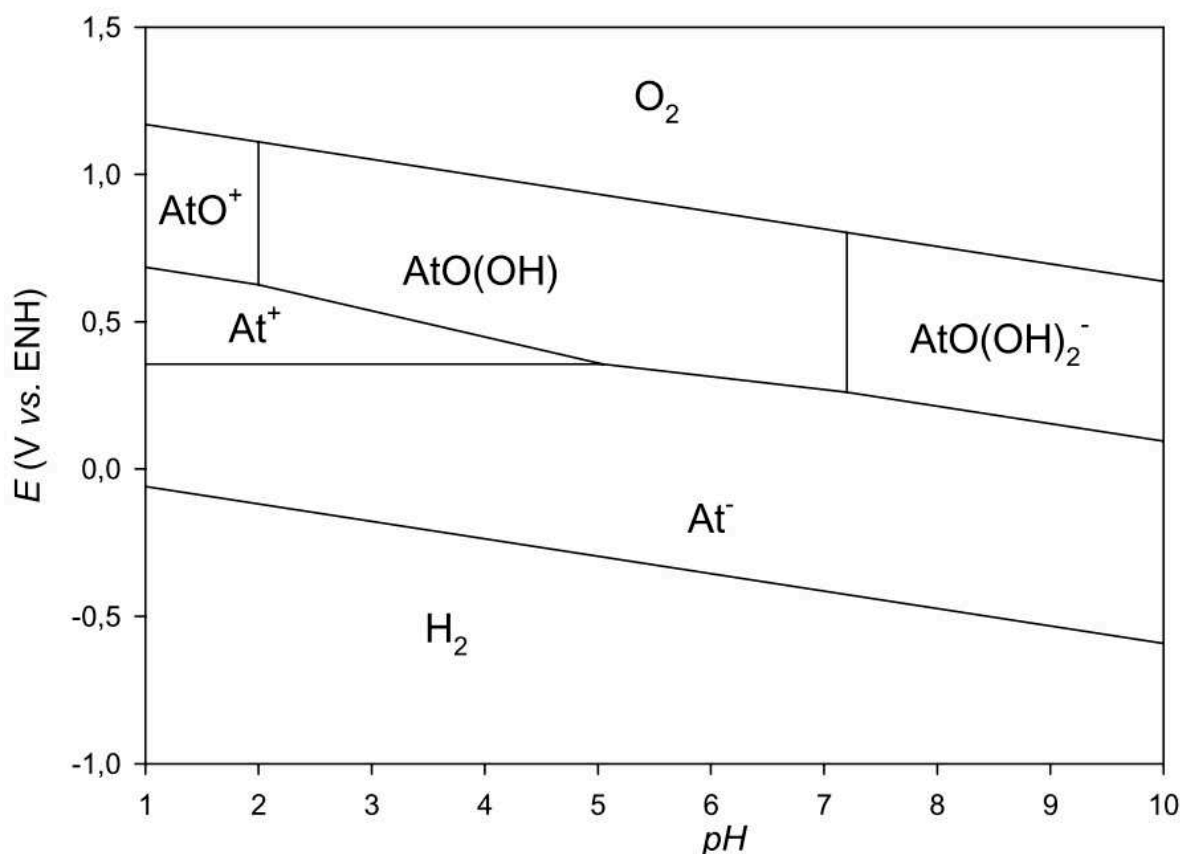
le trou- σ . Par conséquent, cela diminue son caractère électrophile, et donc sa capacité à former des liaisons halogènes.

Pourtant dans une étude réalisée sur AtI en combinaison avec une variété de base, c'est bien l'astate et non l'iode qui agit en tant que donneur de liaison halogène⁹⁵. Cette particularité a pu être prédite à l'aide de calculs théoriques prenant bien en compte le couplage spin-orbite et vérifiée expérimentalement par l'étude des coefficients de distribution (D) de la radioactivité liée à l'astate entre la phase aqueuse dans laquelle AtI est soluble et la phase organique dans laquelle la base est soluble. Les calculs théoriques ont démontré que la zone électrophile sur l'astate est bien plus forte que le trou- σ de l'iode. Les complexes formés IAt---B sont systématiquement plus stables que les complexes AtI---B (différence d'au moins 10 kJ/mol). De plus, la comparaison des constantes de complexation démontre que AtI a une plus grande interaction avec les bases étudiées que I₂, cela confirme que l'astate est bien l'atome donneur de liaison halogène. Afin de former des liaisons halogènes plus fortes, il est envisagé de pouvoir utiliser des espèces de type AtCl ou AtBr⁹⁰. Cependant leur faible zone de prédominance en fonction du pH et du potentiel redox les rend peu attractifs. Un autre moyen d'augmenter la stabilité des liaisons est de faire varier la base. Récemment Liu *et al* ont reportés la liaison halogène la plus stable avec le système IAt---OPBu₃⁹⁶.

Si les halogènes peuvent agir en tant qu'électrophiles dans la formation de liaisons halogènes, ils peuvent également agir en tant que nucléophiles dans la formation de liaisons hydrogènes. C'est pourquoi des études théoriques comparatives ont été menées pour connaître quel caractère serait prédominant dans le cas où les deux types de liaison sont possibles. Galland *et al* ont étudié le système AtOH---B (B = NH₃, NCH, N₂) et constatent que l'effet spin-orbite de l'astate a également une influence sur ses atomes voisins. En effet, l'énergie de la liaison hydrogène formée est diminuée jusqu'à 19 %, ce qui correspond à une diminution plus grande que pour les liaisons halogènes, qui pourtant impliquent l'astate directement⁹⁷. L'astate favoriserait donc la formation de liaisons halogènes par rapport aux liaisons hydrogènes. Ces résultats sont confirmés par d'autres études, notamment celle menée par Li *et al* qui utilisent un système de type halogénobenzène C₅H₅X---NH₃⁹⁸ (avec X = Cl, Br, I, At) et démontrent que plus l'halogène est lourd, plus la liaison halogène sera favorisée par rapport à la liaison hydrogène. Dans leur système, uniquement des liaisons halogènes sont formées lorsque X = I ou At.

II.3.4. Les différentes espèces chimiques de l'astate

Le diagramme de Pourbaix de l'astate en milieu aqueux non complexant a été établi par le groupe de radiochimie à Subatech en utilisant des méthodes à la fois expérimentales et computationnelles⁹⁹ (figure 13).



Ce diagramme met en évidence trois états d'oxydations de l'astate : l'état -I, l'état +I et l'état +III. Si ce sont les états les plus répandus, ce ne sont pas les seuls connus de l'astate, et l'on trouve également dans la littérature les états 0, +V et +VII sous certaines conditions expérimentales^{101,102}.

- L'état -I : Une seule espèce de l'astate correspond à cet état : At^- . Son existence a longtemps été supposée par analogie avec les autres halogènes. Elle a récemment pu être prouvée par électromobilité¹⁰³. Cette forme est stable sur une large zone de pH en milieu réducteur. Elle est obtenue en présence d'un réducteur tel que SO_3^- ou le dithiothréitol. A l'image de I^- , elle réagit comme un nucléophile, ou comme un ligand de type base molle.

- L'état 0 : Il s'agit de la forme d'astate obtenue après distillation de la cible de bismuth. Si ce degré d'oxydation a été parfois supposé exister sous la forme d' At_2 , cela semble statistiquement improbable

étant donné le degré de dilution dans lequel l'astate est obtenu. La forme radicalaire quant à elle serait trop réactive pour persister dans le milieu. Des calculs DFT permettant l'analyse précise de la répartition des électrons de valence autour de l'atome d'astate ont récemment montrés que ce degré d'oxydation est retrouvé dans des composés de types AtX , AtX_2^- ($\text{X} = \text{Br}, \text{I}$) et même dans le composé trihalogéné tertiaire le plus lourd possible IAtBr^- ¹⁰⁴.

- L'état +I : Cet état d'oxydation est obtenu en présence d'oxydants comme la chloramine T, ou la *N*-iodosuccinimide sous les formes d' AtO^- en milieu alcalin, et d' At^+ en milieu acide. At^+ est largement utilisée dans les radiomarquages par voie électrophile de la même façon que son homologue iodé de par son caractère d'électrophile faible. En revanche, il possède également un comportement métallique similaire à Ag^+ . Il agit comme un acide mou et selon la théorie HSAB établie par Pearson^{f,105}, il est capable de former des complexes avec des ligands de type base molle⁶⁶.

- L'état +III : De nombreuses formes ont été supposées pour cet état d'oxydation, qu'elles soient anioniques (AtOX_2^- , AtX_4^-), neutres (OAtX , At(OH)_3 , At(OH)X_2 , AtX_3) ou cationiques (AtO^+ , AtSO_4^+ , AtCrO_4^+). Cependant, seulement trois ont été formellement identifiées : AtO^+ , AtO(OH) et AtO(OH)_2^- . En raison de sa charge négative, l'espèce AtO(OH)_2^- a longtemps été confondue avec At^- et ce n'est que récemment qu'elle a été mise en évidence⁹⁹. AtO^+ possède un comportement métallique assimilable à un acide légèrement moins mou qu' At^{+66} . Cette espèce a donné lieu à plusieurs travaux de recherche par rapport à son comportement qui diffère selon qu'une réaction soit menée en phase gazeuse ou en solution. La solvation joue un rôle important dans ces résultats. AtO^+ peut former des clusters avec jusqu'à six molécules d'eau. Plus AtO^+ sera entouré d'eau, plus les effets relativistes vont jouer un rôle, ce qui modifie sa configuration électronique et donc sa réactivité^{106,107}.

- Les états +V et +VII : Bien que l'existence de ces états ait été supposée dans la littérature, elle n'a pas été prouvée. L'état + V serait obtenu sous la forme AtO_3^- dans des conditions très oxydantes (de $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ ou IO_4^- à chaud par exemple). Quant à l'état +VII, il existerait sous la forme AtO_4^- et serait obtenu par réaction avec du fluorure de xénon en présence de NaOH chaud.

II.4. Propriétés biologiques de l'astate

L'astate-211 étant un émetteur alpha, il peut être utilisé pour le traitement de petites tumeurs isolées. Ses particules pénètrent sur environ 65 μm , ce qui correspond au diamètre de 3 à 6 cellules.

^f La théorie HSAB établie que les bases et les acides peuvent être répartis selon deux catégories dites molles ou dures. La catégorie dure concerne les atomes de petite taille et peu polarisables. A l'inverse, la catégorie molle concerne les atomes de plus grande taille, fortement polarisables. Les acides durs (Al^{3+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} ...), peu électronégatifs, ont une plus grande affinité pour les bases dures (ROH , RNH_2 , Cl^- ...), tandis que les acides mous (Cd^{2+} , Ag^+ , Pd^{3+} ...), fortement électronégatifs, s'associent avec les bases molles (RSH , RCN , I^- ...).

De plus, son transfert d'énergie linéique (TEL) est extrêmement élevé : $98,8 \text{ keV}/\mu\text{m}$, ce qui est proche de la valeur pour un effet biologique relatif (EBR) optimal ($100 \text{ keV}/\mu\text{m}$)¹⁰⁸. Le traitement à l'aide de ce radioisotope se révèle donc très prometteur, tant d'un point de vue efficacité pour le traitement de la tumeur que pour sa capacité à irradier une zone très restreinte.

De nombreuses études ont été menées afin de déterminer le devenir de l'astate libre dans l'organisme, souvent comparées à l'iode radioactif. Des études de biodistribution menées sur des rats et des souris ont montrées des similarités entre les deux éléments, avec une accumulation dans l'estomac, ainsi que dans la thyroïde, même si elle est moins importante pour cet organe dans le cas de l'astate. Ce dernier s'accumule aussi particulièrement dans les tissus chargés en macrophages, tels que les poumons, le foie, les reins et la rate^{109–111} (figure 14).

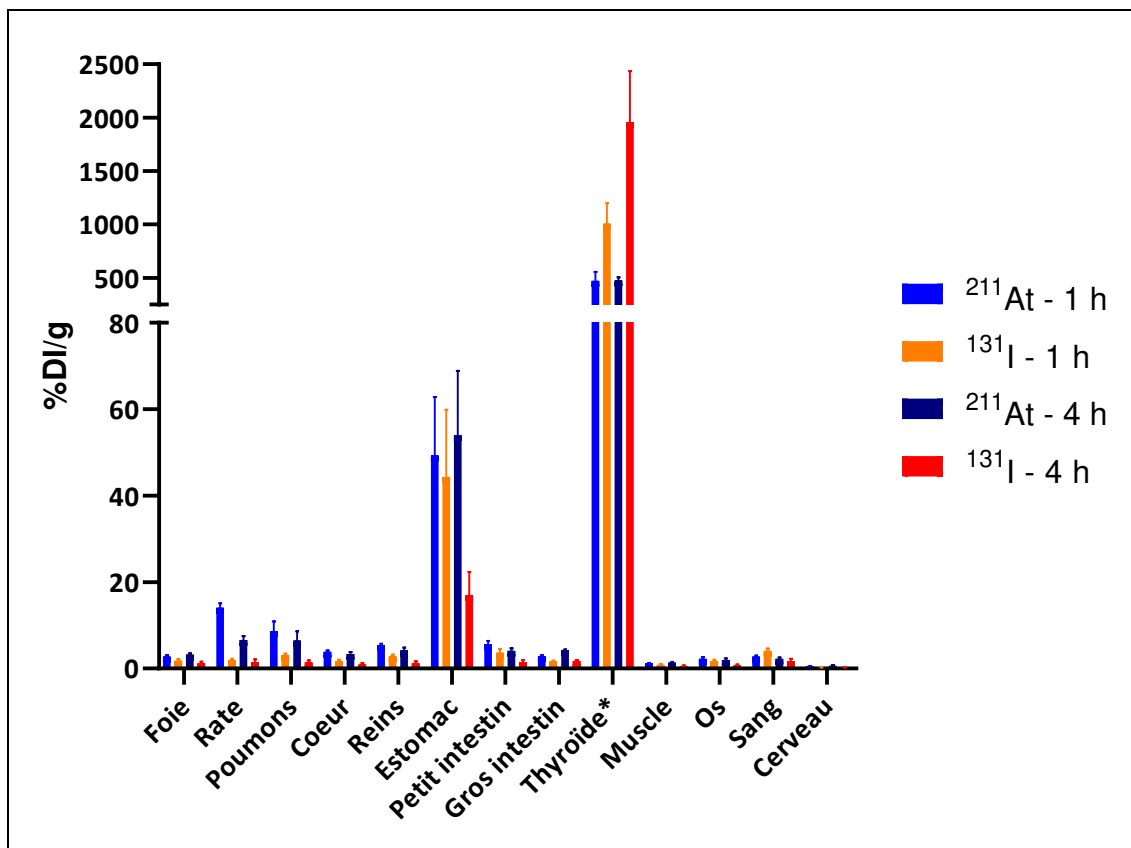


Figure 14. Biodistribution de l'astate dans un modèle de souris¹¹². *La masse de la thyroïde a été estimée à 5 mg pour une souris de 20 g.

II.5. Utilisation de l'astate-211 en thérapie alpha vectorisée

Les propriétés de l'astate-211 étant prometteuses, des études visant à amener ce radionucléide en clinique ont été réalisées. Afin qu'il soit acheminé jusqu'à sa cible, l'astate-211 a dans la vaste majorité des cas été couplé à une molécule vectrice.

II.5.1. Etudes *in vitro*

De nombreuses études *in vitro* ont été menées, que ce soit sur l'astate-211 seul afin de comprendre l'action des particules α sur les cellules, ou bien sur des vecteurs radiomarqués à l'astate afin d'évaluer la répartition de la radioactivité entre des cellules saines et des cellules cancéreuses (microdosimétrie), ainsi que la cytotoxicité.

Une étude *in vitro* de l'astate-211 libre sur des cellules de fibroblaste humain menée par Claesson en 2007 a montré que les particules α émises par le radionucléide sont capables d'effectuer une cassure de l'ADN dite « double brin », entraînant la mort de la cellule, avec une efficacité deux à trois fois supérieure par rapport aux rayonnements γ émit par du cobalt-60 ou aux rayons X¹¹³.

Quant aux études menées sur l'astate vectorisé, elles sont nombreuses^{114–118}. On peut notamment citer celle menée par Petrich *et al* qui ont utilisé des lignées leucémiques HL-60 et K-562 afin de comparer la cytotoxicité entre un anticorps anti-CD33 radiomarqué à l'astate-211 et couplé à l'ozogamicine, une molécule cytotoxique¹¹⁹. Dans des conditions comparables, l'anticorps couplé à l'ozogamicine a une cytotoxicité quasi-nulle similaire à l'anticorps non modifié, alors que celui radiomarqué à l'astate peut conduire jusqu'à la mort de plus de 80 % des cellules HL-60 en 48 h, avec une efficacité dépendant de l' A_m et de la dose délivrée.

II.5.2. Etudes précliniques

L'affinité de l'astate libre pour la thyroïde peut être mise à profit dans le cadre des cancers thyroïdiens, à l'image de l'iode. Une étude menée sur des rats greffés avec des cellules K1-NIS ont montrées que le traitement de l'astate par un réducteur (l'acide ascorbique) permet d'augmenter la pureté radiochimique d' At^- , et d'avoir une meilleure fixation sur la thyroïde, atteinte ou non du cancer¹²⁰. L'effet thérapeutique est dépendant de la dose injectée, mais est notable dès 0,1 MBq, avec une diminution de la taille des tumeurs après l'injection, associée à une faible radiotoxicité¹²¹.

La question de l'affinité de l'astate libre pour des tumeurs autres que celles des cancers thyroïdiens a été évoquée. Un des exemples a été rapporté par Brown *et al*, qui utilisent un modèle de souris porteuses d'adénocarcinome rectal murin¹²². Le profil pharmacocinétique était identique à celui des souris non greffées, ce qui a montré une absence d'affinité de l'astate pour la tumeur. Ces tests

ont démontré l'importance de lier l'astate à une molécule vectrice afin qu'il soit acheminé jusqu'à la cible.

Cependant il a été observé à de nombreuses reprises que même si le radiopharmaceutique est stable *in vitro*, la liaison entre l'astate et son vecteur peut dans certains cas se rompre *in vivo* (déshalogénation), notamment lorsque le vecteur en question est de petite taille et est rapidement métabolisé (cet aspect sera traité dans la partie III). L'astate peut alors aller s'accumuler dans les différents organes cités cibles de l'astate libre, provoquant une toxicité non souhaitée. Une façon de limiter cette accumulation est d'utiliser des agents bloquants qui occupent alors les sites sur lesquels l'astate pourrait se fixer. Une étude sur des souris a montré que l'usage de perchlorate de sodium, de thiocyanate de sodium ou encore d'iodure de sodium permettait de réduire significativement le pourcentage de dose injectée dans la thyroïde, l'estomac, les poumons et la rate¹¹². Par exemple, 4 h après injection, le pourcentage de dose injectée à l'estomac passait de $16,98 \pm 6,94 \%$ à $2,24 \pm 0,74 \%$ avec l'utilisation de perchlorate de sodium.

Le phénomène de désastatation peut être limité suivant le système d'injection du radiopharmaceutique, qui joue un rôle dans la rapidité de métabolisation du vecteur. On préférera alors des injections dans des cavités au plus proche de la tumeur, qui sont par ailleurs plus adaptées à la demi-vie biologique du radiopharmaceutique, par rapport aux administrations qui demanderaient un long acheminement de ce dernier dans l'organisme jusqu'à la tumeur. De nombreux types de vecteurs ont alors été expérimentés, que ce soit des anticorps^{123,124}, des fragments d'anticorps type F(ab')₂¹²⁵⁻¹²⁷, des diabodies¹²⁸, des peptides¹²⁹, des octréotides¹³⁰, des nanobodies¹³¹ ou des minibodies¹³².

En 2001, Andersson *et al* ont réalisé une étude comparative entre les particules α émises par l'astate-211 et les rayonnements β^- émis par l'iode-131 liés à l'anticorps monoclonal MOv18 afin d'évaluer leur efficacité thérapeutique sur un modèle de souris atteintes du cancer de l'ovaire (cellules OVCAR-3)¹³³. Six semaines après traitement, neuf souris sur dix traitées à l'astate-211 ne présentaient plus de tumeurs microscopiques ou macroscopiques, contre 3 seulement pour celles traitées à l'iode-131, démontrant la supériorité de l'astate-211. Plus récemment, Li *et al* ont comparé l'efficacité de l'astate-211 et de l'yttrium-90 (émetteur β^-) pour le traitement du sarcome synovial¹³⁴. Le radionucléide lié à l'anticorps OTSA101 (anti-FZD10) a été injecté à des souris greffées avec des cellules SYO-1. L'astate-211 s'est avéré être une fois encore plus efficace, avec une suppression totale de l'accroissement tumoral juste après injection de 50 μ Ci pour le traitement à l'astate-211 contre plusieurs jours avant d'observer un effet avec l'yttrium-90. Cependant dans les deux cas, la reprise de la croissance de la tumeur est observée dans les deux cas entre 17 à 20 jours après injection.

L'efficacité d'un traitement dépend de plusieurs facteurs. Tout d'abord, la dose injectée doit être suffisamment forte pour provoquer l'éradication des tumeurs. Cependant, une trop forte dose peut conduire à des effets toxiques¹³². Il convient donc de trouver la meilleure activité pour garantir un traitement optimal. De tels résultats ont pu être obtenus à plusieurs reprises lors de l'utilisation du trastuzumab radiomarké à l'astate-211 pour le traitement du carcinome ovarien HER-2 positif dans un modèle murin^{135,136}. Une injection de 1 MBq ou moins suivant les études ont pu conduire à une éradication totale des tumeurs. Afin de limiter la dose totale injectée en une seule fois, l'efficacité des injections fractionnées a également été investiguée, parfois avec succès, comme dans l'étude menée par Elggvist en 2010 qui étudie l'efficacité du traitement fractionné sur le cancer ovarien¹³⁷. Il utilise pour cela des souris greffées avec la lignée cellulaire NIH:OVCAR-3 qu'il traite six semaines après greffage avec 400 kBq d'²¹¹At-MX35 F(ab')₂. Il répète ensuite la dose jusqu'à six fois, chacune séparées de sept jours. Il observe ensuite la présence de macro ou micro tumeurs, ou d'ascite huit semaines après le début de l'expérience. Un effet thérapeutique est observé au bout de trois injections. En effet, la fraction d'animaux sans tumeur passe de 0,17 pour une injection unique à 0,39 pour trois injections, et monte jusqu'à 0,67 pour six injections. Une étude sur le même modèle a été réalisée par Bäck *et al* avec pour objectif de traiter des macro tumeurs par l'injection fractionnée d'²¹¹At-MX35 F(ab')₂¹³⁸. Ils parviennent à éradiquer totalement les tumeurs, cependant les doses injectées sont proches de la létalité et diminuent la moyenne de survie sur le long-terme.

Un autre paramètre qui peut avoir son influence sur la qualité du traitement est la quantité totale de vecteur injectée. En effet, rajouter du vecteur froid permet de diminuer l'A_m. Or, des études de modélisation ont montrées qu'une trop grande A_m pouvait affecter la pénétration du radiopharmaceutique dans les tumeurs^{139,140}. Il a plusieurs fois été observé que l'ajout d'anticorps non radiomarké à la solution de radiopharmaceutique peut améliorer l'efficacité du traitement^{135,141}.

Des thérapies combinées existent également. Zhang *et al* ont notamment étudié la combinaison d'un anticorps monoclonal 7G7/B6 radiomarké à l'astate-211 avec un anticorps non radiomarké différent, le daclizumab pour le traitement de la leucémie dans un modèle murin¹⁴². Ils greffent des cellules-T humaines MET-1 à des souris et compare l'efficacité du traitement entre l'²¹¹At-7G7/B6, le daclizumab, et les deux combinés. Ils ont observé qu'au bout de 94 jours après le début du traitement, 91 % des souris avaient survécu avec le traitement combiné des deux anticorps, contre moins de 50 % pour les traitements isolés.

II.5.3. Essais cliniques

Malgré le succès de beaucoup d'essais précliniques, l'arrivée de l'astate-211 en clinique est lente. Seulement deux essais de phase I ont été finalisés, et un essai de phase I/II est actuellement en cours.

Le premier essai a été publié par Zalutsky en 2008 pour le traitement de tumeurs résiduelles cérébrales après traitement chirurgical¹⁴³. Il utilise l'anticorps chimérique ch81C6, spécifique de la tenascine présente à la surface des cellules tumorales de type gliome. L'étude préclinique de cet anticorps radiomarké à l'astate-211 avait déjà montré des résultats convainquant^{144,145}. Afin d'éviter l'accumulation de l'astate-211 dans la thyroïde suite à la dissociation potentielle de l'astate-211 de son vecteur *in vivo*, les 18 patients qui ont participé à l'étude ont reçu des doses d'iodure de potassium et de cytomel (liothyronine sodique). Ils ont également subi préalablement une résection chirurgicale, une radiothérapie externe et une chimiothérapie conformément au traitement classique. Le radiopharmaceutique a été injecté dans la cavité formée lors de la résection chirurgicale, avec une dose comprise entre 71 et 347 MBq pour 10 mg d'anticorps. La biodistribution de l'anticorps a pu être suivie par γ -caméra grâce aux rayons X émis lors de la désintégration du polonium-211. Cette étude a montré que le radiopharmaceutique restait principalement situé dans la cavité (entre 87 et 100 %), très peu passant dans le sang. Les résultats obtenus sont encourageants, avec une médiane de survie qui a augmenté jusqu'à 54 semaines avec ce traitement, contre 31 semaines avec le traitement classique. De plus, la limite de toxicité n'a pas été atteinte, ce qui montre que les doses utilisées ne sont pas dangereuses pour le patient.

Le deuxième essai a été réalisé pour évaluer la dosimétrie du $^{211}\text{At-MX35 F(ab')}_2$ chez des patientes atteintes du cancer de l'ovaire¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Cet anticorps est capable de cibler les cellules tumorales de ce type de cancer, et les études précliniques ont là encore donné des résultats encourageants. La thyroïde de certaines patientes a été bloquée par l'utilisation de perchlorate de sodium afin de limiter l'accumulation de l'astate-211 dans cet organe. Le radiopharmaceutique est administré par infusion intrapéritonéale d'un volume compris entre 1 et 2 L à une concentration comprise entre 22,4 et 101 MBq/L. La biodistribution a été suivie par γ -caméra. Une concentration significative de l'activité dans la thyroïde a été observée chez les patientes pour lesquelles cet organe n'avait pas été bloqué. Aucune autre accumulation dans d'autres organes n'a été observée et l'activité reste principalement dans l'abdomen. Après 12 ans de suivi, aucune toxicité liée au traitement radioactif n'a été observée. Cette étude démontre donc que le radiopharmaceutique peut être déposé efficacement à proximité des micrométastases par injection intrapéritonéale, mais que plusieurs paramètres nécessitent d'être investigués pour améliorer le traitement, notamment la dose injectée ou encore l' A_m .

L'essai clinique de phase I/II actuellement en cours est réalisé au Fred Hutchinson Cancer Research Center et est dédié au traitement de patients atteints de leucémie myéloïde et de leucémie lymphoblastique aigüe¹⁴⁹. Cet essai clinique utilise l'anticorps anti-CD45 BC8-B10 radiomarké à l'astate-211 et a pour objectif de déterminer la meilleure dose de cet anticorps à injecter aux patients, ainsi que les effets secondaires. Aucun résultat n'a encore publié.

Ces études ont démontré l'intérêt de l'utilisation de l'astate-211 en thérapie alpha vectorisée. D'autres essais seraient souhaitables, mais sont en grande partie limités par la faible disponibilité de l'astate-211. De plus, l'instabilité de la liaison entre l'astate et son vecteur représente une limite qu'il convient de surmonter. C'est pourquoi de nombreuses méthodes de radiomarquage, d'abord sur des petites molécules organiques, puis sur des protéines, ont été et sont toujours largement étudiées afin d'obtenir la méthode la plus fiable et la plus efficace possible.

III. Chimie de radiomarquage à l'astate-211

III.1. Les méthodes actuelles de radiomarquage à l'astate-211

Devant l'intérêt croissant de l'astate-211 pour la thérapie alpha vectorisée, il est devenu nécessaire d'étudier la façon de le lier à des molécules biologiques d'intérêt. La chimie de l'astate n'étant pas bien connue du fait qu'il ne possède aucun isotope stable, le développement de méthodes de radiomarquage a été le plus souvent conduit par analogie avec la chimie des halogènes, plus particulièrement celle de l'iode, son élément chimique le plus proche. L'approche la plus classique consiste à créer des liaisons carbone-astate. Cependant, plus l'halogène est lourd, plus l'énergie de liaison carbone-halogène est faible (tableau 2).

Tableau 2. Energies de liaison carbone-halogène (hydrogène inclus pour comparaison)¹⁵⁰ (kJ/mol).

X	Alkyle-X	Phényle-X
H	399	460
F	444	523
Cl	339	398
Br	285	335
I	222 ± 12	268
At	163 ± 12	197 ± 20

Si la liaison carbone-astate formée est trop fragile, cela entraîne une dissociation de l'astate *in vivo*, rendant ainsi le radiopharmaceutique inactif en plus d'avoir une toxicité non désirée dans les organes cibles de l'astate libre. C'est pourquoi très peu de travaux ont été réalisés sur les liaisons alkyles-astates, dont l'énergie de liaison est trop faible pour une application biologique. Ils se sont principalement limités à des études physiques et thermodynamiques¹⁵⁰⁻¹⁵². La liaison de l'astate à un carbone sp², majoritairement aromatique, a été plus largement investiguée, afin d'obtenir une stabilité suffisante *in vivo*. Une autre approche est d'exploiter d'autres types de liaisons que la liaison carbone-astate, permettant un accès à des composés potentiellement plus stables, à savoir des liaisons bore-astate, métal-astate, ou encore utiliser les propriétés métalliques de l'astate pour le complexer à des agents chélatants. Toutes ces méthodes de radiomarquages de l'astate sont discutées dans cette partie.

III.1.1. Formation de liaisons Carbone(sp²)-Astate

III.1.1.1. Substitution électrophile aromatique directe

L'iode est connu pour avoir une affinité particulière avec les tyrosines présentes naturellement sur les protéines. En effet, il peut être introduit directement par substitution électrophile aromatique sur les cycles aromatiques activés dans des conditions douces (schéma 1).

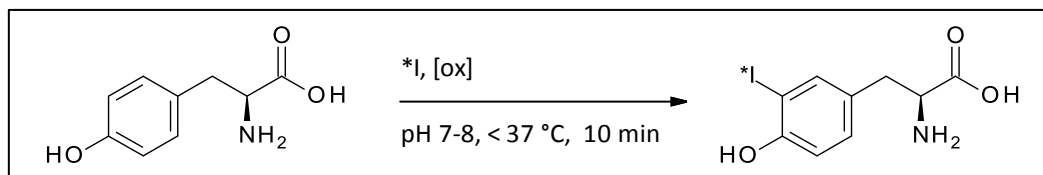


Schéma 1. Radioiodation de la tyrosine par substitution électrophile.

Ce procédé d'iodation est un moyen rapide et efficace de radiomarquage de protéines. Cependant la transposition à l'astate-211 conduit à une liaison carbone-astate instable à pH neutre et alcalin pour cet acide aminé¹⁵³. De plus, la réaction s'avère demander des conditions bien plus drastiques, avec un chauffage jusqu'à 160 °C, ce qui limite son application aux précurseurs thermorésistants¹⁵⁴. Il s'agit ici d'un premier exemple frappant des différences de réactivités parfois observées entre l'iode et l'astate.

Cette méthode a tout de même eu son utilité pour la synthèse de certaines molécules d'intérêt. L'exemple le plus connu est la synthèse du bleu de méthylène astaté, utilisé pour le traitement du mélanome, obtenu avec un rendement radiochimique (RRC) de $68 \pm 6 \%$ ¹⁵⁵ (schéma 2).

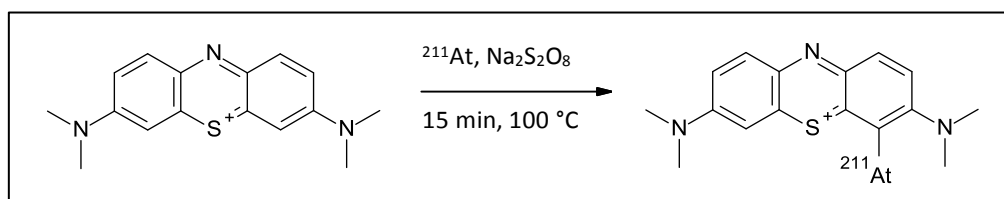


Schéma 2. Astatation du bleu de méthylène par substitution électrophile aromatique.

III.1.1.2. Sel de diazonium

Les sels de diazonium sont des composés connus depuis longtemps en chimie organique pour l'introduction de nucléophiles, notamment des halogènes, sur un noyau aromatique. Ils peuvent être obtenus facilement à partir du composé aminé correspondant en présence de NaNO₂ en milieu acide. L'introduction d'un groupement nucléophile peut se réaliser selon deux voies : ionique ou radicalaire (schéma 3).

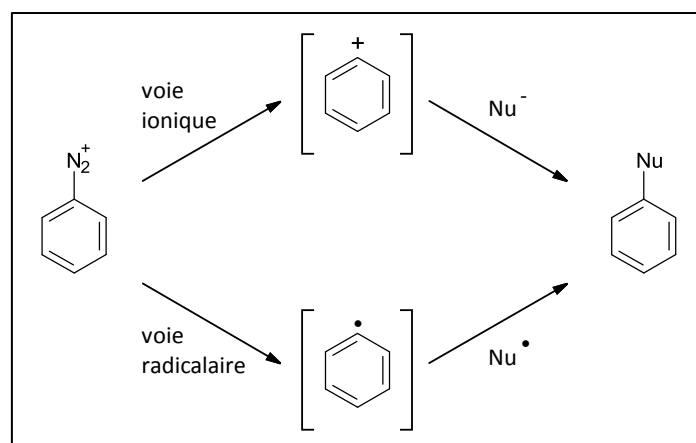


Schéma 3. Mécanismes de dédiazotation.

Cette réaction demande généralement que le nucléophile soit en excès, afin de contrecarrer la réaction compétitive due à la présence d'eau conduisant au dérivé phénol correspondant par hydroxydédiazotation. Or, dans le cas du radiomarquage, le radionucléide est à l'état de trace, donc on pourrait s'attendre à une absence de réaction dans des conditions diluées.

Cependant, l'iodation et l'astatation de molécules *via* cette méthode ont donné des rendements modérés dans le cas de l'iode-131 et excellents dans le cas de l'astate-211¹⁵⁶. L'acide *p*-[²¹¹At]astatobenzoïque a pu être obtenu avec un RRC pouvant aller jusqu'à 90 % après une heure de réaction à température ambiante suivie d'un chauffage à 50 °C en présence de NaCl. Comparativement, la même réaction avec l'iode-131 n'avait pas dépassée les 20 % de RRC¹⁵⁷. C'est Meyer *et al* qui vont donner une explication à ce résultat en proposant un mécanisme de la réaction en milieu dilué¹⁵⁸. Le mécanisme suggéré passe par la formation d'un complexe entre l'astate-211 et le sel de diazonium, puis des radicaux sont formés par transfert d'électrons (schéma 4).

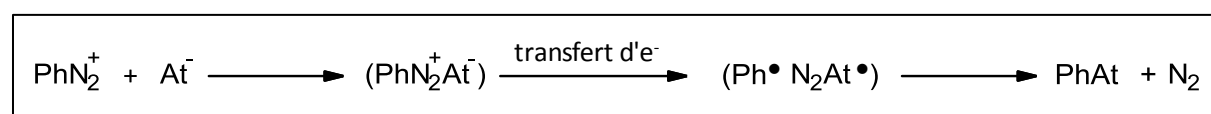


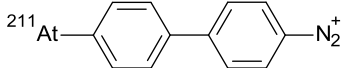
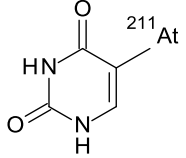
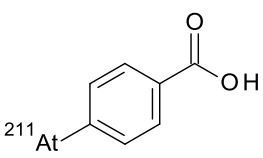
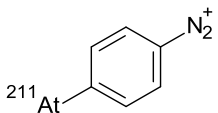
Schéma 4. Mécanisme de dédiazotation en milieu dilué.

Moins l'halogène est électronégatif, plus il cède facilement un électron, favorisant cette étape. De plus, la formation du complexe est favorisée par une plus grande polarisabilité de l'halogène¹⁵⁹. Ces deux faits justifient les meilleurs résultats observés à l'astate-211 par rapport à l'iode radioactif.

Cependant ce type de composés a été très peu utilisé pour le radiomarquage. En effet, leur formation demande un milieu fortement oxydant et un pH acide, limitant les substrats d'applications, en plus de former de nombreux sous-produits difficiles à éliminer.

Quelques exemples de composés obtenus par des sels de diazonium sont présentés dans le tableau 3 :

Tableau 3. Exemples de composés astatés obtenus par dédiazotation.

Produit	Conditions	RRC	Références
	Astatation à 0 °C en quelques minutes puis couplage sur l'albumine de sérum bovin sur les tyrosines <i>via</i> le second diazonium	~ 50 % de protéine marquée	156
	1 - 3 min à 80 °C	30 %	160
	1 h à température ambiante puis chauffage à 50 °C jusqu'à la fin du dégagement d'azote en présence de NaCl	80-90 %	157
	Le bisdiazonium est simultanément mis en contact avec l' ²¹¹ At et une protéine pendant 1 h à 20 °C.	50-55 % de protéine marquée	161

III.1.1.3. Echange d'halogène

L'échange d'halogène est un procédé nucléophile qui est connu depuis longtemps en chimie organique. Dans le cas de l'astatation, l'halogène partant est le plus souvent l'iode, en raison de son caractère nucléofuge plus marqué que les autres halogènes. Cependant, la polarité de l'astate et de l'iode étant très proches, séparer le produit d'arrivée du précurseur iodé de départ est une tâche difficile. Le mélange obtenu *in fine* est donc composé de ces deux produits, diminuant l'A_m du radiopharmaceutique. Cela peut représenter un problème dans le cas où les récepteurs correspondants au vecteur sont présents en faible concentration à la surface des tumeurs. Pour cette raison, le brome est parfois employé à la place de l'iode afin de permettre une séparation plus facile entre le produit de départ et le produit d'arrivée. Un autre inconvénient est la haute température nécessaire pour réaliser la réaction, supérieure à 100 °C. Par conséquent, cette méthode ne peut être appliquée qu'avec des substrats thermorésistants.

En dépit de ces limitations, l'échange d'halogène reste une méthode de choix car elle permet d'obtenir de bons rendements en un temps relativement court. La réaction peut être aidée par l'utilisation d'éthers couronnes qui augmente le caractère nucléophile de l'halogène^{162,163}, ou par l'utilisation d'un catalyseur au cuivre I^{164,165} (réaction de Finkelstein aromatique catalysée au cuivre). Le mécanisme de cette dernière réaction peut avoir plusieurs possibilités, mais la plus probable passe par une première étape d'addition oxydante sur le cuivre I, suivie d'une élimination réductrice (schéma 5)¹⁶⁶.

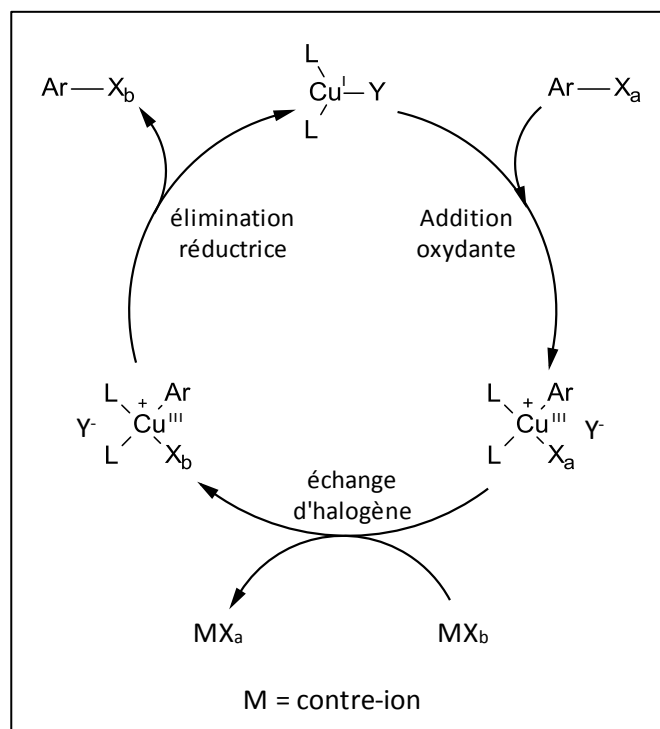


Schéma 5. Mécanisme de la réaction de Finkelstein aromatique catalysée au cuivre I.

Des exemples de composés obtenus par cette méthode sont présentés dans le tableau 4 :

Tableau 4. Exemples de composés astatés obtenus par échange d'halogène.

Produit	Conditions	RRC	Référence
	Obtenu à partir du dérivé iodé en présence d'éther couronne après 30 min à 100 °C.	72 ± 10 %	163
	Obtenu à partir du dérivé iodé en présence de CuSO ₄ , SnSO ₄ , acide gentisique et acide citrique, après 60 min à 120 °C.	67 - 80 %	167

III.1.1.4. Halogénodémétallation électrophile

L'introduction de l'astate-211 électrophile par démétallation sur des cycles aromatiques reste la méthode de radiomarquage la plus répandue. Les métaux utilisés dans ce procédé sont ceux appartenant au groupe IV, à savoir le mercure, l'étain, le silicium et le bore (schéma 6).

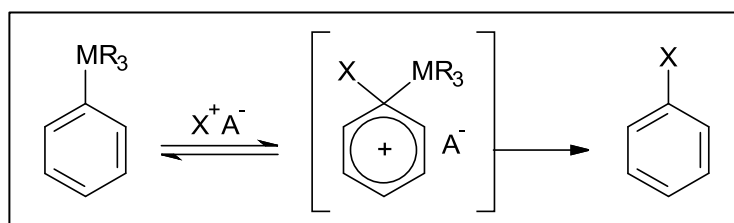


Schéma 6. Mécanisme d'halogénodémétallation.

La réaction fonctionnant rapidement en conditions douces, elle peut être appliquée à une large variété de substrats. Cette efficacité est due à la faiblesse de la liaison carbone-métal (tableau 5).

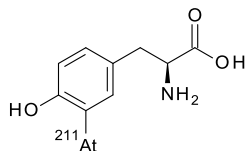
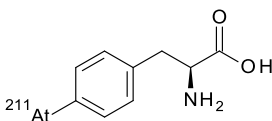
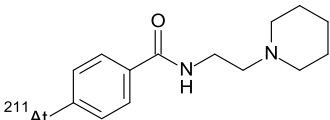
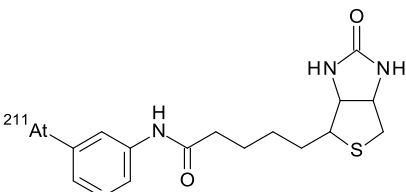
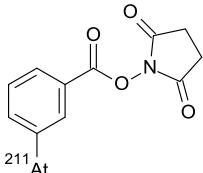
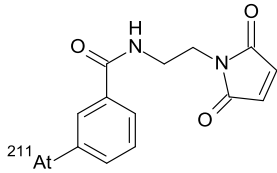
Tableau 5. Energies relatives des liaisons carbone-métal par rapport à la liaison carbone-hydrogène ($E_{C-H} = 418,8 \text{ kJ/mol}$)¹⁶⁸.

M	Energie de liaison relative C-M
B	0,89
Si	0,72
Sn	0,54
Hg	0,27

C'est tout naturellement avec le métal possédant l'énergie de liaison métal-carbone la plus faible qu'ont été initiés les premiers radiomarquages à l'astate-211^{153,169,170}. Cependant, ils ont vite été écartés en raison de la toxicité des composés organomercuriques. En effet, le radiopharmaceutique obtenu contient des traces de mercure résiduel, même après purification. De plus, les organomercuriques sont des composés dangereux à manipuler. Ces limites les rendant moins attractifs pour une application en clinique, ils ont été délaissés au profit des autres métaux en particulier l'étain et le silicium. Les composés organostanniques sont la deuxième meilleure alternative après le mercure en raison de la faible énergie de liaison carbone-métal, ce qui en fait d'excellents groupements partants. De plus, ils sont faciles d'accès grâce à de nombreuses voies de synthèses connues. Les premières astatodéstannylation sont réalisées en 1986 par Milius *et al* pour la synthèse de l'acide *p*-[²¹¹At]astatobenzoïque et le 3-[²¹¹At]astatotampxifen¹⁷¹. Devant l'efficacité de la réaction qui fonctionne rapidement et dans des conditions douces, les organostanniques se sont imposés comme étant la principale méthode pour l'astatation de molécules organiques, notamment pour la synthèse de précurseurs permettant l'accès au radiomarquage de protéines (tableau 6). Dans ce domaine, on peut citer la synthèse de l'astatobenzoate de *N*-succinimidyle (SAB) qui s'additionne sur les lysines par

substitution nucléophile¹⁷² (tableau 6 entrée 5) ou encore celle du 3-[²¹¹At]astato-*N*-[2-(maléimido)éthyl]benzamide utilisé pour le radiomarquage de protéines *via* les cystéines par addition de Michael du thiol sur le maléimide¹⁷³ (tableau 6 entrée 6).

Tableau 6. Exemples de molécules astatées obtenues par démétallation électrophile.

Entrée	Produit	Conditions	RRC	Référence
1		A partir de l'organomercurique. Obtenu en 5 min en présence de HgSO ₄ , NaCl, KI ₃ en milieu acide.	60-80 %	153
2		A partir de l'organosilicium. ²¹¹ At oxydé par du NCS ^g en milieu acide. Obtenu en 10 min à 70 °C	64-75 %	174
3		A partir de l'organostannique. ²¹¹ At oxydé par la chloramine-T. Réaction 25 min à température ambiante	72 %	175
4		A partir de l'organostannique. ²¹¹ At oxydé par NCS Réaction 20 secondes.	80 %	176
5		A partir de l'organostannique. Obtenu en 30 min à 25 °C. en présence de <i>tert</i> -butylhydroperoxyde en milieu acide.	95 %	172
6		A partir de l'organostannique. ²¹¹ At oxydé par du NIS ^h . Obtenu en 10 min à 25 °C en présence d'acide acétique.	75 %	173

Si la toxicité des composés stannylés est moins prononcée qu'avec le mercure, elle reste néanmoins importante. Même si elle tend à être légèrement réduite par l'utilisation du tributylétain plutôt que le triméthylétain en raison de sa toxicité plus faible pour une réactivité équivalente, le

^g *N*-chlorosuccinimide

^h *N*-iodosuccinimide

précurseur de départ doit être séparé efficacement du composé astaté final. La purification par HPLC est généralement celle employée et permet d'obtenir le produit final avec une excellente pureté. Cependant on peut noter l'apparition d'autres méthodes afin de simplifier la purification, notamment l'utilisation d'un précurseur organostannique supporté. Cette méthode a été utilisée pour la synthèse du *m*-[²¹¹At]astatobenzylguanidine ([²¹¹At]MABG), une molécule d'intérêt pour le traitement du neuroblastome¹⁷⁷ (schéma 7).

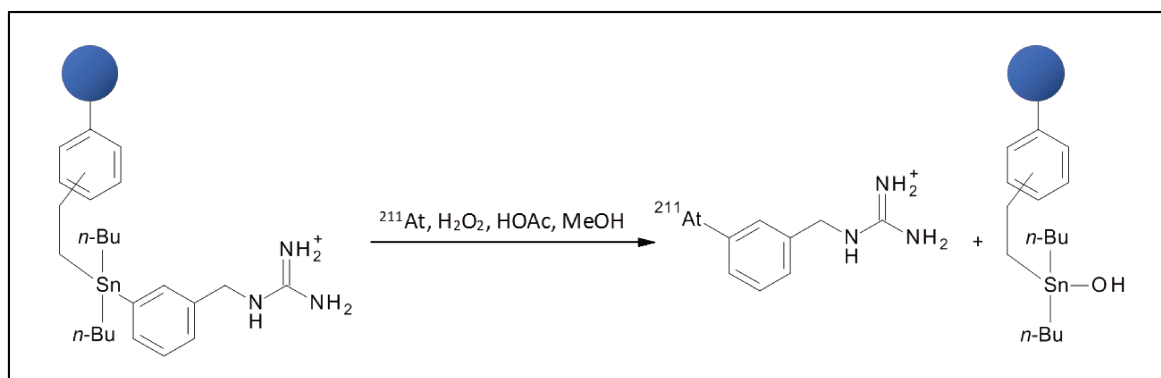


Schéma 7. Synthèse supportée de l'astatobenzylguanidine ([²¹¹At]MABG).

Le précurseur peut être ainsi éliminé par une simple filtration et le produit final est obtenu avec un RRC satisfaisant (63 ± 9 %) et un taux d'étain résiduel inférieur à 1 ppm. Plus récemment, des liquides ioniques supportés ont été utilisés pour la synthèse du SAB avec des halogènes lourds¹⁷⁸ (Schéma 8).

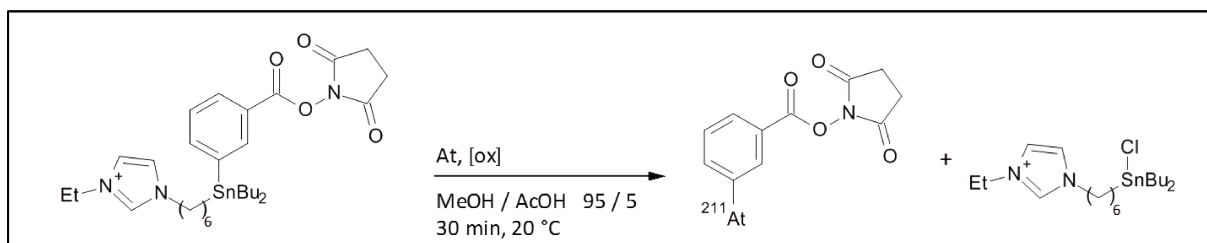


Schéma 8. Synthèse du SAB par la méthode des liquides ioniques.

Là encore, la purification se fait simplement par filtration sur une cartouche de gel de silice, ce qui permet un gain de temps considérable par rapport à l'HPLC, et occasionne moins de perte de radioactivité. Le SAB est obtenu avec un rendement de 64 % et une pureté radiochimique de 91 % et a pu être utilisé dans le radiomarquage de l'anticorps murin 9E7.4 anti-CD138.

III.1.1.5. Sels d'iodonium

Depuis leur découverte en 1886 par Willgerodt, l'intérêt pour les composés de l'iode hypervalent n'a cessé d'augmenter. Les composés d'iode III peuvent présenter des réactivités similaires aux métaux de transitions tels que les complexes de mercure, plomb ou palladium. Ils présentent l'avantage d'être moins coûteux que ces derniers, en plus d'être moins toxiques. Parmi les différentes classes des composés à base d'iode (III), celle des sels d'iodonium, découverte en 1894 par Hartmann et Meyer, est la plus investiguée. Leur structure pauvre en électron en fait un groupement partant efficace pour une substitution nucléophile. Classiquement, ils sont synthétisés en une réaction one-pot qui consiste à oxyder le composé iodé correspondant, typiquement avec du *m*-CPBA, conduisant à l'aryliodane, suivi par un échange de ligand réalisé avec un arène en milieu acide. L'acide utilisé fournit généralement le contre-ion au sel d'iodonium (schéma 9).

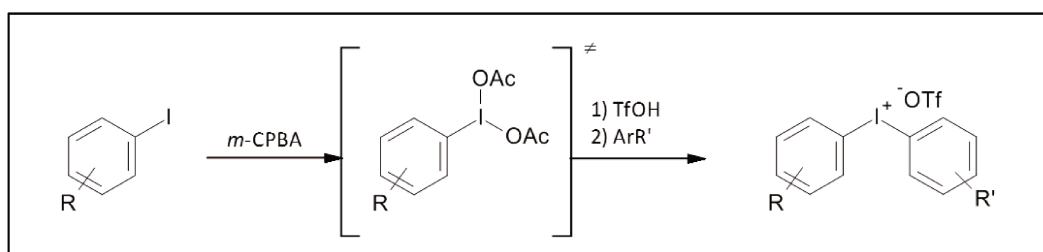
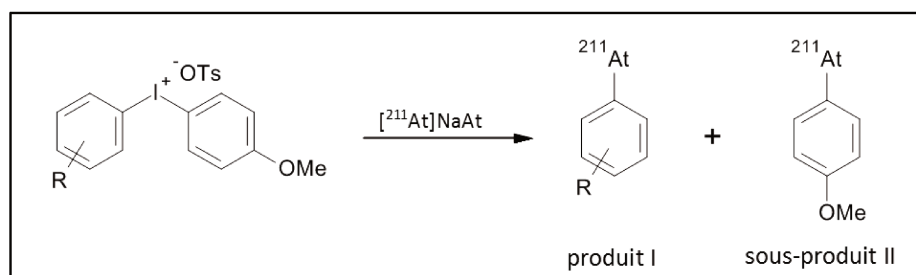


Schéma 9. Synthèse d'un sel de biaryliodonium.

Bien que l'idée d'utiliser les sels d'iodonium pour l'halogénéation nucléophile d'aromatiques date des années 50^{179,180}, ce n'est qu'à partir de la fin des années 90 qu'ils ont été utilisés pour la chimie de radiomarquage, à commencer par le fluor-18¹⁸¹⁻¹⁸⁴.

Ce n'est que bien plus récemment que cette chimie a été développée dans notre groupe pour l'astatation par Guérard *et al*¹⁸⁵. L'efficacité de cette méthode a été démontrée avec des taux de conversion radiochimique quasi quantitatifs sur plusieurs composés aromatiques pauvres et riches en électrons en 30 min à 90 °C (tableau 7). Ils sont purifiés par une simple filtration sur Sep-pak, ce qui est un grand avantage par rapport à toutes les méthodes qui requièrent une purification par HPLC, générant moins de perte et étant plus rapide.

Tableau 7. Astatation par la voie des sels de biaryliodonium.



Entrée	R	Conditions	RRC (I + II)	Ratio I/II	Référence
1	H	30 min à 90 °C	97 ± 1 %	4,2/1	185
2	<i>p</i> -Me	30 min à 90 °C	97 ± 1 %	2,0/1	185
3	<i>o</i> -Me	30 min à 90 °C	98 ± 1 %	8,1/1	185
4	<i>p</i> -NO ₂	30 min à 90 °C	99 ± 1 %	29/1	185
5	<i>m</i> -CONHS	30 min à 100 °C	99 %	16/1	186

Les RRCs sont déterminées par HPLC du produit brut

Cette technologie est maintenant classiquement utilisée dans notre laboratoire pour réaliser le radiomarquage d'anticorps par l'intermédiaire du SAB¹⁸⁶. Plus récemment, elle a également permis le radiomarquage à l'astate-211 d'une tétrazine et d'un azoture de benzyle, deux fonctions bio-orthogonales qui ont par la suite été couplées par chimie click à des anticorps pré-modifiés avec les fonctions complémentaires¹⁸⁷.

L'inconvénient principal des sels d'iodonium est la formation d'un produit secondaire. La réaction de substitution nucléophile se fait de façon préférentielle sur le cycle aromatique le plus appauvri en électron. Si une solution à ce problème serait d'utiliser un sel d'iodonium symétrique, elle n'est pas appliquée en radiochimie car ils seraient plus difficiles et plus coûteux à produire dans le cas de la synthèse de composés d'intérêts complexes. De plus, chaque réaction de substitution nucléophile sur le sel d'iodonium formerait en parallèle le même analogue iodé issu de l'élimination réductrice, extrêmement difficile, voire impossible, à séparer du composé astaté, impactant négativement l'activité spécifique (A_s)ⁱ du produit radiomarké formé. C'est pourquoi les sels d'iodonium dissymétriques sont préférés et afin d'orienter la réaction, le deuxième cycle aromatique étant doté de préférence d'un substituant électrodonneur. La limite de cette méthode est que la sélectivité est grandement diminuée si le cycle cible de la substitution nucléophile est également riche en électrons, comme le montre l'entrée 2 du tableau 7.

ⁱActivité par unité de masse d'une molécule radiomarkée exprimée en Bq/mg

La substitution nucléophile sur les sels d'iodonium est également sujette aux effets *ortho*, qui oriente la substitution préférentiellement sur le cycle comportant un substituant en *ortho*, comme le montrent les entrées **2** et **3** du tableau 7. Ceci peut s'expliquer par le mécanisme de la réaction qui a été proposé par Chun *et al*¹⁸⁸ (schéma 10).

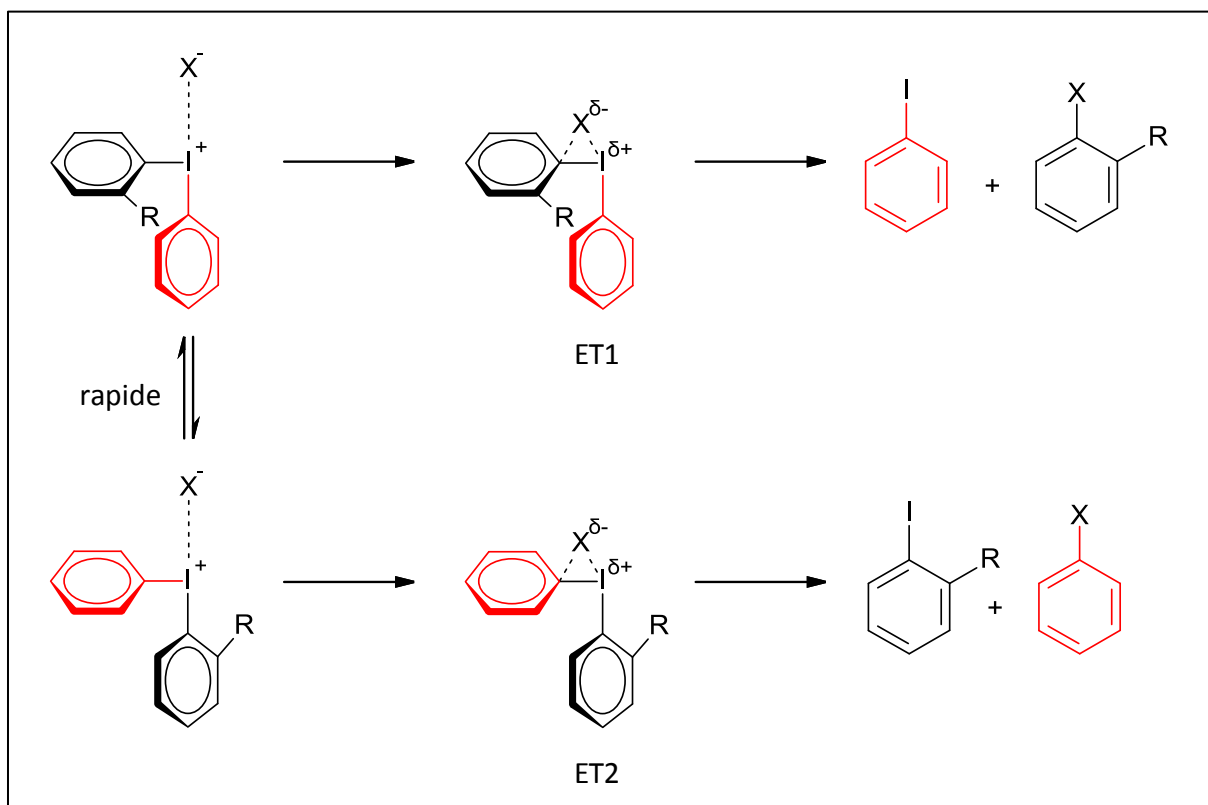


Schéma 10. Mécanisme d'halogénéation via les sels de biaryliodonium.

Dans son état de transition, le sel d'iodonium adopte une symétrie bipyramidale trigonale. Le nucléophile attaque uniquement le carbone du cycle en position équatoriale. Deux conformations sont alors possibles et peuvent s'échanger rapidement. Chun *et al* montrent que la réaction obéit au principe de Curtin-Hammett selon lequel lorsque plusieurs conformations sont possibles, la sélectivité dépend de la différence d'énergie libre entre les deux états de transition mis en jeu si les vitesses de réactions sont plus lentes que les vitesses d'interconversions conformationnelles. Or, les groupements plus encombrés, notamment par un substituant en *ortho*, se placeront préférentiellement en position équatoriale, moins encombrées¹⁸⁹. Par conséquent, l'état de transition 1 (ET1) sera de plus faible énergie que l'état de transition 2 (ET2), ce qui explique la sélectivité pour les cycles *ortho*-substitués. Ce mécanisme a pu être proposé lors de l'étude du radiomarquage de sels d'iodonium au fluor-18. Cependant, comme l'effet *ortho* semble également avoir une influence pour le radiomarquage à l'iode radioactif et à l'astate-211, il paraît alors raisonnable de penser que ce mécanisme s'opère également pour ces halogènes.

III.1.1.6. Les dérivés du bore

L'utilisation des dérivés du bore tels que les esters boroniques, les acides boroniques ou encore les trifluoroborates de potassium sont un bon moyen pour le radiomarquage avec des halogènes. Ils présentent l'avantage d'être des fonctions efficaces pour le radiomarquage de cycles aromatiques aussi bien enrichis qu'appauvris en électrons, d'être des composés stables et de moindre toxicité.

Les acides boroniques sont généralement obtenus à partir de l'organomagnésien ou de l'organolithien correspondant par réaction avec le borate de triméthyle ou le borate de triisopropyle, suivi d'une hydrolyse. Une autre méthode est la catalyse au palladium en faisant réagir un précurseur possédant un groupement partant et du tétrahydroxydiborate. Cette stratégie sert également à synthétiser les esters boroniques, en utilisant par exemple le 4,4,5,5-tetraméthyl-1,3,2-dioxaborolane, ou le bis(pinacolato)diborane comme source de bore pour la synthèse de l'ester pinacolique, le plus répandu. Quant aux trifluoroborates de potassium, ils sont obtenus par réaction de l'acide ou de l'ester boronique correspondant avec KHF_2 ¹⁹⁰ (Schéma 11).

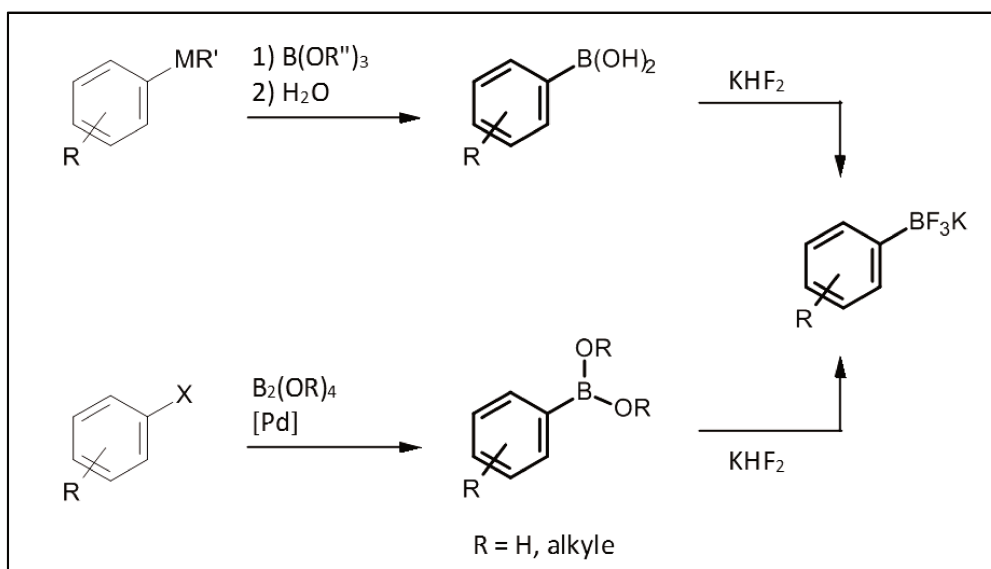


Schéma 11. Synthèses des acides/esters boronique et trifluoroborates de potassium.

La radiohalogénéation de ce type de composés a commencée dans les années 80s. Si la voie électrophile a été la première étudiée, permettant le radiomarquage au fluor¹⁹¹⁻¹⁹⁴ et à l'iode^{195,196}, ce n'est que plus récemment qu'une méthode nucléophile a vu le jour, en s'inspirant du couplage de Chan-Lam. Ce dernier permet de créer des liaisons C-hétéroatome à partir d'acides arylboroniques et de ses dérivés en présence d'un catalyseur au cuivre¹⁹⁷. De nombreuses études mécanistiques ont été menées sur ce couplage. Cependant, le mécanisme de la réaction s'avère substrat dépendant¹⁹⁸⁻²⁰⁰. Par conséquent, un mécanisme général ne peut pas être établi, même si des similitudes ressortent. Si aucun mécanisme définitif n'a encore été confirmé pour les halogènes, plusieurs études menées avec

le fluor donnent quelques pistes. Casitas *et al*²⁰¹, suivis de Yao *et al*²⁰², mettent en évidence que les complexes de cuivre III géométriquement contraint permettent de réaliser la radiofluoruration nucléophile des arènes. Cet intermédiaire est retrouvé dans des études menées par la suite pour la radiofluoruration *via* des trifluoroborates mené par Ye *et al*, qui proposent un mécanisme pour la réaction²⁰³. Lors de l'application aux esters boroniques, Fier *et al* retrouvent également cette forme de cuivre III en partant d'un catalyseur de cuivre I et évoquent une élimination réductrice qui permet d'obtenir le composé final¹⁹⁴. De plus, ils démontrent que l'addition du ligand sur le catalyseur s'opère avant la transméallation de l'ester arylboronique. Lors de l'application au fluor-18, Taylor *et al* démontrent que la présence d'air est bénéfique à la réaction, ce qui indique que le catalyseur de cuivre II utilisé peut être directement oxydé. Cependant, une autre possibilité serait qu'il y ait une réaction de dismutation du cuivre II en cuivre III/cuivre I²⁰⁴ (Schéma 12).

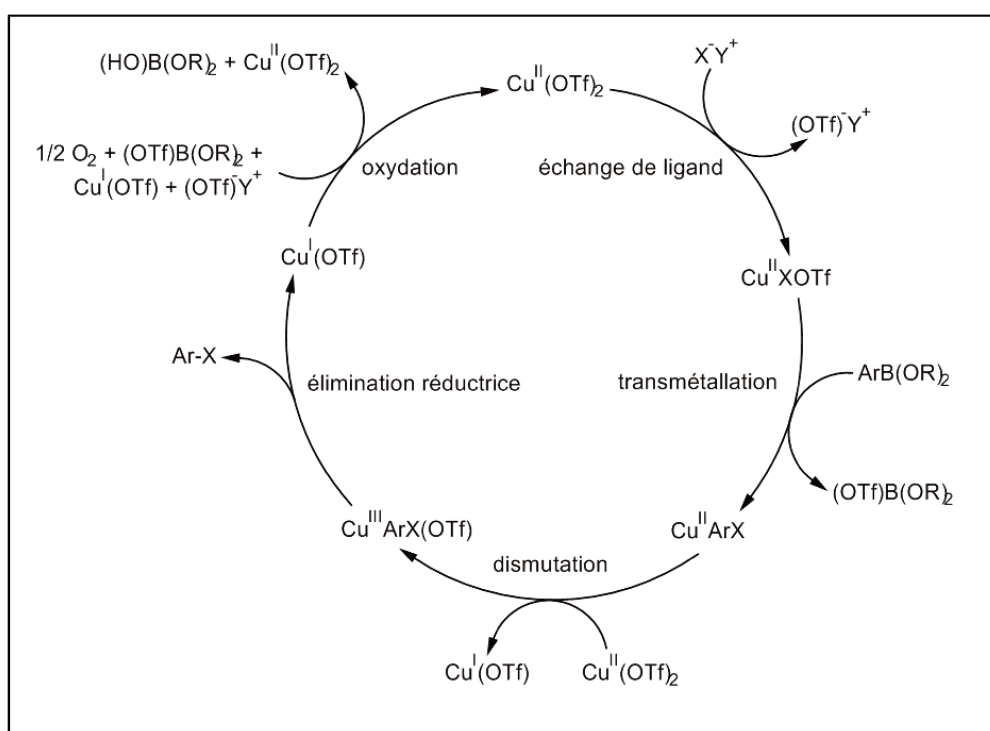


Schéma 12. Mécanisme proposé de l'halodéboronation catalysée au cuivre II.

Ces travaux servent de base pour la radiohalogénéation et en 2014, Tredwell réalise la radiofluoruration de plusieurs composés aromatiques par l'utilisation des acides et esters boroniques en mettant en évidence l'importance de la présence de pyridine dans la réaction. Cette méthode a l'avantage d'être applicable à des composés aussi bien riches que pauvres en électrons, des RRCs jusqu'à 85 % ayant été obtenus^{205,206}.

Les acides et esters boroniques ont par la suite été utilisés pour la radioiodation. Wilson démontre la faisabilité de la méthode en marquant notamment des composés d'intérêts pour la

médecine nucléaire radiomarqués à l'iode-123²⁰⁷. Il réalise la synthèse du 6-[¹²³I]iodo-2-(4'-diméthylamino)phénylimidazo[1,2-*a*]pyridine ([¹²³I]IMPY) avec un RRC de 78 % qui est une nette amélioration par rapport à ceux qui ont pu être obtenus avec la méthode des organostanniques (20 – 60 %), ainsi que le *N,N*-diéthyl-2-(2-(3-[¹²³I]iodo-4-méthoxyphényl)-5,7-diméthylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acétamide ([¹²³I]DPA-713) avec un RRC de 88 %.

D'autre part, Zhang *et al*, qui travaillent sur l'iode-131, se basent sur les travaux de Partridge et Hartwig qui réalisent l'iodation non radioactive de composés aromatiques à partir d'esters boroniques à l'aide d'un catalyseur au cuivre I en présence de phénantroline²⁰⁸. Ces conditions sont réadaptées à la radiochimie afin d'obtenir un large panel de composés aromatiques avec des conversions quantitatives à partir de l'acide arylboronique correspondant²⁰⁹. Ils réalisent notamment la synthèse du [¹³¹I]4-iodobenzoate de *N*-succinimidyle (SIB) permettant l'accès au radiomarquage des protéines.

C'est plus récemment que les radiomarquages à l'astate-211 utilisant les esters et acides boroniques sont mis au point par Reilly *et al*²¹⁰. Divers composés aromatiques astatés sont synthétisés avec des conversions totales ou quasi totales en seulement 10 minutes de réaction à 23 °C, dont la molécule SAB permettant le radiomarquage à l'astate-211 des protéines (schéma 13).

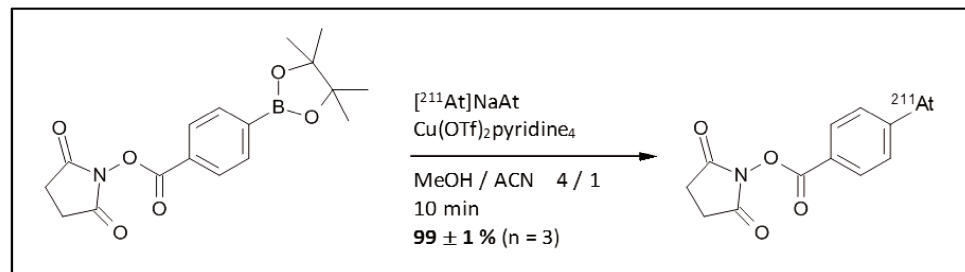


Schéma 13. Synthèse du SAB par la voie des esters boroniques (RRC mesuré par radio-HPLC à partir du brut réactionnel).

III.1.1.7. L'utilisation du SAB dans le radiomarquage de protéines

L'affinité de l'iode sous sa forme I^+ pour les groupement tyrosines et histidines permet de facilement radioioder les protéines par $\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$. Les propriétés de l'astate et de l'iode étant proches, Aaij tente en 1975 d'appliquer cette méthode pour le radiomarquage à l'astate-211 de protéines²¹¹, mais la liaison formée s'est avérée être instable *in vivo*⁶¹. S'il a tout d'abord été soupçonné que cette instabilité était due à la faible énergie de liaison formée entre l'astate et le carbone des histidines et tyrosines^{212,213}, Visser *et al* ont suggéré que l'astate se fixe plutôt sur les cystéines, formant des liaisons S-At facilement hydrolysables *in vivo*^{153,214}. Ceci a conduit à la conclusion que le radiomarquage direct de protéines en utilisant une voie électrophile est difficilement envisageable. Le radiomarquage de protéines en deux étapes a alors été favorisé et a conduit à la création de petites molécules organiques

bifonctionnelles permettant d'une part l'introduction de l'astate-211 et d'autre part le couplage à la protéine. La méthode d'astatation de protéines la plus utilisée a été développée par Zalutsky, qui utilise des précurseurs de type trialkylstannane fonctionnalisés par un groupement ester de *N*-succinimide permettant la formation de l'astatobenzoate de *N*-succinimide (SAB), la fonction ester activée en *para* ou *méta* permettant le couplage aux lysines des protéines^{172,215} (schéma 14).

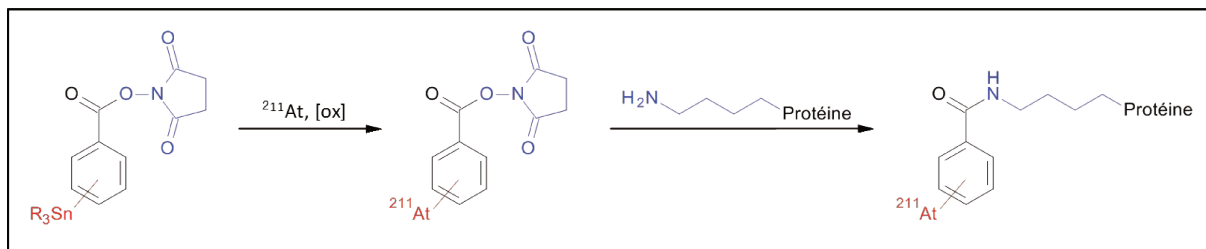


Schéma 14. Radiomarquage de protéines via la méthode SAB décrite par Zalutsky et al.

Cette méthode a permis l'accès à de nombreux anticorps ou fragments d'anticorps radiomarqués (tableau 8).

Tableau 8. Exemples d'anticorps radiomarqués à l'astate-211 via la méthode de Zalutsky.

Nom	Catégorie	Cible(s)	Référence
C110	IgG	Carcinome embryonnaire	216
A6H	F(ab') ₂	Carcinome rénal	217
81C6	IgG	Gliome	172
MOv18	IgG	Carcinome ovarien	218
MX35	F(ab') ₂	Cancer ovarien	146

Le SAB présente l'avantage d'être facile d'accès, de pouvoir être obtenu avec d'excellents rendements radiochimiques et sa petite taille permet de limiter le risque d'altération de la fonction du vecteur auquel on le couple. Cependant, il est sujet au phénomène de désastatation *in vivo*. Si cela a tout d'abord pu être attribué à la faiblesse de la liaison C-At²¹⁹, ou par action enzymatique²²⁰, il a été suggéré à l'aide de modélisation moléculaire couplée à des données expérimentales sur un composé modèle (l'astatobenzoate d'éthyle) que l'astate était plus sujet que l'iode à l'oxydation provoquée dans les lysosomes^j. Cette oxydation conduit à une diminution de l'énergie de liaison C-At (passe de 44,6 à 28,2 kcal/mol) et entraîne une réaction de déshalogénéation oxydante²²¹ (schéma 15) :

^j Organite cellulaire contenant de puissants oxydants appartenant à la famille des radicaux oxygénés libres (en anglais Reactive Oxygen Species, ROS)

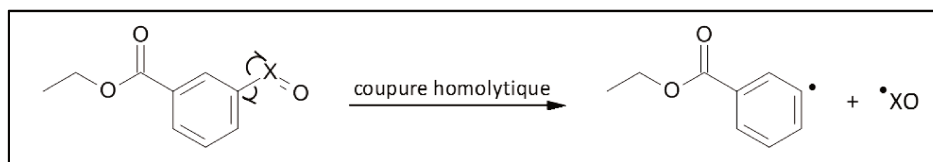


Schéma 15. Mécanisme de déshalogénation oxydante.

Ce mécanisme expliquerait pourquoi la désastatation est observée *in vivo* malgré son absence *in vitro* et qu'elle soit variable suivant le vecteur utilisé. En effet, cette instabilité est assez minime dans le cas des anticorps entiers non internalisés mais est amplifiée sur des vecteurs plus rapidement métabolisés, de plus petite taille, comme des petites molécules organiques¹⁷⁵, des peptides²²² ou encore des fragments d'anticorps F(ab')₂²¹⁶ ou Fab²²³. De nombreuses études ont été conduites pour tenter de renforcer la stabilité. Des essais cherchant à faire varier la position de l'astate-211 ont été réalisés²²⁴. Un autre axe de réflexion est de travailler sur le cycle aromatique en y ajoutant un hétéroatome afin de modifier la nature électronique²²⁵. Un autre point possible est d'enrichir le cycle aromatique en électrons en éloignant le groupement électroattracteur qui permet le couplage à la protéine. Le laboratoire de Brechbiel a notamment développé le linker *N*-(4-[²¹¹At]astatophénéthyl)succinimate de *N*-succinimidyle (SAPS) et sa version *N*-méthylée (Methyl-SAPS) (figure 15)^{224,226,227}. L'ajout de groupements en *ortho* de l'astate-211 a également été envisagé, soit avec des groupements électrodonneurs encombrants permettant théoriquement de limiter le mécanisme de déshalogénation^{224,228–231}, soit par des fonctions de type éther ou thioéther, dont le doublet de l'hétéroatome à proximité de l'halogène est supposé apporter une stabilisation supplémentaire²²⁶ (figure 15). Cependant, les études de ces composés n'ont pas montré d'impact positif sur la stabilité des produits formés.

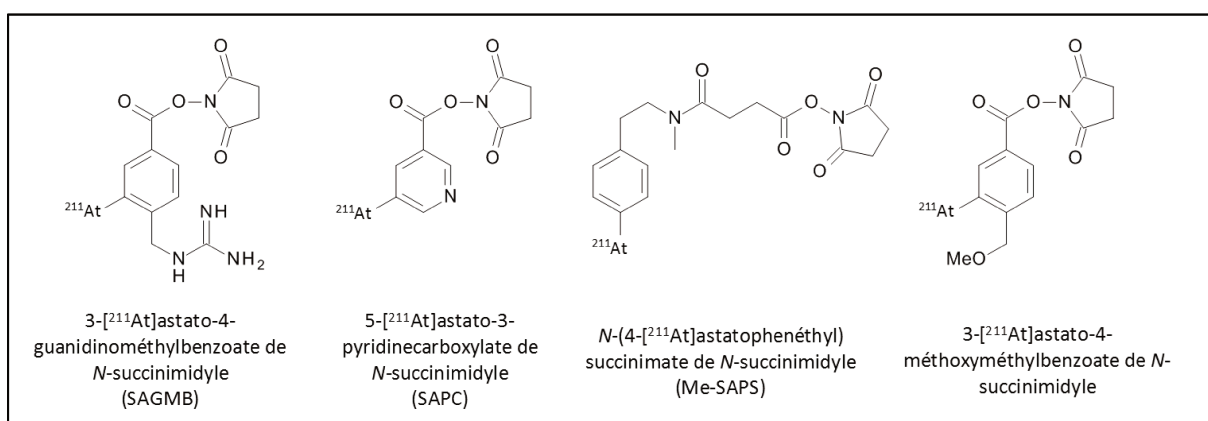


Figure 15. Exemple de linkers alternatifs au SAB.

Aucun de ces linkers n'a été capable d'augmenter suffisamment la stabilité pour influencer sur le phénomène de déshalogénation. C'est pourquoi des alternatives à la liaison carbone-astate ont été envisagées.

III.1.2. La liaison Bore-Astate

Les cages de bores sont des complexes connus dans la médecine pour la boroneurothérapie qui repose sur les réactions nucléaires provoquées par l'irradiation des atomes de bores par un flux de neutrons thermiques de basse énergie pour traiter les cellules cancéreuses²³². Ce n'est que depuis les années 1990s que leur potentiel pour le radiomarquage avec les halogènes lourds a été exploité^{233–235}. En effet, l'énergie de dissociation de la liaison bore-iodo (381 ± 21 kJ/mol) étant supérieur à l'énergie de la liaison carbone-iodo (222 ± 12 kJ/mol), il paraît raisonnable de penser qu'il en sera de même pour l'astate, ce qui représenterait une alternative à la liaison carbone-astate avec potentiellement une meilleure stabilité. Des composés de types carborane, décaborate ou dodécaborate radiomarqués d'abord à l'iode radioactif, puis à l'astate-211 ont ainsi fait leur apparition (figure 16).

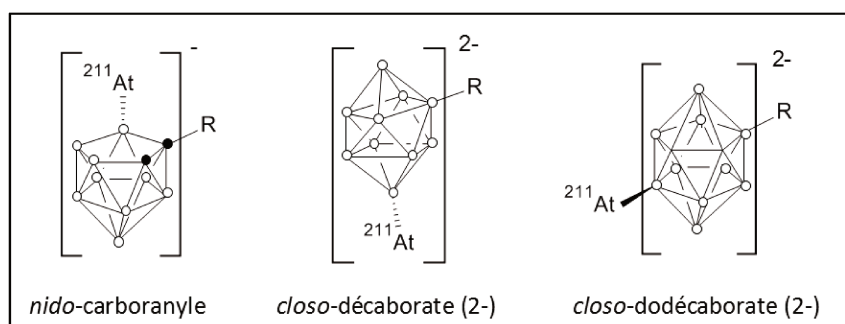


Figure 16. Cages de bores radiomarquées à l'astate-211 (○ bore, ● carbone).

Un aspect intéressant de ce type de composé est l'orthogonalité de réactivité entre les atomes de bore et de carbone. En effet, les bores sont des sites réactifs aux électrophiles, avec une réactivité semblable aux carbones aromatiques. L'astate-211 est donc introduit sous la forme At^+ , généralement obtenue par l'action de chloramine T, avec des conversions radiochimiques pouvant aller jusqu'à 84 % en 5 minutes²³⁶. D'un autre côté, les protons liés aux carbones de ces cages sont légèrement acides (pka compris entre 22 et 27 suivant la position des carbones). Par conséquent, les carbones peuvent être déprotonés afin de réagir de façon nucléophile, ce qui permet de lier ces cages à des composés d'intérêts.

Les études *in vivo* ont démontrées une meilleure stabilité des liaisons formées par rapport aux liaisons carbone-astate, limitant ainsi le phénomène de désastatation²³⁷. Des études théoriques plus récentes ont confirmé la force de ces liaisons avec des enthalpies de liaison supérieures aux liaisons carbone-astate²¹⁹ (tableau 9).

Tableau 9. Enthalpies de liaisons C-At et B-At (kcal/mol).

Espèce X	Enthalpie de liaison
C_6H_5At	42,9
$nido-[9-At-7,8-C_2B_9H_{11}]^-$	66,1
$closo-[2-AtB_{10}H_9]^{2-}$	79,1

Le radiomarquage de protéines par les cages de bore a été beaucoup étudié, que ce soit sur des anticorps¹²⁴, ou sur des vecteurs plus petits tels que des Fab'²³⁸ ou encore des peptides²³⁴. Le radiomarquage des protéines par cette voie a l'avantage de pouvoir se faire de manière directe en des temps de réaction très courts (30 secondes à 10 minutes) avec des RRC pouvant dépasser les 80 %²³⁹. Les études *in vivo* menées ont démontré la stabilité de ce type de composé, avec beaucoup moins d'activité accumulée dans les organes cibles de l'astate libre (estomac, poumons, rate, thyroïde). En revanche, le caractère plus lipophile par rapport à un aryle, ou la charge présente dans le cas des décaborates modifie le profil pharmacocinétique du vecteur dans la plupart des cas^{240,241}. Dans certaines conditions, les *nido*-carboranyles peuvent même former des agrégats. Les candidats les plus prometteurs qui permettent de limiter au plus cette altération du vecteur sont les composés de type *closo*-décaborates(2-)^{236,239} (figure 17). On dénote tout de même une accumulation de l'activité plus importante dans le foie et les reins par rapport au SAB avec ce type de composés.

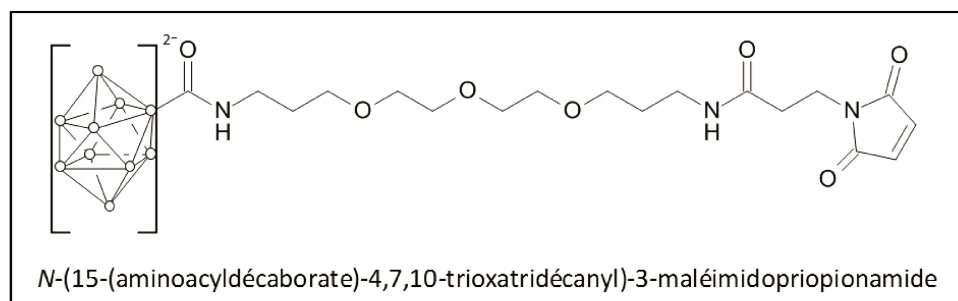


Figure 17. maléimide *closo*-décaborate(2-).

III.1.3. Complexes métalliques

En 1963, Pearson émet sa théorie HSAB selon laquelle les bases et les acides peuvent être rangés dans les catégories molles et dures¹⁰⁵. On peut espérer que de façon similaire à l'iode, l'astate sous sa forme anionique peut agir comme un ligand mou, et de ce fait il pourrait être capable de se lier à des métaux mous tels que Hg^{2+} , Pt^{2+} , Rh^{3+} , Ir^{3+} , etc pour former des complexes stables. Cette propriété est démontrée pour la première fois par Pruszyński *et al* en 2006 qui forment le complexe $Hg(OH)At$ par échange d'ion. Une stabilité supérieure du complexe astaté (constante de stabilité $\log K_1 = 5,4$) a été obtenue par rapport au complexe iodé ($\log K_1 = 4,1$)²⁴². Puis, le même groupe synthétise

des complexes de rhodium et d'iridium astatés en utilisant un ligand thioétheré, le 1,5,9,13-tetrathiacyclohexadécane-3,11-diol (16aneS4-diol)²⁴³, décrit comme formant des complexes stables avec le rhodium III²⁴⁴ (figure 18).

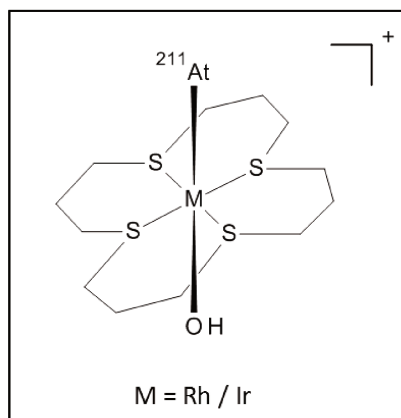


Figure 18. Complexes de Pruszyński.

Les complexes astatés peuvent être obtenus en 1h30 en chauffant à 75-80 °C pour obtenir des rendements radiochimiques autour de 80 %. Toutefois, ils sont sujets au phénomène de désastatation *in vivo*, mit en évidence par l'accumulation de l'activité dans certains organes cibles de l'astate libre, à savoir les poumons et la rate²⁴⁵.

Cette approche a été utilisée pour une étude *in vitro* de la substance P, un neuropeptide ayant une affinité pour les récepteurs NK1 présents dans les glioblastomes, le carcinome médullaire de la thyroïde, le carcinome du sein et l'astrocytome²⁴⁶. Un radiomarquage en deux étapes a tout d'abord été envisagé, par l'utilisation d'un thioéther 16aneS4 comportant une fonction acide carboxylique. La première étape consiste à former le complexe thioéther/rhodium/astate, puis l'acide carboxylique est couplé à la substance P par transformation en ester activé *in situ* (schéma 16a). Cependant, 30 h sont nécessaires pour réaliser la totalité de la procédure à l'iode-131, en grande partie à cause de l'étape d'estérification. L'application à l'astate-211 n'étant donc pas envisageable étant donné son court temps de demi-vie, un radiomarquage en une seule étape a alors été préféré (schéma 16b).

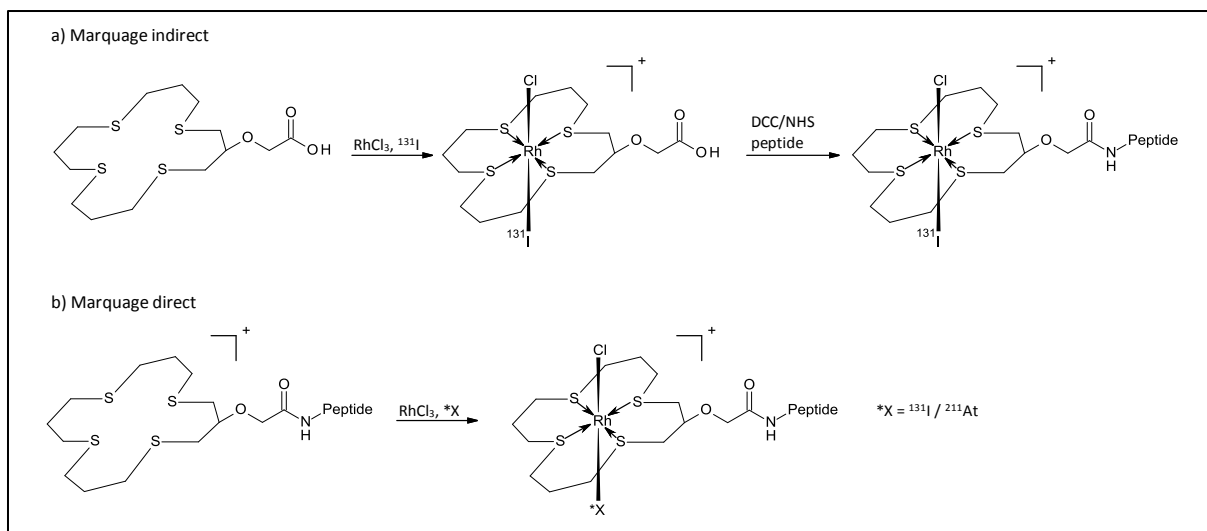


Schéma 16. Méthodes de radiomarquage via les complexes de rhodium.

Le radiomarquage de la substance P a pu être effectué en 1h – 1h30 avec un chauffage à 85 °C, conduisant à un RRC de $92,5 \pm 3,5$ %. L'étude de la stabilité en PBS et en liquide cébrospinal a montré peu de dégradation après 20 h d'incubation à 37 °C. L'étude *in vitro* de la cytotoxicité sur des cellules de gliome humaines T98G est encourageante. Aucune étude *in vivo* n'a encore été reportée à ce jour.

Rajerison *et al* se sont également intéressés à cette stratégie de liaison Rh-At et réalisent la synthèse d'un complexe de rhodium cette fois-ci à l'état d'oxydation +I, ce qui en fait un acide plus mou qu'à l'état +III. Par conséquent, la liaison formée avec l'anion astature devrait être renforcée. De plus, ils investiguent la possibilité d'ajouter à ce complexe un ligand carbène *N*-hétérocyclique (NHC), qui a un caractère σ -donneur fort et π -accepteur faible. Ce sont des ligands nucléophiles qui conduisent à des complexes extrêmement stables, peu sensibles à l'air, la chaleur ou encore à l'humidité. Ils peuvent être utilisés comme ligands d'une grande variété de métaux. De plus, leurs propriétés intrinsèques d'antimicrobien et antitumoral ont suscité un intérêt dans l'utilisation de composés pharmaceutiques²⁴⁷ (figure 19). Ce complexe est obtenu par échange de ligand entre un chlore et l'astate-211 en 5 min à 100 °C avec un RRC de 95 % et les études de stabilité ont démontré qu'aucune dégradation en sérum humain ne se produisait après 15 h à 4 et 37 °C.

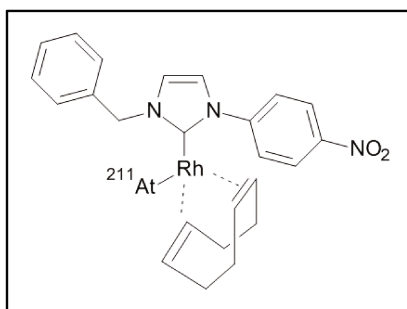
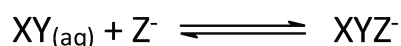


Figure 19. Complexe de rhodium de Rajerison.

III.1.4. La chimie de chélation de l'astate

L'astate sous sa forme At^+ possède des propriétés métalliques qui peuvent être utilisées afin de former des complexes. Cette forme s'est avérée agir comme un acide mou. En effet, les complexes formés avec l'astate sont d'autant plus stables que le ligand utilisé est une base molle, comme l'a notamment démontré Appelman qui a synthétisé des complexes astatés en utilisant comme base des halogénures, avec une stabilité des complexes AtX_2^- ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$) qui augmente selon l'ordre $\text{Cl} < \text{Br} < \text{I}$ (tableau 10)²⁴⁸.

Tableau 10. Constantes d'équilibres pour la formation de complexes trihalogénés d'après Appelman et al (21 – 25 °C).



Complexe XYZ^-	Constante d'équilibre K
AtCl^-	9
AtBr^-	120
AtBr_2^-	320
AtI_2^-	2000

L'étude d'autres ligands tels que $\text{C}(\text{CN})_3^-$, N_3^- ou encore SCN^- ont mené à des complexes d'une stabilité intermédiaire entre celles d' AtBr_2^- et de AtI_2^- ²⁴⁹. L'espèce AtO^+ étant également capable de former des complexes, son interaction avec les ligands Cl^- , Br^- , SCN^- et thiacalix[4]arènetetrasulfonate a été étudiée et comparée avec At^+ . Les complexes formés entre ces deux formes d'astate et les ligands présentent un ordre de stabilité similaire, ce qui démontre qu' AtO^+ possède également des propriétés d'acide mou. Cependant l'interaction est plus forte dans le cas d' At^+ , ce qui témoigne de son caractère plus mou qu' $\text{AtO}^{+66,250}$. A titre d'exemple, la constante de stabilité $\log \beta$ pour la formation d'un complexe 1 : 1 entre l'astate et le thiacalix[4]arènetetrasulfonate passe de $4,5 \pm 0,4$ pour $\text{At}(\text{I})$ à $3,3 \pm 0,3$ pour $\text{At}(\text{III})$.

Des complexes plus stables vraisemblablement sous la forme AtL_2 ont également été investigués, utilisant des ligands soufrés^{251,252}, sélénisés²⁵³ ou phosphorés²⁵⁴. Ces derniers ont vu leur intérêt être limité à cause de leur capacité réductrice qui conduit à la formation d' At^- lorsque le pH est supérieur à 2.

Mais le caractère métallique d' At^+ a réellement pu être mis en évidence par sa capacité à être complexé par des agents chélatants largement répandus pour complexer les métaux, tels que le NTA²⁵⁵, le DTPA²⁵⁶ ou l'EDTA²⁵⁷, ou encore des agents chélatants cycliques comme le DOTA ou le NOTA²⁵⁸ (figure 20).

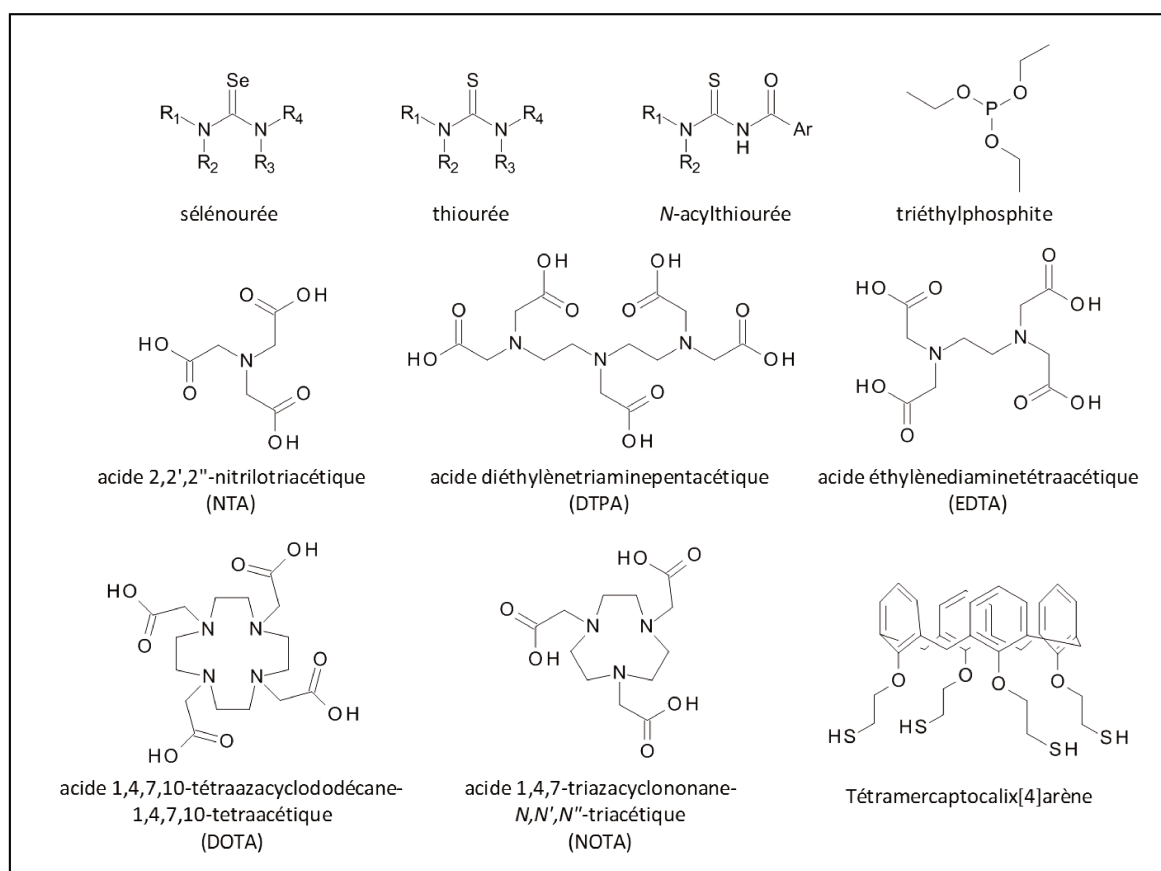


Figure 20. Exemples d'agents chélatants pouvant complexer l'astate.

Cependant, ces agents tirent leur capacité à chélater des métaux par leurs oxygènes et leurs azotes, qui sont des bases dures. La stabilité des complexes formés s'avère donc insuffisante *in vivo*, comme il a pu être démontré avec un anticorps radiomarqué à l'astate-211 avec du DTPA²⁵⁹. L'utilisation d'agents chélatants comportant des atomes de soufres, plus mous, a également été rapportée²⁶⁰. Cependant, la stabilité *in vivo* n'était pas non plus satisfaisante. On trouve également dans la littérature le radiomarquage de l'insuline qui possède plusieurs sites de complexation des métaux²⁶¹. Aucune étude *in vivo* n'a encore été reportée.

III.2. Limites actuelles des radiomarquages d'anticorps à l'astate

Malgré les avancées sur les liaisons B-At ou M-At, le radiomarquage *via* la création de liaisons C-At reste l'approche largement prédominante pour l'astatation d'anticorps. La méthode décrite par Zalutsky qui passe par la formation du SAB à partir du composé tributylétain pour réaliser le couplage de la protéine est encore aujourd'hui la plus utilisée en raison de sa facilité de mise en œuvre et de la simplicité du précurseur du SAB, le rendant facile d'accès. Cependant, elle possède des faiblesses liées à la nécessité de réaliser deux étapes de synthèse afin d'obtenir le radiopharmaceutique final (synthèse du SAB puis couplage à l'anticorps). Le SAB doit être purifié par HPLC avant d'être mis en jeu dans la réaction de couplage afin d'éliminer le précurseur qui pourrait également se coupler au vecteur. Cette purification entraîne la perte d'une partie du composé d'intérêt. De plus, l'étape de couplage qui suit n'est jamais totale en raison de la basicité nécessaire pour rendre les lysines réactives ($8 < \text{pH} < 9$). Les ions hydroxydes alors présents en solution réagissent compétitivement avec la fonction ester activée du SAB et provoquer son hydrolyse. De récents travaux menés dans notre équipe ont toutefois démontrés que le rendement de couplage pouvait être amélioré grâce à l'usage de la chimie click dans le cadre du radiomarquage à l'astate-211 et à l'iode-125¹⁸⁷. Des rendements de couplages quantitatifs sont obtenus sur une série de peptides modèles avec des cinétiques très rapides parfaitement adaptées à la demi-vie courte de l'astate-211. Le système dibenzoazacyclooctyne (DIBAC)/N₃ a notamment été appliqué pour le radiomarquage à l'astate-211 du 9E7.4, un anticorps anti-CD138, et un rendement de couplage de 90 % a pu être obtenu en moins de 40 min à température ambiante et avec la conservation de la fraction immunoréactive de l'anticorps ($82 \pm 5 \%$) par rapport à un radiomarquage effectué avec la méthode SAB ($86 \pm 2 \%$) (schéma 17).

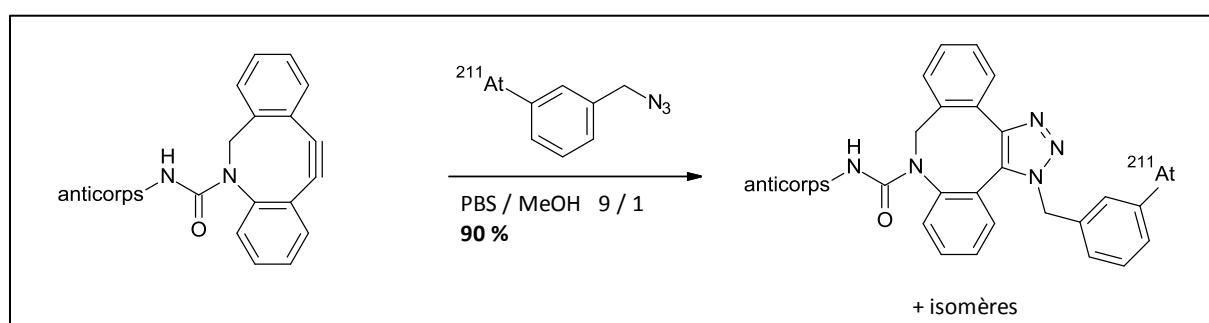


Schéma 17. Radioastatation du 9E7.4 par la chimie click avec le système DIBAC/N₃.

Une autre difficulté rencontrée par la méthode de Zalutsky réside dans la montée en échelle de l'activité nécessaire pour faire des essais cliniques. En effet, la synthèse du SAB était initialement réalisée majoritairement en chloroforme. Or, à hautes activités, les effets de radiolyse du solvant peuvent avoir un impact significatif sur la réaction dû à la formation de radicaux et de produits de leur recombinaison. Le précurseur peut alors se dégrader, ou l'astate-211 peut réagir avec les espèces

issues de la radiolyse du solvant, et des produits secondaires peuvent se former, ce qui inhibe la réaction du SAB avec la protéine^{262,263}. Conduire la synthèse dans le méthanol permet d'éviter ce problème. Cependant, on peut observer la formation de l'anion astature²⁶⁴, rendant la forme At^+ nécessaire au radiomarquage difficile à contrôler.

Afin de s'affranchir à la fois des limites liées au couplage et des problèmes de radiolyse, le radiomarquage peut être effectué directement sur un anticorps pré-modifié par des fonctions organostanniques. Cela nécessite un radiomarquage qui peut être réalisé dans un milieu qui ne serait pas dénaturant pour les protéines, donc en milieu aqueux et à une température inférieure à 42 °C. C'est ce qui a été réalisé par l'équipe de Lindegren en 2008²⁶⁵ (schéma 18).

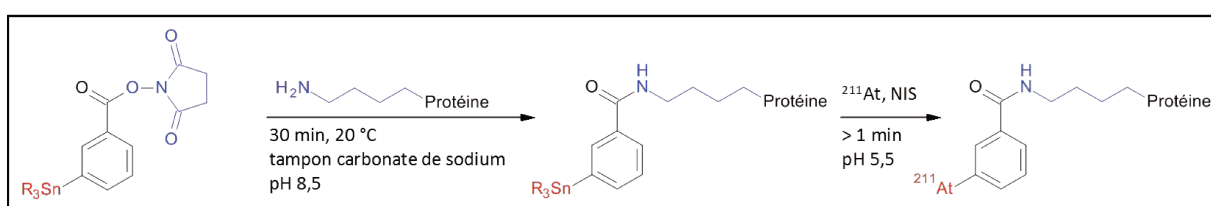


Schéma 18. Radiomarquage à l'astate-211 de protéines selon la méthode décrite par Lindegren et al.

La réaction de radiomarquage est complète presque instantanément, avec des RRC supérieurs à 70 % pour le radiomarquage du trastuzumab avec une concentration en anticorps de 0,125 mg/mL. Les fonctions organostanniques sur l'anticorps n'ayant pas réagi sont éliminées par ajout de NIS pour effectuer une réaction de démétallation électrophile. Cette réaction est ensuite arrêtée par ajout d'acide ascorbique. Après ce traitement, seulement 5 % des fonctions organostanniques sont encore présente dans la solution finale. Cette amélioration permet de s'affranchir des problèmes de perte de radioactivité liés à la purification intermédiaire du groupement prosthétique astaté et de l'étape de couplage. De plus, cette méthode n'impliquant qu'une seule étape de radiomarquage de seulement quelques minutes, le temps de la procédure mettant en jeu le radionucléide est considérablement réduit, ce qui est important pour un rendement optimal dans le cas des radionucléides possédant un court temps de demi-vie comme l'astate-211. Cela permet également de diminuer la dose absorbée par le vecteur par rapport à la méthode de Zalutsky en deux étapes qui nécessite un couplage d'au moins 30 minutes entre le SAB et l'anticorps. Le dernier avantage conséquent de cette méthode est qu'elle est plus facile à automatiser, ce qui est primordial pour une application en clinique afin de s'affranchir de l'erreur humaine et d'avoir des résultats reproductibles. L'équipe de Lindegren a démontré la faisabilité de l'automatisation de la méthode de radiomarquage en une seule étape. Elle est notamment possible grâce au fait que l'immunoconjugé nécessaire au radiomarquage peut être préparé en amont et conservé plusieurs mois²⁶⁶ ce qui ne laisse qu'une seule étape à automatiser sur un module. Après adaptation du protocole pour un transfert sur un module de synthèse²⁶⁷, la

procédure de radiomarquage d'anticorps a ensuite été entièrement automatisée, depuis l'étape de distillation de l'astate-211 jusqu'à la purification du radiopharmaceutique final¹²⁶⁸. La procédure de radiomarquage a été testée sur haute activité (> 200 MBq) sur les anticorps trastuzumab et MX35 qui ont été obtenus avec des RRCs entre 48 et 56 % suivant le solvant utilisé lors de l'élution de l'astate-211 et avec des puretés radiochimiques supérieures à 95 % et des activités spécifiques importantes (> 200 MBq/mg). L'étape de purification semble être la plus délicate, le rendement étant amélioré si elle se fait manuellement plutôt qu'automatiquement (RRC pour le trastuzumab qui passe de 55 à 64 %). La viabilité des radiopharmaceutiques obtenus a été testée *in vitro* sur des cellules SKOV3 pour le trastuzumab et OVCAR3 pour le MX35. La fraction immunoréactive (FIR) entre l'anticorps radiomarqué obtenu *via* le module ou *via* une synthèse classique reste similaire, ce qui prouve que l'immunoréactivité n'est pas altérée par ce nouveau procédé automatisé (FIR du trastuzumab radiomarqué de $0,92 \pm 0,16$ et $0,89 \pm 0,16$ par voie automatique et manuelle respectivement et $0,79 \pm 0,03$ et $0,78 \pm 0,007$ pour le MX35 radiomarqué par voie automatique et manuelle respectivement). Même si les rendements obtenus par synthèse automatisée sont inférieurs à ceux atteints en synthèse manuelle dans ce même laboratoire, ils restent meilleurs que ce qui a pu être réalisé manuellement avec la méthode de radiomarquage en deux étapes^{119,269,270}.

La méthode développée Lindegren a apporté une amélioration conséquente à celle de Zalutsky. Cependant elles se basent toutes les deux sur la même chimie, qui n'est pas sans faiblesses. Les composés organostanniques sont connus pour leur toxicité et représentent un frein pour le passage en clinique. De plus, l'étape d'oxydation de l'astate pour l'obtenir sous sa forme réactive peut s'avérer délicate, car en milieux oxydant, plusieurs espèces sont possibles. Cette difficulté à contrôler l'espèce astaté formée conduit à des rendements variables. Une façon d'augmenter la reproductibilité est d'utiliser une forme d'astate plus facilement contrôlable. En milieu réducteur, la forme At^- est la seule pouvant être obtenue. C'est pourquoi notre équipe s'y est particulièrement intéressée et en 2017, Guérard *et al* proposent une nouvelle méthode de radiomarquage d'anticorps *via* les sels d'iodonium¹⁸⁶ (schéma 19).

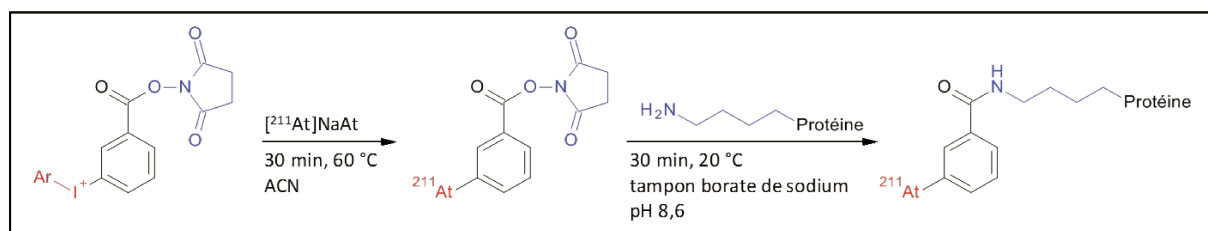


Schéma 19. Radiomarquage à l'astate-211 de protéines selon la méthode décrite par Guérard *et al*.

En plus d'utiliser des précurseurs moins toxiques, le SAB est synthétisé avec des RRCs plus reproductibles (entre 77 et 84 %). De plus, la séparation avec le produit de départ peut se faire par simple filtration sur une cartouche C18, qui par rapport à l'HPLC, est plus rapide, conduit à moins de pertes d'activité et est plus adaptée à l'automatisation, ce qui peut simplifier le transfert en clinique. L'application de cette technique à un anticorps (le 9E7.4) a conduit à des RRCs entre 53 et 57 %, une amélioration considérable par rapport au radiomarquage par la voie organostannique dont les RRCs sont entre 20 et 30 % pour le même anticorps. Cependant la synthèse du SAB n'est pas optimale car un autre sous-produit est formé, correspondant à l'attaque nucléophile de l'astate-211 sur le second cycle aromatique (13 % au plus pour Ar = thiophène). De plus, il s'agit d'un radiomarquage en deux étapes, une partie de la radioactivité sera donc perdue lors des transferts et du couplage non quantitatif entre le SAB et l'anticorps.

Résultats et Discussions

Introduction du sujet de recherche

L'astate-211 apparaissant comme un des radionucléides les plus prometteurs pour la RIT alpha, des méthodes pour le lier à des vecteurs d'intérêts tels que des anticorps ont été mises au point. La méthode la plus largement répandue est la méthode en deux étapes développée par Zalutsky qui est basée sur la radiosynthèse du groupement prosthétique [^{211}At]SAB par astatodéstannylation électrophile du précurseur aryltrialkylstannane¹⁷². Cependant cette méthode requiert l'utilisation d'un précurseur organostannique toxique, ainsi que l'astate sous sa forme At^+ , difficile à contrôler et qui conduit à des rendements peu reproductibles. De plus, les deux étapes nécessaires conduisent à des rendements radiochimiques sous-optimaux en raison de l'étape de couplage. Ce dernier problème a pu être contré par la stratégie de radiomarquage en une seule étape développée par Lindegren²⁶⁵, où le précurseur est greffé sur l'anticorps avant le radiomarquage, faisant ainsi économiser du temps et augmenter le RRC par rapport à la méthode en deux étapes. Cependant cette méthode reste basée sur la déstannylation électrophile. Afin de s'affranchir de ce problème, notre laboratoire a développé une méthode de radiomarquage par voie nucléophile grâce à la chimie des sels d'iodonium. Cette stratégie a démontré sa supériorité par rapport à la voie électrophile avec des RRCs plus reproductibles dus à la facilité de contrôler la forme réduite de l'astate, mais cela reste une méthode en deux étapes¹⁸⁶.

Le travail réalisé au cours de cette thèse consistait donc au développement d'une nouvelle méthode de radiomarquage direct d'anticorps à l'astate-211. La stratégie adoptée s'est axée sur une approche nucléophile, afin d'éviter les problèmes inhérents à l'approche électrophile (figure 21). Cela implique de trouver des nouvelles fonctions chimiques X dont la réaction de radiomarquage à l'astate-211 puisse être effectuée dans un milieu compatible avec les protéines, c'est-à-dire en milieu aqueux et à une température inférieure à 42 °C.

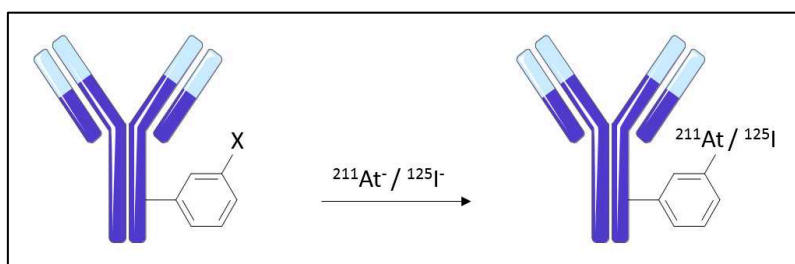


Figure 21. Radiomarquage direct d'anticorps à l'astate-211 et à l'iode-125 par voie nucléophile.

L'astate et l'iode sont deux halogènes voisins dans le tableau périodique des éléments, et par conséquent, ils possèdent certaines propriétés similaires. Comme l'astate ne possède pas d'isotope stable et que tous ses isotopes ont un temps de demi-vie court, les similarités entre l'iode et l'astate ont guidé la plupart des développements de la chimie de radiomarquage de l'astate-211. La réactivité

de l'iode radioactif est généralement une bonne indication de ce qui peut se produire avec l'astate-211. De plus, des radioisotopes de l'iode sont déjà utilisés en imagerie avec l'iode-123 (γ , $t_{1/2} = 13,2$ h) pour l'imagerie TEMP et l'iode-124 (Capture électronique, β^+ , $t_{1/2} = 4,18$ j) pour l'imagerie TEP. Avoir une méthode de radiomarquage qui fonctionne à la fois avec l'iode et l'astate permettrait de développer des outils théranostiques basés sur la paire $^{123,124}\text{I}/^{211}\text{At}$. C'est pourquoi le travail réalisé au cours de cette thèse a également été appliqué à l'iode-125 (électron Auger, $t_{1/2} = 59,4$ j). Ce radionucléide a l'avantage, par rapport aux autres radioisotopes de l'iode, de posséder un temps de demi-vie long, ce qui le rend plus facile à travailler.

Afin d'atteindre l'objectif fixé, le travail présenté dans ce manuscrit s'est divisé en deux parties.

1. Exploration de nouvelles classes de précurseurs pour le radiomarquage à l'astate-211 et à l'iode-125 par substitution nucléophile

La première partie consistait à explorer de nouvelles classes de composés pour effectuer le radiomarquage à l'astate-211 et à l'iode-125 par substitution nucléophile aromatique. Un total de six classes a été sélectionné en se basant sur ce qui était utilisé pour le radiomarquage d'autres halogènes, en particulier le fluor-18 (figure 22).

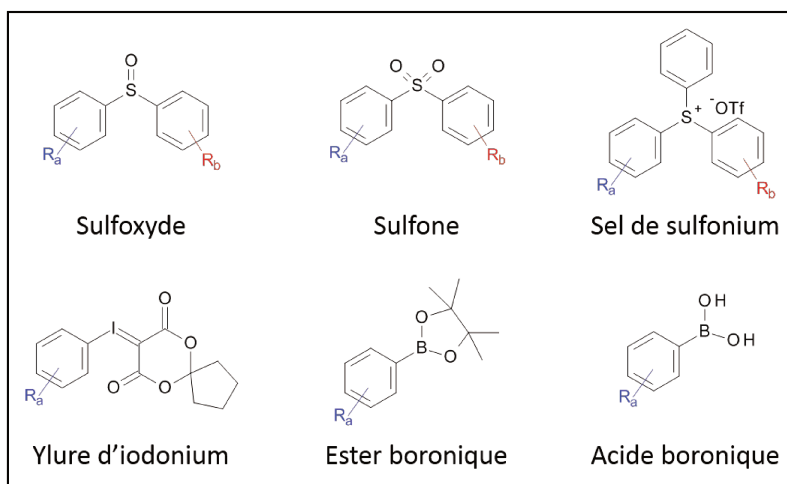


Figure 22. Classes envisagées pour l'étude du radiomarquage à l'astate-211 et à l'iode-125 par substitution nucléophile aromatique.

Trois d'entre elles étaient des composés de soufre hypervalent : les biarylsulfoxydes, les biarylsulfones et les sels de triarylsulfonium. Une seule publication fait appel aux biarylsulfoxydes en radiochimie pour des radiomarquages de noyaux aromatiques avec des groupements électroattracteurs au fluor-18²⁷¹. Les synthèses sont réalisées dans un appareil microfluidique et demandent des chauffages drastiques (de 120 à 200 °C). Les biarylsulfones quant à elles n'ont jamais été décrites en radiohalogénéation, mais de par leur structure proche avec les biarylsulfoxydes, il a été

envisagé qu'elles puissent être de potentiels précurseurs et ont donc été rajoutées à l'étude. Les sels de triarylsulfonium sont quant eux efficaces pour le radiomarquages au fluor-18 de noyaux aromatiques activés avec une très bonne sélectivité²⁷². Ils ont notamment été utilisés pour la radiofluoration de peptides, ou plus récemment du métomidate utilisé pour l'imagerie de l'hyperaldostérisme primaire²⁷³. Une autre classe qui a pris part à l'étude est les ylures d'aryliodonium. Tout comme les sels de biaryliodonium, ce sont des composés d'iode hypervalent. Mais comparativement à ces derniers, une étude mécanistique menée en radiofluoration montre que les ylures d'aryliodonium sont à la fois plus réactifs et plus sélectifs par rapport aux sels de biaryliodonium (figure 23)²⁷⁴. Cette meilleure sélectivité s'explique par la différence d'énergie entre l'état de transition A permettant l'accès au fluorobenzène voulu et l'état de transition B conduisant au sous-produit (auxiliaire dicarboxylé fluoré ou le fluoroanisole pour l'ylure et le sel d'iodonium respectivement) est plus grande dans le cas de l'ylure d'iodonium (25,7 kcal/mol) que pour le sel de d'iodonium (2,9 kcal/mol). L'état de transition B de l'ylure d'iodonium conduirait notamment à un caractère doublement anionique, ce qui justifie qu'il soit extrêmement défavorable. Grâce à cette sélectivité, les ylures d'iodonium permettent la radiofluoration de noyaux aromatiques désactivés, électrons enrichis ou encombrés^{275,276}. Cette technique a notamment été utilisée pour la synthèse de deux fluorophénoxyéthers, le 4-((3-[¹⁸F]fluorophénoxy)phénylméthyl)pipéridine (3-[¹⁸F]FPPMP) et le 4-((4-[¹⁸F]fluorophénoxy)phénylméthyl)pipéridine (4-[¹⁸F]FPPMP) qui sont des ligands potentiels pour le transport de la sérotonine et la norépinéphrine²⁷⁵ ou encore pour la synthèse du 3-[¹⁸F]fluoro-5-[(pyridin-3-yl)éthynyl]bentonitrile ([¹⁸F]FPEB) utilisé en neuroimagerie TEP pour la détection du récepteur de glutamate métabotrope 5 (mGluR5)^{277,278}. Les deux dernières classes sont des dérivés du bore, les esters et les acides boroniques. Ces derniers ont déjà été utilisé pour tout d'abord pour le radiomarquage au fluor-18,^{205,206} puis à l'iode radioactif^{207,209} et plus récemment à l'astate-211²¹⁰. Cependant le radiomarquage à l'astate de ce type de composés n'avait pas encore été publié au début du projet, c'est pourquoi ils ont fait partis de l'étude.

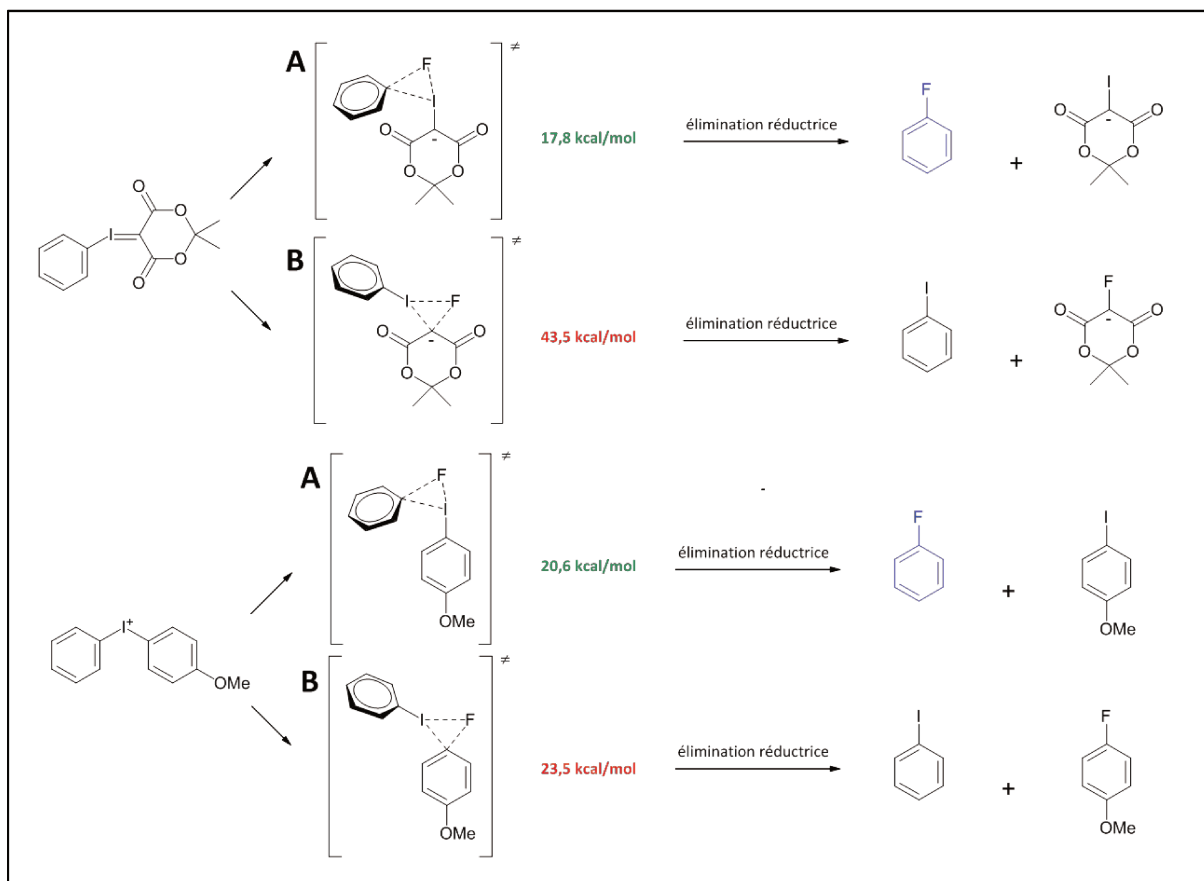


Figure 23. Mécanismes de radiofluoration d'ylures d'aryliodonium et de sels de biaryliodonium.

Un précurseur de chaque série a été synthétisé, puis radiomarqué à l'astate-211 et à l'iode-125 afin de déterminer quelles classes s'avéraient les plus efficaces pour le radiomarquage avec ces radionucléides et pouvaient présenter des avantages par rapport à la méthode déjà connue des sels d'iodonium, la plus efficace pour le radiomarquage à l'astate-211 de composés organiques par voie nucléophile. Pour les plus prometteuses, l'objectif suivant a été dans un premier temps d'optimiser les conditions de radiomarquage, puis de déterminer leurs avantages, mais également leurs limites, en faisant notamment varier le substituant R_a et en observant l'influence des effets électroniques et stériques sur les rendements obtenus. Enfin, le dernier point à évaluer était la faisabilité de ces radiomarquages en milieu aqueux et à basse température, des conditions qui sont compatible avec des protéines. La classe qui a pu répondre à ces derniers critères a alors été utilisée dans la deuxième partie de la thèse.

2. Mise au point d'une méthode de radiomarquage d'anticorps en une étape par halodéboronation nucléophile

La seconde partie fût axée sur le développement d'un nouveau procédé de radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 direct d'anticorps par voie nucléophile. Les dérivés du bore ayant fait l'objet d'un intérêt particulier ces dernières années en radiohalogénéation catalysée au cuivre¹⁹⁰, ils ont semblés intéressants à investiguer, les réactions décrites fonctionnant à températures ambiantes à l'iode-125 et à l'astate-211^{209,210}. Ce résultat a été retrouvé lors du travail effectué dans la première partie de la thèse, en particulier avec les acides boroniques. C'est pourquoi il a été choisi d'investiguer cette dernière classe de composé. Les méthodes actuelles de radiomarquages *via* ce type de composés sont toutefois décrites uniquement en milieux organique, ce qui n'est pas compatible avec les protéines. C'est pourquoi un travail préliminaire a été effectué sur un composé modèle afin de déterminer si la réaction pouvait fonctionner dans un milieu compatible avec des anticorps. Une fois les conditions optimales déterminées, la chimie a été transmise sur deux anticorps pré-modifiés par des acides arylboroniques. Le premier est un anticorps anti-CD22 disponible en larges quantités dans le laboratoire et qui a servi à vérifier la faisabilité de cette réaction et à réaliser des tests d'optimisations. La chimie a ensuite été appliquée à un second anticorps, le 9E7.4, qui a pu servir à réaliser des tests biologiques d'immunoréactivité et de biodistributions nécessaires pour vérifier la viabilité de la nouvelle procédure de radiomarquage développée. Enfin, pour faciliter le transfert de l'astate en clinique, un travail visant à automatiser le radiomarquage a été réalisé.

I. Exploration de nouvelles classes de précurseurs pour le radiomarquage à l'astate-211 et à l'iode-125 par substitution nucléophile

Afin de pouvoir comparer les classes entre elles, un composé modèle de chaque classe a dans un premier temps été synthétisé puis testé en radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 (figure 24). Un sel de biaryliodonium a également été synthétisé à titre de comparaison afin de déterminer si les nouveaux composés testés seraient plus efficaces par rapport à ce dernier, déjà bien connu et établi comme précurseur de référence dans le laboratoire.

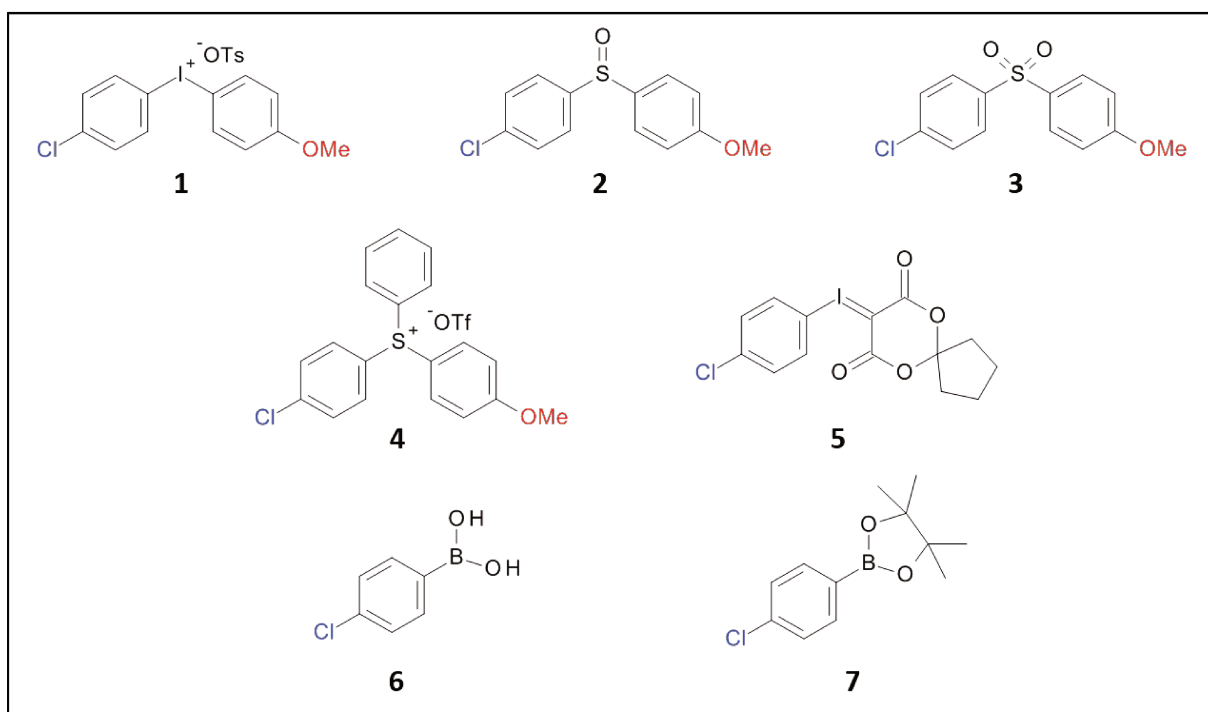


Figure 24. Composés modèles.

Pour comparer toutes les classes entre elles, chaque composé modèle a été choisi avec un chlore en position *para* qui présente un effet mésomère donneur mais un effet inductif attracteur, ce qui en fait un substituant intermédiaire en terme d'effets électroniques, plutôt activant pour les substitutions nucléophiles (constante de Hammett $\sigma = 0,227$). Pour les composés possédant au moins deux groupements aromatiques (biarylsulfoxyde, biarylsulfone, sel de triarylsulfonium et sel de biaryliodonium), un groupement électro donneur a été introduit en position *para* sur le deuxième cycle aromatique afin de l'enrichir en électrons et ainsi d'orienter la réaction de substitution nucléophile de l'halogène sur l'aryle désiré. Le groupement méthoxy a été choisi car il est fréquemment utilisé dans notre laboratoire pour le radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 des sels de biaryliodonium et a

déjà montré son efficacité pour orienter la sélectivité de la réaction^{185–187}. Les ylures d'iodonium sont des composés thermo- et photosensibles. Dans notre cas, il a été synthétisé avec un motif 6,10-dioxaspiro[4.5]décane-7,9-dione comme auxiliaire, limitant les phénomènes de dégradation lors de réactions de radiofluoruration, notamment grâce aux oxygènes qui stabilisent l'iode hypervalent²⁷⁶ (figure 25).

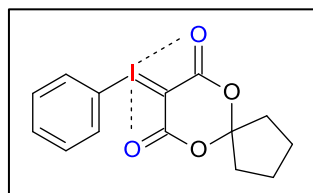


Figure 25. Stabilisation de l'iode hypervalent par les oxygènes du groupement 6,10-dioxaspiro[4.5]décane-7,9-dione.

Les composés donnant les résultats les plus prometteurs lors des radiomarquages à l'iode et à l'astate seront sélectionnés pour être approfondis davantage. Le premier axe de recherche portera sur l'optimisation de la réaction de radiomarquage en jouant sur la température, la concentration en précurseur ou encore le solvant. Ensuite, le chlore sera remplacé par d'autres groupements attracteurs ou donneurs afin de déterminer l'influence des effets électroniques ou stériques sur le radiomarquage. Enfin, des tests en milieu aqueux et à basse température seront envisagés afin de déterminer le potentiel de ces composés pour le radiomarquage direct d'anticorps pré-modifiés avec ces fonctions chimiques.

I.1. Synthèses des précurseurs modèles

L'acide arylboronique **6** et l'ester arylboronique **7** sont disponibles commercialement. Les autres composés de la série ont été synthétisés au laboratoire.

I.1.1. Précurseurs soufrés

Les synthèses du biarylsulfoxyde **2**, de la biarylsulfone **3** et du sel de triarylsulfonium **4** ont été réalisées précédemment par Dmytro Ryzhakov en stage de master ²⁷⁹. La première étape commune à toutes ces synthèses est la formation du diaryle thioéther **10**, obtenu à partir de l'iodoaryle **8** et du thioaryle **9** correspondants en présence de CuI avec un rendement de 67 % (schéma 20). L'agent complexant néocuproïne est utilisé afin de solubiliser le sel de cuivre et le conserver à l'état d'oxydation +I, tel que précédemment décrit²⁸⁰.

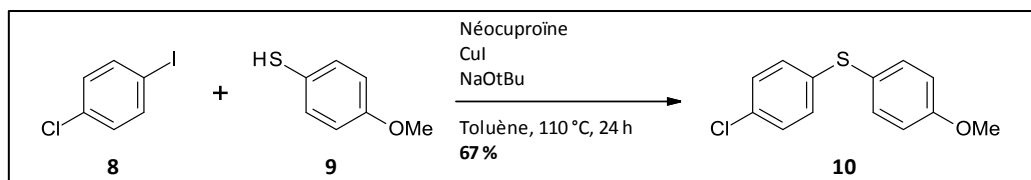


Schéma 20. Synthèse du diaryle thioéther **10**.

Le diaryle thioéther **10** est ensuite oxydé par le *m*CPBA pour former le biarylsulfoxyde **2** avec un rendement de 83 % (1 équivalent de *m*CPBA) et la biarylsulfone **3** avec un rendement de 98 % (2 équivalents de *m*CPBA) suivant la procédure décrite par Barbosa *et al*²⁸⁰. Le sel de triarylsulfonium est obtenu par réaction du biaryl thioéther **10** avec le sel de biphényliodonium en présence de benzoate de cuivre (II) comme catalyseur avec un rendement de 77 % comme décrit dans la littérature²⁸¹ (schéma 21).

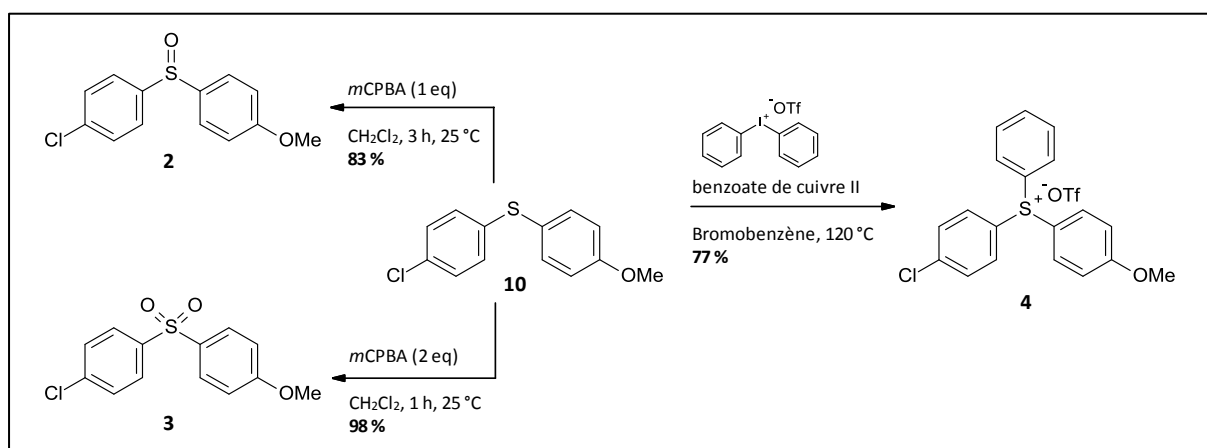


Schéma 21. Synthèse du biarylsulfoxyde **2**, de la biarylsulfone **3** et du sel de triarylsulfonium **4**.

I.1.2. Précurseurs iodés

La synthèse du sel de biaryliodonium s'est réalisé suivant un protocole décrit par Guérard *et al*¹⁸⁵ (schéma 22). L'iodoaryle de départ **8** est oxydé par du *m*CPBA pour former l'intermédiaire aryle iodane λ^3 **11**, puis **1** est obtenu par S_EAr par ajout d'anisole et d'acide *paratoluènesulfonique* avec un rendement de 63 %.

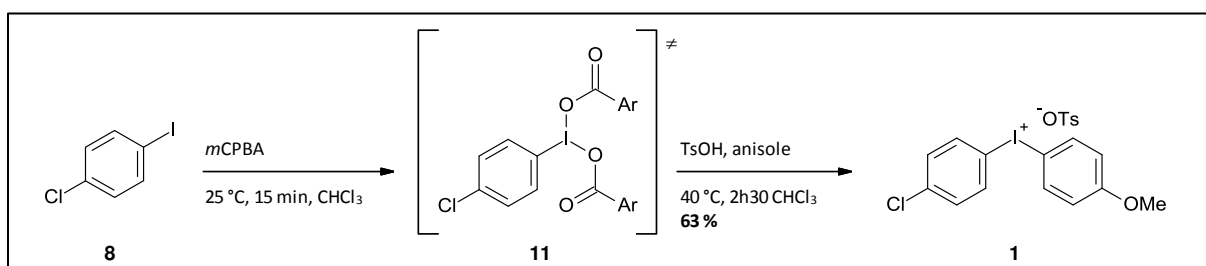


Schéma 22 : Synthèse du sel de biaryliodonium **1**.

La synthèse de l'ylure d'aryliodonium **5** a été effectuée suivant le protocole reporté par Cardinal *et al*²⁷⁵ et commence de la même façon avec la première étape d'oxydation sur l'iodoaryle de départ **8** par du *m*CPBA. L'acide de meldrum **12** est ensuite déprotonné en milieu basique afin de former l'anion correspondant impliqué dans la réaction de substitution nucléophile sur l'aryle iodane λ^3 intermédiaire pour former l'ylure d'iodonium **5** avec un rendement de 27 % (schéma 23).

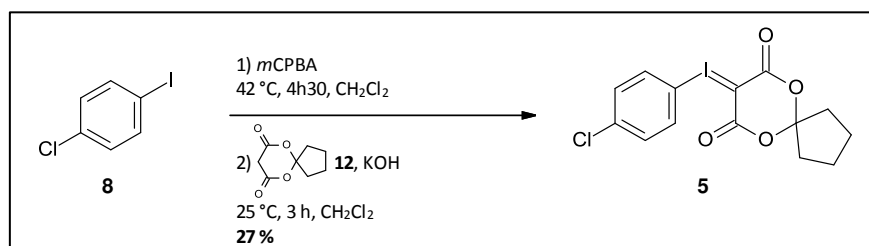


Schéma 23. Synthèse de l'ylure d'iodonium **5**.

L'acide de meldrum **12** utilisé pour la synthèse de l'ylure est quant à lui synthétisé à partir de l'acide malonique **13** en milieu acide dans l'anhydride acétique. La cyclopentanone est ajoutée goutte à goutte pour donner **12** avec un rendement de 41 % (schéma 24).

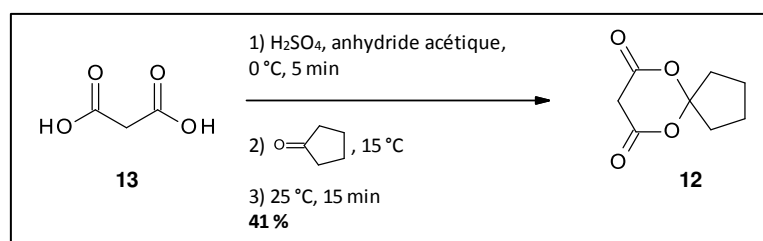


Schéma 24. Synthèse de l'acide de meldrum **12**.

I.2. Radiomarquages et comparaison des différentes classes de précurseurs

I.2.1. Comparaison des différents précurseurs

Les conditions de radiomarquages de ces composés décrites dans la littérature avec le fluor-18 ont servi de base pour un premier travail exploratoire avec l'iode-125 et l'astate-211. Ce travail a été commencé par Dmytro Ryzhakov, dans lequel il a pu établir le solvant optimal pour chaque classe explorée pour le radiomarquage à l'iode-125. Les modes opératoires qu'il a pu développer ont servi de point de départ afin de réaliser le travail comparatif des différentes classes avec l'iode-125 et l'astate-211. Tous les protocoles ont une base similaire : un temps de réaction de 30 minutes, qui est un temps compatible avec la courte demi-vie de l'astate-211, le précurseur à une concentration de 25 mM et l'utilisation d'un cryptant, le kryptofix 222 (K222) avec K₂CO₃. Ces derniers sont souvent mentionnés pour les radiomarquages au fluor-18. La source de fluor-18 est obtenue dans de l'eau, qui inhibe la nucléophilie de l'anion fluorure. Pour éliminer toute trace d'eau, l'halogène est passé sur cartouche

échangeuse d'anions et est élué avec une solution aqueuse de carbonate alcalin, comme K_2CO_3 . La solution alors obtenue est concentrée par chauffage et sous flux d'hélium. Une étape de séchage est ensuite réalisée par évaporation azéotropique avec de l'acétonitrile. Afin de dissocier l'ion K^+ du fluorure et ainsi exalter sa réactivité, l'usage du K222 est très largement répandu²⁸². L'iode et l'astate peuvent réagir plus facilement de façon nucléophile que le fluor même en présence d'eau. C'est ce qui a notamment été observé pour le radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 des sels d'iodonium.¹⁸⁵ Cependant, le K222 a tout de même été conservé dans notre cas pour les premiers tests afin de reprendre strictement les mêmes conditions qu'au fluor-18. De plus, la source d'iode utilisée est une solution aqueuse de $[^{125}I]NaI$ en NaOH. La présence de K222 et l'évaporation azéotropique qui est ensuite effectuée permet potentiellement de limiter l'inhibition de la nucléophilie de l'ion iodure par hydratation et de maximiser les rendements.

Les tests sur le sel de biaryliodonium **1** sont les seuls qui n'ont pas suivi ce schéma opératoire. En effet, des protocoles optimisés ont déjà été mis en place dans notre laboratoire et ce sont ces derniers qui ont été utilisés. La concentration en précurseur est alors de seulement 2.5 mM au lieu de 25 mM et le K222 n'a pas été employé.

Il est à noter que dans le cas des radiomarquages des esters et des acides boroniques, un catalyseur au cuivre est nécessaire pour les réactions d'halodéboronations nucléophiles sur ces composés. Le $Cu(OTf)_2pyr_4$ a donc été employé, la littérature le mentionnant souvent comme un catalyseur efficace pour des réactions de radiohalogénéation *via* les acides ou les esters boroniques^{204,205,207,210,283–285}.

Afin de réaliser tous ces marquages, l'halogène doit être sous forme nucléophile. La source d'iode radioactif utilisée est une solution de $[^{125}I]NaI$ dans NaOH (10^{-5} M). L'iode est donc déjà sous sa forme nucléophile. La source d'astate est quant à elle produite par le cyclotron Arronax par la réaction $^{209}Bi(\alpha, 2n)^{211}At$. L'astate-211 est récupéré en chloroforme par distillation comme décrit précédemment par Lindegren *et al*⁵². Cette source est ensuite acheminée jusqu'au laboratoire. Une fois reçu, l'astate est présent en solution sous plusieurs formes qui ne sont pas identifiées (figure 26) et qui peuvent varier à chaque nouvelle source. Des effets de radiolyses peuvent intervenir, provoquant la décomposition du chloroforme en plusieurs sous-produit dépendant de la présence d'oxygène, de l'humidité et de la dose. Récemment, Aneheim *et al* ont proposés des possibles interactions entre l'astate-211 et certains de ces sous-produits, en particuliers les peroxydes et le chlore²⁸⁶.

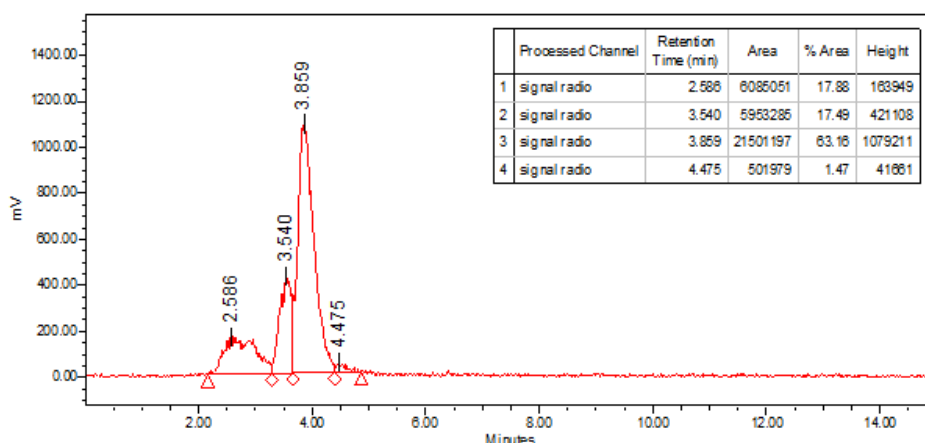
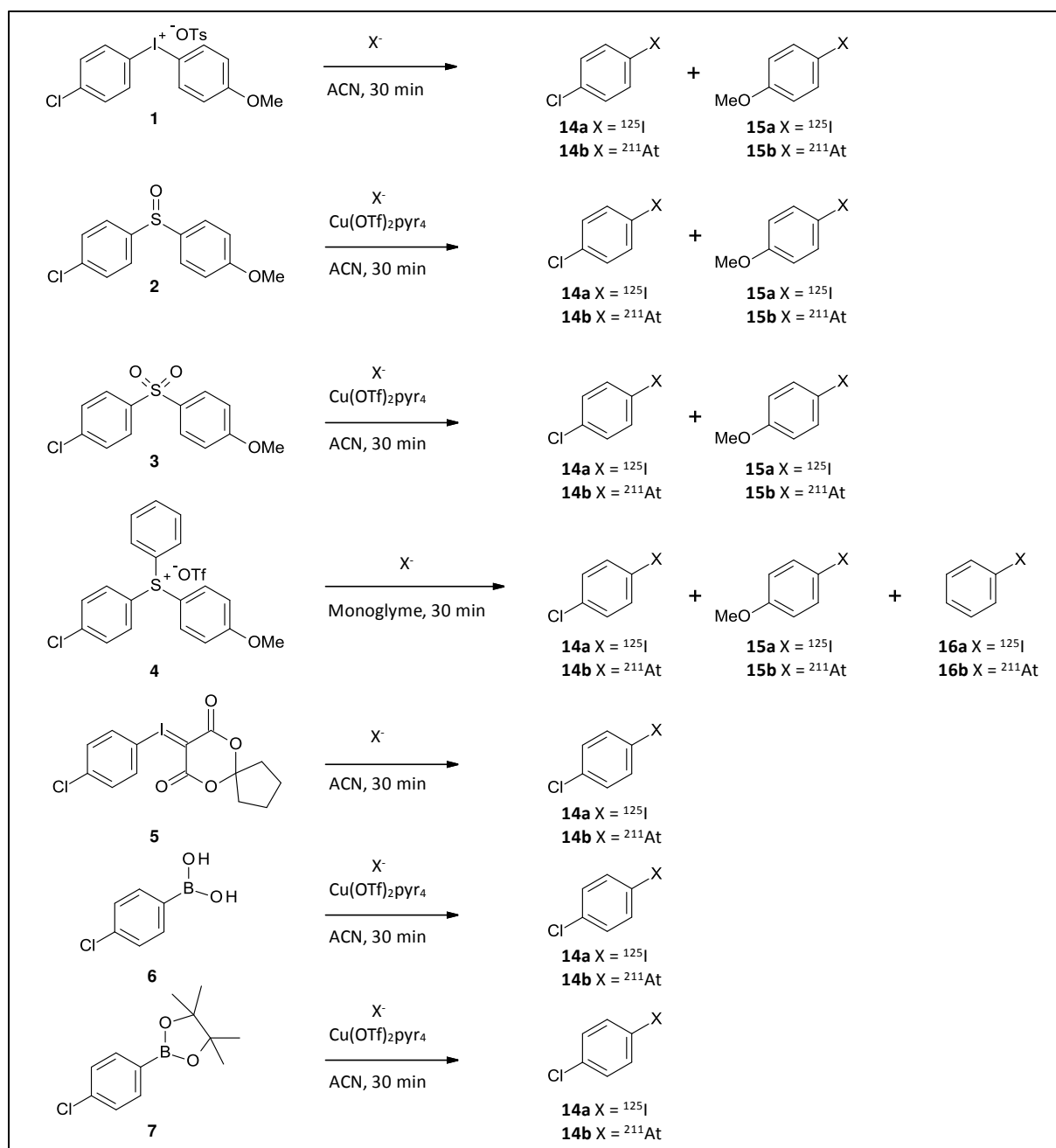


Figure 26. Exemple de radiochromatogramme d'une source d'astate-211 à la réception au laboratoire effectué par analyse HPLC en phase inverse sur une colonne C18.

Afin de l'obtenir sous forme nucléophile, le chloroforme est évaporé et l'astate-211 est réduit par ajout du dithiothréitol (DTT) dans l'acétonitrile. Le sulfite de sodium est un réducteur plus répandu pour la réduction de cet halogène. Cependant, son utilisation dans notre laboratoire a parfois conduit à des résultats peu reproductibles. L'étude réalisée sur plusieurs réducteurs a montré que l'utilisation du DTT permettait de s'affranchir de ce problème, c'est pourquoi il a été sélectionné.

Afin de déterminer le RRC de chaque radiomarquage, la référence iodée froide de chaque produit ou sous-produit formé a été analysé par HPLC dans le but de déterminer leur temps de rétention, sachant qu'entre l'iode et l'astate, très peu voire pas de différence est généralement observée étant donné leur polarité très proche. Les résultats des premiers tests sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11. Comparatif des différentes classes utilisées pour le radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211.



Précurseur	Conditions	RRC (%)	
		^{125}I	^{211}At
Sel d'iodonium 1	CH ₃ CN, 1 (2,5 mM)	97 (14a) / 3 (15a) ^e	81 ± 2 (14b) / 18 ± 4 (15b) ^{f,8}
Sulfoxyde 2	CH ₃ CN, 2 (25 mM), Cu(OTf) ₂ pyr ₄ (25 mM)	4 (14a) / 0 (15a) ^a	3 (14b) / 0 (15b) ^d
Sulfone 3	CH ₃ CN, 3 (25 mM), Cu(OTf) ₂ pyr ₄ (25 mM)	0 (14a) / 0 (15a) ^a	0 (14b) / 0 (15b) ^d
Sel de sulfonium 4	Monoglyme, 4 (25 mM)	97 (14a) / 0 (15a) / 3 (16a) ^c	97 (14b) / 0 (15b) / 3 (16b) ^d
Ylure d'iodonium 5	CH ₃ CN, 5 (25 mM)	9 ^e	89 ^d
Acide boronique 6	CH ₃ CN, 6 (25 mM), Cu(OTf) ₂ pyr ₄ (25 mM)	95 ^b	>99 ^d
Ester boronique 7	CH ₃ CN, 7 (25 mM), Cu(OTf) ₂ pyr ₄ (25 mM)	49 ^b	-

Conditions standard : 30 min, 100 μ L ^a 140 °C, ^b 120 °C, ^c 100 °C, ^d 90 °C, ^e 80 °C, ^f 60 °C, ^g n = 2. RRCs déterminés par analyse radio-HPLC du brut réactionnel.

Sel de biaryliodonium

Les radiomarquages du sel de biaryliodonium **1** ont donné des RRCs quantitatifs ou quasi quantitatifs avec les deux radionucléides en repartant des conditions établies dans notre laboratoire. On a toutefois observés une différence de régiosélectivité entre les deux halogènes : 97 % du produit d'intérêt **14a** a été obtenu pour le radiomarquage à l'iode-125 avec 3 % d'iodoanisole **15a** après 30 minutes à 80 °C, tandis que ce ratio a baissé pour le radiomarquage à l'astate-211, avec 81 ± 2 % de **14b** obtenu et 18 ± 4 % d'astatoanisole **15b** après 30 minutes à 60 °C. La température n'a pas semblé avoir une influence sur la sélectivité, un radiomarquage à température ambiante ayant donné des résultats similaires (78 % de **14b** et 20 % d'astatoanisole **15b**). Cette baisse de ratio a déjà été observée dans une publication de l'équipe et est expliquée par la différence de la constante de réaction p entre l'iode et l'astate¹⁸⁵. Cette dernière diminue lorsque la taille de l'halogène augmente. Plus p est faible, moins la réaction est sensible aux effets électroniques des substituants, d'où la différence de sélectivité observée. Ce radiomarquage possède une cinétique extrêmement rapide : un test sur seulement deux minutes de réaction à température ambiante a permis d'obtenir **14b** avec un RRC de 77 % avec 22 % d'astatoanisole **15b**. L'investigation menée sur le sel d'iodonium est la seule dans laquelle le K222 n'a pas été utilisé car le protocole est décrit de cette façon dans le laboratoire. Quelques expériences en présence de K222 et K_2CO_3 ont tout de même été réalisées et ont conduit à une dégradation du sel de biaryliodonium **1**. Le RRC en a été conséquemment impacté : seulement 59 % de **14b** a été obtenu pour le radiomarquage à l'astate (et 18 % d'astatoanisole **15b**) et aucune conversion n'a été observée à l'iode.

Biarylsulfoxyde et biarylsulfone

Quasiment aucun marquage n'a été observé avec le biarylsulfoxyde **2** et la biarylsulfone **3**, même avec un chauffage important, ou avec l'ajout du catalyseur $Cu(OTf)_2pyr_4$. Le travail sur ces deux espèces n'a pas été poussé plus loin car les autres classes ont toutes données de meilleurs résultats.

Sel de triarylsulfonium

Le sel de triarylsulfonium **4** a donné d'excellent résultats. Un chauffage à 90-100 °C a permis d'obtenir un RRC global avec l'iode-125 et l'astate-211. Malgré la présence de trois cycles aromatiques, donc potentiellement trois sites sur lesquels l'astate ou l'iode pourraient se fixer, la régiosélectivité observée était excellente, 97 % du produit d'intérêt **14a** ou **14b** étant obtenu. Le seul autre produit observé était l'iodobenzène **16a** ou l'astatobenzène **16b**, ce qui n'est pas surprenant car le cycle aromatique possédant le substituant donneur OMe est le moins favorable pour la réaction de substitution nucléophile (figure 27). Cette régiosélectivité était donc similaire à ce qui a pu être obtenu

pour le radiomarquage du sel de biaryliodonium à l'iode-125. Néanmoins, elle s'est avérée bien supérieure pour le radiomarquage à l'astate-211, ce qui en fait une classe potentiellement intéressante en tant que nouvelle méthode de radiomarquage avec ce radionucléide.

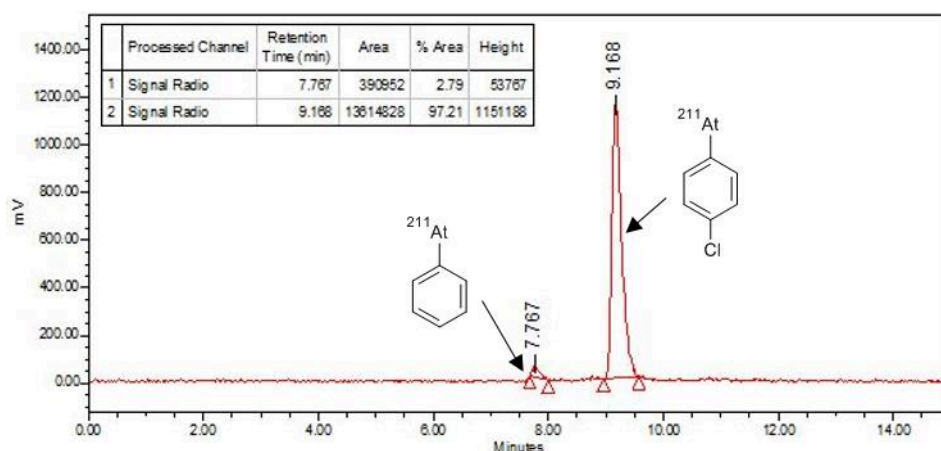


Figure 27. Radiochromatogramme du radiomarquage à l'astate-211 du sel de triarylsulfonium **4**.

Ylure d'aryliodonium

L'ylure d'aryliodonium **5** a conduit à de très faibles RRCs avec l'iode-125 après 30 minutes à 80 °C en acétonitrile. Mais de façon surprenante, un haut RRC de 89 % a été obtenu à l'astate après 30 minutes à 90 °C (figure 28).

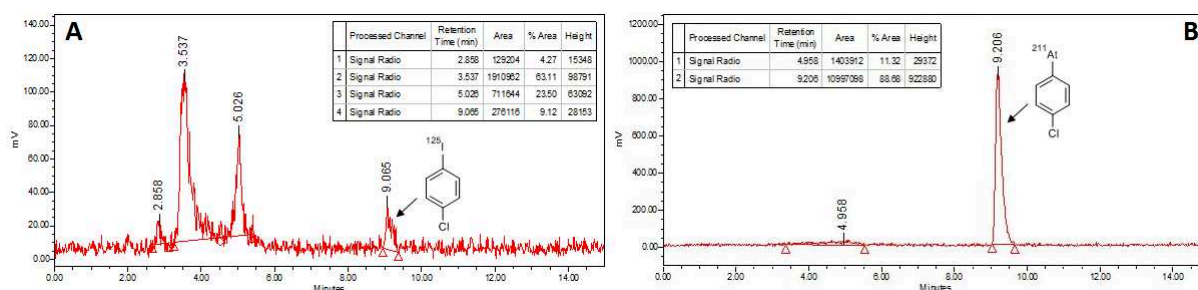


Figure 28. Radiochromatogrammes des radiomarquages de l'ylure d'aryliodonium **5** A) à l'iode-125 ; B) à l'astate-211.

En solvant aprotique polaire, la nucléophilie des halogènes diminue lorsque leur taille augmente. Une meilleure réactivité devrait donc être observée avec l'iode. Une hypothèse est le passage par une voie radicalaire et non purement nucléophile, similairement à ce qui a été rapporté dans le cas des sels de diazonium. Une plus grande électronégativité et polarisabilité de l'halogène favorise ce type de réaction, ce qui justifierait la meilleure réactivité de l'astate. Or, il est connu que sous certaines conditions, les composés d'iode(III) peuvent être sujets à ce type de mécanismes²⁸⁷. Cela pourrait être vérifié par l'utilisation d'un piège à radicaux comme le 2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)oxy (TEMPO). Dans tous les cas, afin de mieux comprendre cette différence de réactivité entre les deux halogènes, des études cinétiques seraient nécessaires afin d'accéder aux données

thermodynamiques et ainsi pouvoir investiguer le mécanisme mis en jeu. D'autre part, il est important de noter que contrairement au sel d'iodonium, aucune substitution nucléophile de l'astate-211 sur l'auxiliaire 6,10-dioxaspiro[4.5]décane-7,9-dione n'est observé, comme ce qui a été constaté pour le radiomarquage au fluor-18.²⁷⁴ Cette propriété est un net avantage pour les ylures d'iodonium qui n'ont donc pas de problème de perte de radioactivité à cause de la formation d'un sous-produit dû à la régiosélectivité.

Acide et ester arylboroniques

L'acide arylboronique **6** conduit à des RRCs quasi-quantitatifs en 30 minutes en présence du catalyseur au cuivre $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$ à 120 °C et 90 °C avec l'iode-125 et l'astate-211 respectivement, en faisant une classe extrêmement prometteuse. La même réaction appliquée à l'ester boronique **7** n'a donné qu'un résultat modéré avec 49 %. Néanmoins, un test réalisé en l'absence de K222 et de K_2CO_3 mené à l'iode-125 a permis de remonter jusqu'à 84 %. Dans ce test, aucune co-évaporation n'a été effectué, par conséquent, de l'eau venant de la source de $^{125}\text{I}]\text{NaI}$ était également présente. De plus, l'analyse HPLC de l'ester boronique **7** de départ a permis de révéler qu'une quantité non négligeable de l'acide arylboronique correspondant se trouvait également dans ce précurseur obtenu commercialement (figure 29).

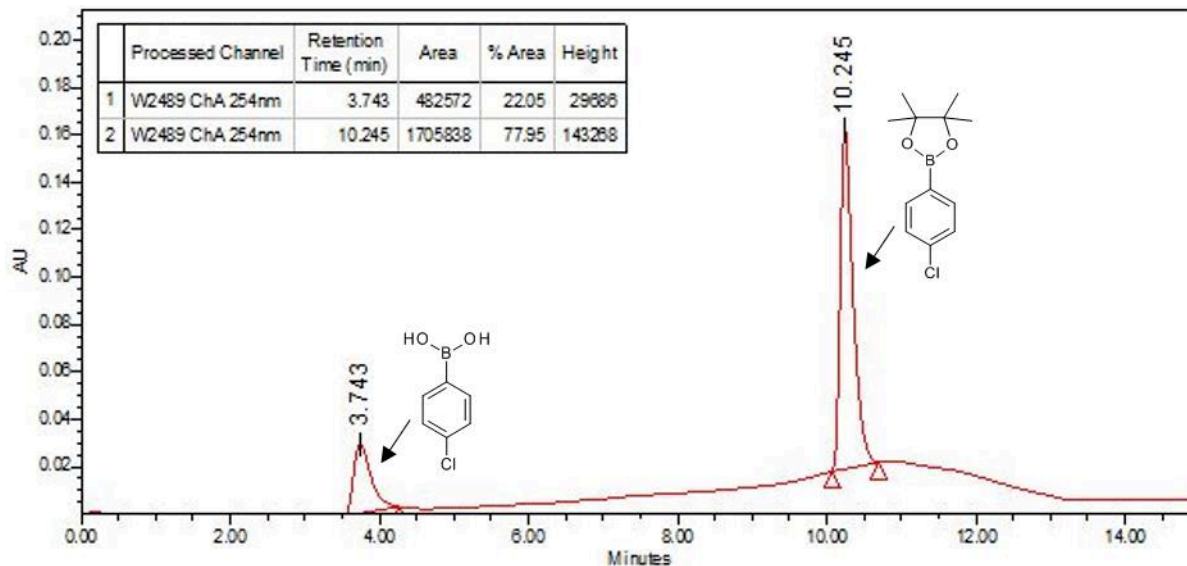


Figure 29. Chromatogramme UV (254 nm) du lot de l'ester arylboronique employé lors du radiomarquage **7**.

Etant donné les excellents résultats obtenus avec ce dernier, sa présence peut fausser les tests effectués sur l'ester arylboronique **7**. Une purification du composé aurait pu être envisagée afin de réitérer des tests sur **7** pur, cependant devant les très bons résultats de l'acide arylboronique, cette classe a été préférée et les esters arylboroniques n'ont pas été investigués davantage.

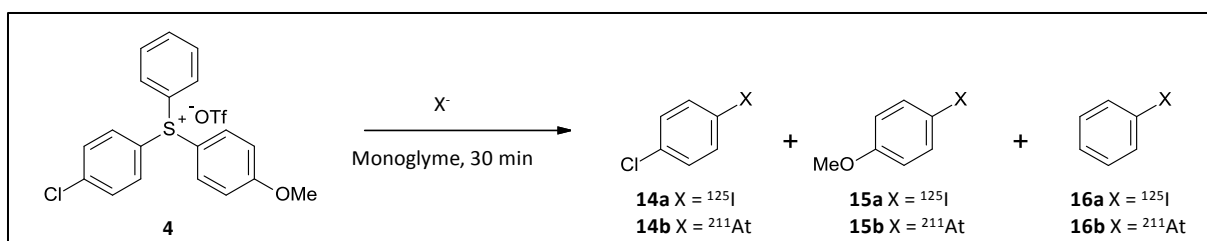
I.2.2. Conclusions

Il ressort de ce test comparatif que les classes les plus prometteuses sont les sels de triarylsulfonium, les ylures d'aryliodonium et les acides arylboroniques. Ces trois classes ont donné des RRCs presque quantitatifs pour le radiomarquage à l'astate-211, et il en va de même pour le radiomarquage à l'iode-125 avec le sel de triarylsulfonium **4** et l'acide arylboronique **6**. De plus, le sel de triarylsulfonium **4** a démontré une meilleure régiosélectivité de la réaction par rapport au sel de biaryliodonium **1**, et aucun autre sous-produit n'a été observé avec l'ylure d'aryliodonium **5** et l'acide arylboronique **6**. Par conséquent, ces types de précurseur peuvent potentiellement permettre une amélioration pour le radiomarquage avec ces deux radionucléides. Ces trois classes ont donc été sélectionnées afin de les investiguer davantage. Pour chacune d'entre elles, les conditions de réactions doivent être optimisées en jouant sur des paramètres tels que la température ou la concentration en précurseur. Dans un second temps, l'influence de la nature du substituant sera étudiée afin de déterminer si le marquage peut fonctionner aussi bien avec des substituants électrodonneurs qu'attracteurs et si leur position sur le cycle aromatique peut avoir une importance. Enfin, le dernier point consistera à voir si le radiomarquage de ces composés peut s'effectuer dans des conditions expérimentales compatibles avec les protéines (milieu aqueux et basse température), ce qui permettrait de les utiliser pour réaliser des radiomarquages directs de protéines pré-modifiées par ces fonctions en deuxième partie de thèse.

I.3. Optimisation du radiomarquage *via* les sels de triarylsulfonium sur le composé modèle

Cette partie s'est concentrée sur l'optimisation du radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 du sel de triarylsulfonium **4**. Tout d'abord, l'importance de la présence des réactifs K222/K₂CO₃ dans les radiomarquages a été testée (tableau 12). Un test de radiomarquage avec les deux radionucléides sans la présence de ces réactifs a alors été réalisé. Dans ce cas, l'évaporation azéotropique n'a pas été effectuée. Par conséquent, de l'eau était présente dans le radiomarquage à l'iode-125, apportée par la source de [¹²⁵I]NaI. Ce n'est cependant pas le cas de l'astate-211, car ce dernier est réduit par ajout de DTT solubilisé en acétonitrile. Les résultats montrent qu'avec cette méthode, très peu de radiomarquage est obtenu. La méthode initiale avec le K222 et K₂CO₃ et le mélange azéotropique semble être nécessaire pour que la réaction fonctionne et ce pour les deux radionucléides.

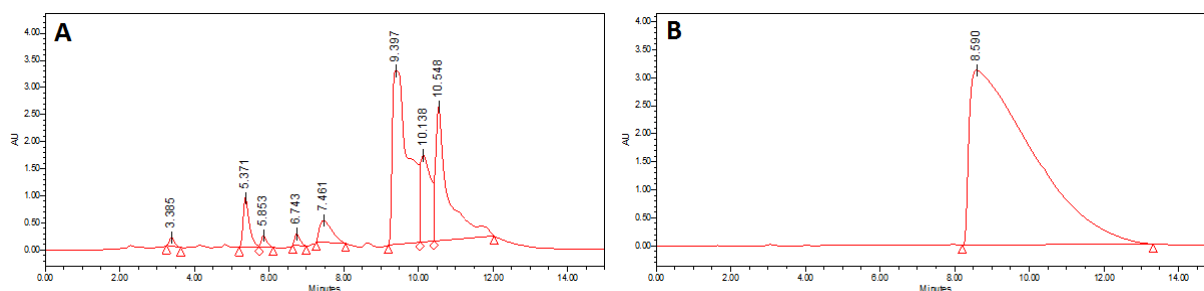
Tableau 12. Influence de K222/K₂CO₃ dans le radiomarquage du sel de triarylsulfonium **4**.



Condition	RRC (%)	
	${}^{125}\text{I}^a$	${}^{211}\text{At}^b$
Avec K222/K ₂ CO ₃	97 (14a) / 0 (15a) / 3 (16a)	97 (14b) / 0 (15b) / 3 (16b)
Sans K222/K ₂ CO ₃	0 (14a) / 0 (15a) / 0 (16a)	0 (14b) / 0 (15b) / 0 (16b)

Conditions standard : **4** (25 mM), monoglyme, 30 minutes. ^a[¹²⁵I]NaI (1,5 MBq), 100 °C ; ^b[²¹¹At]At (1-5 MBq), 90 °C. RRCs déterminés par analyse radio-HPLC du brut réactionnel.

On note également que l'ajout de K222/K₂CO₃ entraîne une dégradation du sel de triarylsulfonium **4** de départ (figure 30) :



Le protocole initial contenant le K222 avec le K₂CO₃ a donc été conservé pour la suite de l'optimisation du radiomarquage à l'astate-211, qui a consisté à faire varier la température du radiomarquage ou la concentration en précurseur. Le résumé de ces tests est montré dans tableau 13 :

Tableau 13. Optimisation du radiomarquage à l'astate-211 du sel de triarylsulfonium **4**.

Température	RRC (%)
90 °C	97
90 °C ^a	11
60 °C	52
42 °C	27
23 °C	21

Conditions standard : **4** (25 mM), monoglyme, 30 min, K222 (10 mg/mL), K₂CO₃ (13 mM), [²¹¹At]At 1-5 MBq. ^a **4** (2,5 mM). RRCs déterminés par analyse radio-HPLC du brut réactionnel.

La concentration en précurseur **4** a tout d'abord été réduite à 2,5 mM, ce qui correspond à la concentration utilisée pour les radiomarquages des sels d'iodonium. Cela a conduit à une drastique chute du RRC jusqu'à 11 %. Cela montre que des concentrations très faibles ne pourront pas être atteintes, ce qui est une première limite pour cette classe de composé. Si cela ne représente pas un problème pour le radiomarquage de petites molécules organiques pour lequel le précurseur peut être facilement séparé du produit final, c'est un paramètre non négligeable dans le cadre d'un radiomarquage direct d'anticorps qui serait pré-modifié par des sels de triarylsulfonium. La nécessité d'une concentration en précurseur trop importante indiquerait qu'il faudrait avoir un anticorps extrêmement concentré et un grand nombre de ce précurseur greffé. A titre d'exemple, une concentration en sel de triarylsulfonium de 10 mM correspondrait à un anticorps à 30 mg/mL auquel on aurait greffé en moyenne 50 sels de triarylsulfonium. Très peu d'anticorps peuvent supporter une telle concentration, et autant de modifications auraient énormément d'impact sur les propriétés de reconnaissance de l'anticorps. Toutefois, il resterait intéressant de tester des concentrations intermédiaires entre 25 mM et 2,5 mM afin de déterminer quelle est la limite à ne pas dépasser pour un radiomarquage optimal.

Le deuxième paramètre étudié a été la température. Abaisser la température à 60 °C conduit à une diminution du RRC jusqu'à 57 %. La haute température semble alors nécessaire pour que la réaction puisse s'opérer rapidement. Ce paramètre est une nouvelle limite pour une application à un radiomarquage direct d'anticorps. Ces molécules issues du vivant sont thermosensibles et sont dégradées à des températures supérieures à 42 °C. Si les sels de triarylsulfonium nécessitent un chauffage à 90 °C en milieu organique, il est fort probable qu'un chauffage encore plus drastique soit nécessaire en milieu aqueux.

L'observation des chromatogrammes UV montre toutefois que moins de sous-produits sont formés lorsque la température est abaissée, jusqu'à quasiment aucun à 23 °C (figure 31). Cette étude plus poussée des sels de triarylsulfonium n'a été réalisée qu'avec l'astate-211, mais il est envisagé de la conduire avec l'iode-125 afin de mieux caractériser les éventuelles différences de réactivité entre les deux anions halogénures.

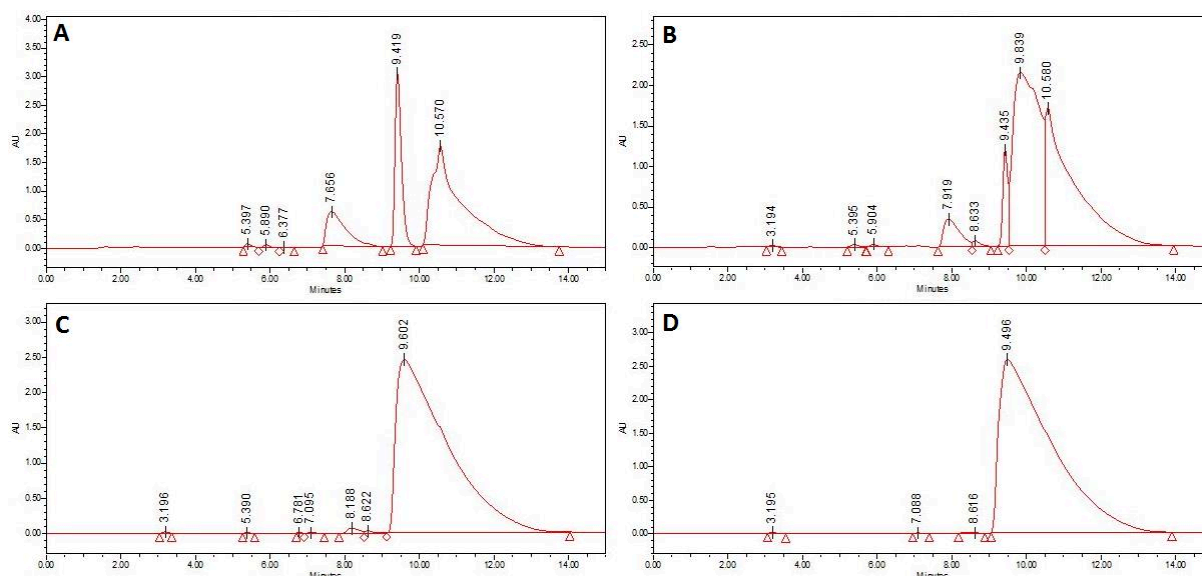


Figure 31. Chromatogrammes UV (254 nm) du radiomarquage à l'astate-211 de **4** A : à 90 °C ; B à 60 °C ; C à 42 °C ; D à 23 °C.

Pour conclure sur les sels de triarylsulfonium, ils sont finalement peu prometteurs dans le cadre d'un radiomarquage direct d'un anticorps pré-modifiés avec ce type de composés. La concentration en précurseur, ainsi que la haute température nécessaire ne sont pas adaptés pour une telle application. Ils restent néanmoins intéressants en tant que nouvelle classe pour le radiomarquage de petites molécules organiques, de très bons RRCs ayant été obtenus sur le composé modèle dans les conditions optimisées. Par rapport aux sels de biaryliodonium, ils peuvent être potentiellement plus intéressants sur de nombreux points. Tout d'abord le composé modèle **4** a montré une meilleure régiosélectivité par rapport au sel de biaryliodonium **1**. De plus, une des limites principales des sels d'iodonium est la formation de sous-produits issus d'une éventuelle dégradation, qui conduisent à des analogues iodés du produit final et qui ne sont donc pas séparables. Ce n'est pas le cas avec les sels de triarylsulfonium, dont les sous-produits sont soufrés et peuvent donc être séparés du produit final par HPLC. Cela conduirait donc à une meilleure A_m . Enfin, les sels de triarylsulfonium partagent l'avantage des sels de biaryliodonium d'être facilement séparé du produit final par simple filtration sur une cartouche de silice, et donc en l'absence de formation de sous-produit, cela éviterait de passer par une purification en HPLC, plus longue et qui occasionne plus de pertes.

Le temps de réaction est un paramètre qui n'a pas été étudié, mais son investigation serait intéressante afin de savoir s'il ne pourrait pas être réduit, ce qui serait un avantage pour le radiomarquage à l'astate-211 étant donné son court temps de demi-vie. Il resterait à confirmer qu'ils peuvent effectivement être dignes d'intérêt en réalisant la synthèse d'autres sels de triarylsulfonium avec divers substituants afin de déterminer si, à l'image des sels d'iodonium, les effets électroniques et stériques peuvent avoir une influence sur les rendements de radiomarquages ou sur la sélectivité.

Si les sels de sulfonium s'avèrent efficaces, la prochaine étape serait de synthétiser des précurseurs de molécules d'intérêt, comme le SAB qui pourrait servir pour le radiomarquage d'anticorps en deux étapes. Il sera alors intéressant de comparer l'efficacité de ce radiomarquage par rapport aux méthodes déjà existantes, notamment celle des sels de biaryliodonium.

I.4. Investigation du radiomarquage à l'astate-211 via les ylures d'aryliodonium

L'ylure d'aryliodonium **5** ayant permis d'obtenir un RRC de 89 % pour le radiomarquage à l'astate-211, cette classe semble extrêmement prometteuse en tant que nouvelle fonction de radiomarquage de cet halogène. Le premier point a été de trouver les conditions optimales de cette réaction en faisant varier des paramètres comme la température, la concentration en précurseur ou encore le solvant. Il a également été envisagé de voir si la réaction est possible en milieu aqueux, toujours dans l'optique de pouvoir réaliser un radiomarquage direct sur un anticorps pré-modifié par ce type de fonction. Une fois les conditions optimales déterminées, elles ont ensuite été appliquées pour le radiomarquage d'un large spectre d'ylures d'iodonium aux substituants plus ou moins électrodonneurs ou attracteurs afin de déterminer si ce type de précurseur est sensible ou non à ces effets électroniques, et dans quelle mesure il peut être utilisé.

I.4.1. Optimisation du radiomarquage à l'astate-211 du composé modèle

Tout comme pour le sel de triarylsulfonium, la première question était l'utilité du cryptant K222 avec K_2CO_3 pour la réaction de radiomarquage à l'astate-211. En effet, ces derniers ne sont pas nécessaires pour le radiomarquage de l'autre classe de composé iodé hypervalent, les sels d'iodonium. Un premier test a donc été effectué avec les mêmes conditions utilisées lors de la comparaison des différentes classes, cette fois-ci sans K222/ K_2CO_3 et sans évaporation azéotropique (tableau 14). Comme pour le sel de triarylsulfonium, le cryptant semble indispensable pour le bon déroulement de la réaction.

Tableau 14. Influence de K222/ K_2CO_3 dans le radiomarquage à l'astate-211 de l'ylure d'aryliodonium **5**.

Conditions	RRC (%)
Avec K222/ K_2CO_3	89
Sans K222/ K_2CO_3	7

Conditions standard : **5** 25 mM, ACN, 30 min, 90 °C, $[^{211}At]At^-$ 1-5 MBq. RRCs déterminés par analyse radio-HPLC du brut réactionnel.

Le principal inconvénient des ylures d'iodonium est que ce sont des composés thermosensibles^{274,288}. La température utilisée dans notre cas pour le radiomarquage (90 °C) est trop

haute et conduit à une décomposition de l'ylure d'iodonium, formant notamment le 4-chloriodobenzène (figure 32).

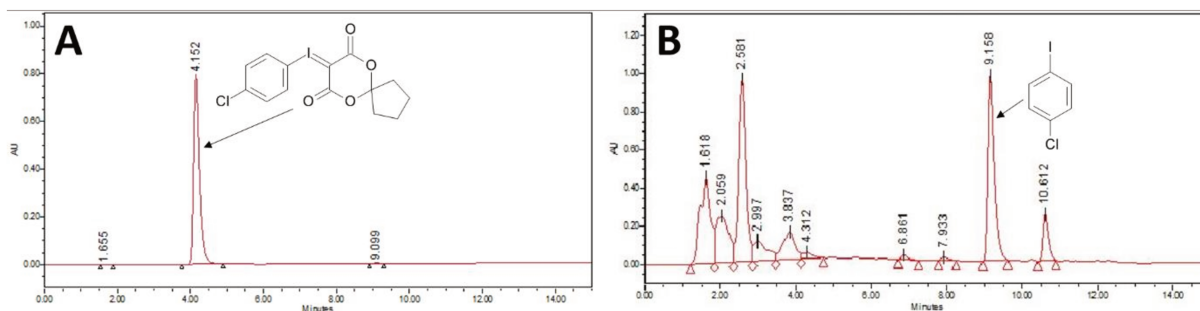


Figure 32. Chromatogrammes UV (254 nm) de l'ylure d'aryliodonium **5** (A) et d'un radiomarquage à l'astate-211 de l'ylure d'aryliodonium **5** à 90 °C (B).

Ce sous-produit a exactement le même temps de rétention que le produit astaté final **14b** à cause de la trop faible différence de polarité entre l'astate et l'iode. Par conséquent, séparer les deux produits s'avèrera difficile, voire impossible. Etant donné que l'astate-211 est utilisé à l'état de trace, il est très largement minoritaire par rapport à son homologue iodé. Il est fort probable que ce problème ne soit pas spécifique à l'ylure **5** et qu'il s'appliquera à tous radiomarquages *via* cette classe de composés. Dans le cas du radiomarquage de molécules organiques d'intérêt biologique, un mélange du produit astaté et iodé sera obtenu, impactant négativement l'A_m du produit purifié. Dans le cas du radiomarquage d'anticorps en deux étapes passant par la synthèse du groupement prosthétique [²¹¹At]SAB, le large excès de l'analogue iodé (SIB) présent en solution réagirait avec les lysines des protéines, laissant peu de sites pour le [²¹¹At]SAB, conduisant à une chute du RRC du couplage. Afin d'éviter de former ce sous-produit issu de la dégradation, des tests de radiomarquages à plus basse température ont été réalisés (figure 33). On observe alors beaucoup moins de dégradation du précurseur **5** dès 60 °C et quasiment aucune à 25 °C. Très peu de 4-chloriodobenzène est alors produit.

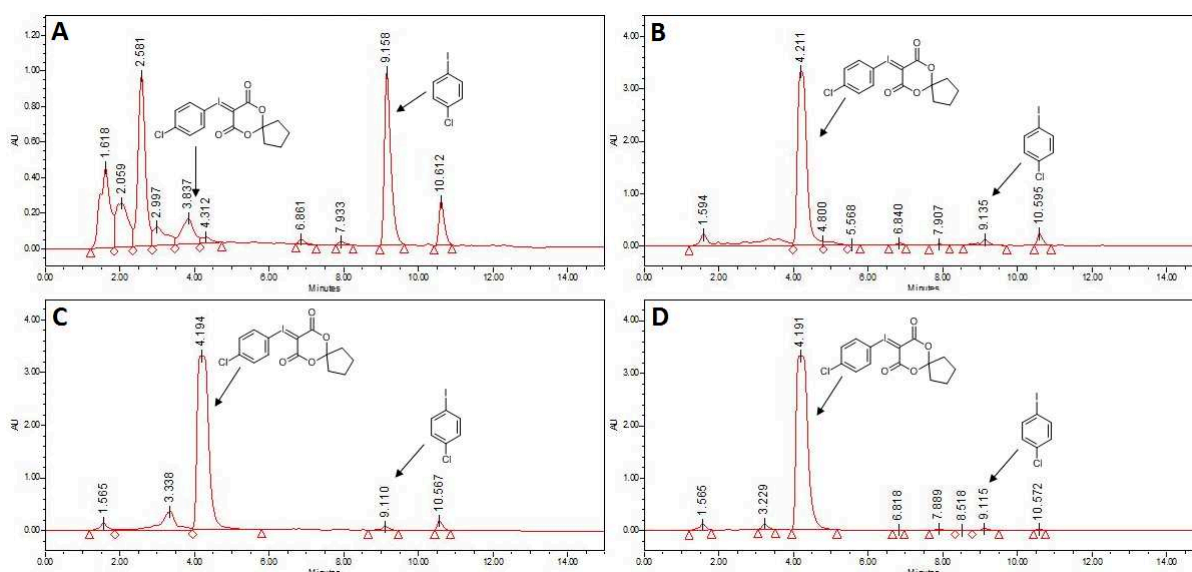


Figure 33. Chromatogrammes UV (254 nm) du radiomarquage de **5** à A 90 °C, B 60 °C, C 42 °C et D 25 °C.

L'abaissement de la température à 25 °C a également permis d'obtenir des RRCs légèrement meilleurs voire presque quantitatifs, sans doute dû à la préservation du précurseur de départ (tableau 15).

Tableau 15. Influence de la température sur le radiomarquage de l'ylure d'aryliodonium **5**.

Température	RRC (%)
90 °C	89
60 °C	87
42 °C	88
25 °C	96 ± 1 ^a

Conditions standard : **5** (25 mM), ACN, 30 min, K222 (10 mg/mL), K₂CO₃ (13 mM), [²¹¹At]At (1-5 MBq). ^an = 3. RRCs déterminés par analyse radio-HPLC du brut réactionnel.

La température idéale est donc 25 °C. Non seulement elle limite la dégradation du précurseur **5**, mais en plus de meilleurs RRCs sont obtenus. De plus, cette température est parfaitement adaptée pour les protéines, ce qui permet à ce stade de conserver les ylures d'iodonium comme candidats potentiels à un radiomarquage d'anticorps qui seraient pré-modifiés par ce type de fonction chimique.

Les ylures d'iodonium sont connus pour fonctionner sans nécessiter de catalyse métallique pour réagir en radiofluoruration. Cependant des travaux récents ont montré que de meilleurs RRCs peuvent être obtenus avec une catalyse au cuivre pour le radiomarquage au fluor-18 d'autres composés d'iode hypervalent, les sels d'iodonium, tout en abaissant la température de la réaction²⁸⁹.

Afin de vérifier si le RRC, déjà très bon dans notre cas, peut être amélioré par l'usage d'un catalyseur, un test a été réalisé en rajoutant le $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$. Cela n'a toutefois pas apporté un impact positif, au contraire, le RRC chutant de 96 ± 1 à seulement 2 %. Les ylures d'iodonium peuvent se dégrader en présence d'un catalyseur de cuivre $\text{I}^{288,290}$. Cependant dans notre cas, le cuivre est introduit au degré d'oxydation II. Plus d'investigation seraient nécessaires afin de comprendre comment agit le catalyseur au cuivre dans la réaction et en quoi il peut l'inhiber.

Le dernier paramètre d'optimisation à faire varier est le solvant (tableau 16). Le rendement de radiomarquage à 25 °C donnant des rendements quasi-quantitatifs, il a été choisi de réaliser cette étude à 60 °C afin de pouvoir évaluer si un solvant est meilleur que l'acétonitrile.

Tableau 16. Influence du solvant sur le radiomarquage à l'astate-211 de 5.

Solvant	RRC
CH_3CN	87
CH_3CN	48 ^a
DMF	13
DMSO	7
MeOH	60
CH_3CN / Toluène 40 / 60	89
CH_3CN / Toluène 50 / 50	91 ^a
CH_3CN / H_2O 50/50	9

Conditions standard : 5 (25 mM), 30 min, 60 °C, K222 (10 mg/mL), K_2CO_3 (13 mM), $^{211}\text{At}]/\text{At}$ 1-5 MBq. ^a 5 (12,5 mM), 25 °C. . RRCs déterminés par analyse radio-HPLC du brut réactionnel.

Augmenter la polarité du solvant semble conduire à une diminution importante du RRC, qui passe de 87 % dans l'acétonitrile à 13 % et 7 % avec le DMF et le DMSO respectivement. Le méthanol, solvant protique moins polaire que les précédents, donne un RRC intermédiaire de 60 %. Afin de diminuer encore la polarité, un test en toluène a été réalisé, avec 40 % d'acétonitrile qui permet de solubiliser le précurseur. Le RRC alors obtenu est de 89 %, ce qui n'est pas une différence significative par rapport au test en acétonitrile pur. Cependant réaliser ces mêmes tests en diminuant la concentration en précurseur et à 25 °C montre bien que le toluène favorise la réaction, avec 91 % de RRC contre seulement 48 % en acétonitrile. Afin de pouvoir estimer si la réaction serait transposable à un anticorps pré-modifié par des ylures d'aryliodonium, un test a été réalisé en acétonitrile/ H_2O . Malgré le fait qu'au-delà de 20 % de solvant organique le marquage n'est pas envisageable sur un anticorps car cela conduirait à sa dénaturation, un ratio de 50/50 a été choisis sur ce premier test en raison de la solubilité limitée de l'ylure dans l'eau. Il est à noter que même avec 50 % d'acétonitrile, le précurseur n'était pas totalement solubilisé. Cela peut en partie expliquer le faible RRC de 9 % observé,

car il a été vu précédemment que la concentration en précurseur ne pouvait pas être diminuée. De plus, l'eau est un solvant protique très polaire, ce qui ne favorise pas cette réaction. Ce manque de réactivité en milieu aqueux montre que ce type de composé est inadapté pour une application en radiomarquage direct de protéines. L'acétonitrile a été conservé comme solvant pour la suite des investigations.

Enfin, une étude de la cinétique menée sur l'ylure d'aryliodonium **5** a révélé que la réaction de radiomarquage est plutôt rapide, ne demandant que 15 minutes à 25 °C pour attendre le RRC optimal (figure 34). Même au bout de deux minutes, un RRC autour de 60 % peut être obtenu. On peut supposer qu'à plus haute température, la réaction serait alors plus rapide et cela pourrait éventuellement expliquer pourquoi la même réaction appliquée à l'iode-125 n'a pas fonctionné à 80 °C, car à cette température, on constatait la dégradation du précurseur de départ. Il est possible qu'à cette température, l'astate-211 réagisse suffisamment rapidement pour que la réaction de radiomarquage s'effectue avant la dégradation de l'ylure d'aryliodonium **5**. La même réaction avec l'iode-125 pourrait quant à elle avoir une cinétique plus lente et l'halogénure pourrait ne pas avoir le temps de réagir avant la dégradation du précurseur. Il pourrait être intéressant pour confirmer cette hypothèse de réaliser la même réaction de radiomarquage avec l'iode-125 mais à 25 °C.

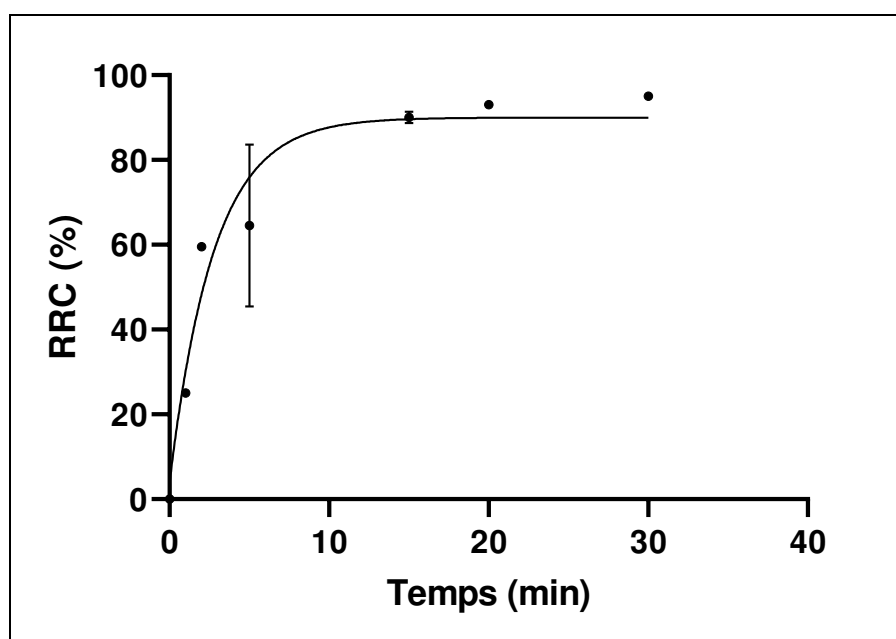


Figure 34. Cinétique de réaction de l'ylure p-Cl **5** à 25 °C.

Conditions : **5** (25 mM), CH₃CN, [²¹¹At]At⁻ (1-5 MBq). n = 1 pour 1 min, 20 min et 30 min et n = 2 pour 2 min, 5 min, 15 min.

Au vu des résultats, les ylures d'iodonium semblent finalement peu adaptés à un radiomarquage direct d'anticorps. Cependant, ils restent intéressants en tant que nouveau précurseur pour le marquage à l'astate-211 de molécules organiques. Ils offrent l'avantage par rapport aux sels

de biaryliodonium de ne pas avoir de problème de régiosélectivité et par conséquent, un seul produit peut être obtenu, conduisant à un meilleur RRC. Afin de déterminer dans quels cas ils peuvent être utilisés, la suite du travail s'est portée sur l'influence des substituants sur le rendement de radiomarquage.

I.4.2. Variation des substituants

I.4.2.1. Synthèse des précurseurs

Tout d'abord, la synthèse de plusieurs ylures d'iodonium avec des substituants aux effets électroniques variés a été réalisée. Le groupement le plus électrodonneur choisi est le *m*-O*i*Pr. Le groupement méthyle a été choisi comme groupement électrodonneur. Similairement à ce qui a été observé avec les sels de biaryliodonium, l'effet *ortho* peut avoir une influence majeure sur les ylures d'aryliodonium dont les rendements de substitution nucléophile sont grandement améliorés lorsqu'un substituant se trouve dans cette position (cf introduction bibliographique III.1.1.5). Cela a été expliqué en radiofluoruration par l'état de transition qui est favorisé dans le cas où l'aryle possède un substituant en *ortho* (figure 35).²⁷⁴ Dans le cas où le substituant est en position *para* (conformation 1), l'aryle se retrouve dans le même plan que celui formé par les liaisons entre l'iode, le carbone et le fluor, ce qui est supposément dû à la stabilisation de ce dernier par liaison hydrogène. Dans le cas où le substituant est en position *ortho* (conformation 2), l'encombrement stérique qu'il génère entraîne le positionnement de l'aryle hors du plan C-I-F, ce qui est plus favorable à la formation de l'état de transition de la substitution nucléophile qui se déroule également hors du plan. Ces conformations conduisent à la formation du fluorure d'aryle avec une différence de 5 kcal/mol en faveur de la conformation 2.

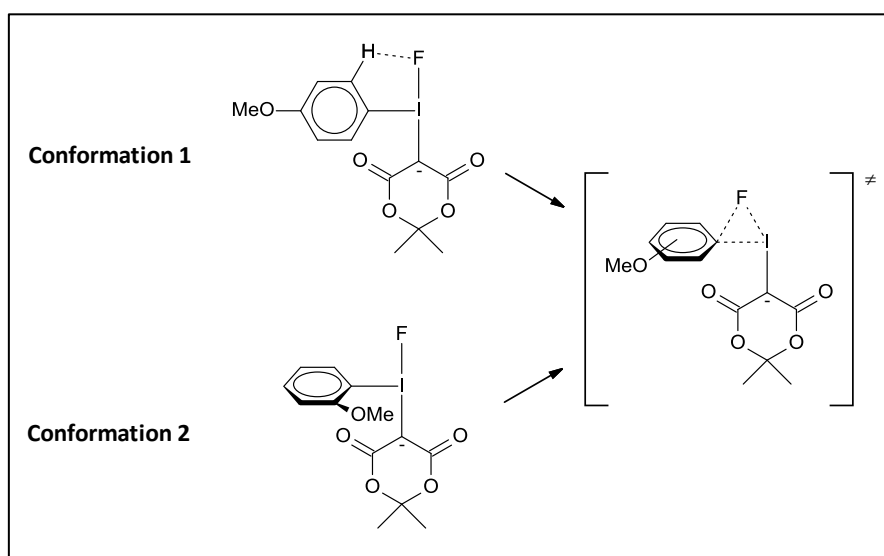


Figure 35. Conformations adoptées par un ylure d'iodonium lors d'une radiofluoruration suivant la position des substituants.

Afin de vérifier si cet effet *ortho* serait observé dans notre cas pour le radiomarquage à l'astate-211, deux versions ont alors été synthétisées, une avec le méthyle en position *ortho* et l'autre en position *para*. Le $p\text{-NO}_2$ et le $p\text{-CN}$ ont été choisis comme groupements attracteurs. Une version $p\text{-CO}_2\text{Et}$ a également été réalisée car c'est un groupement qui serait proche d'un précurseur du SAB en termes d'effets électroniques. Enfin, des ylures d'aryliodonium porteurs de groupements N_3 ont été synthétisés car ils pourraient présenter un intérêt pour le radiomarquage de protéines par des approches de chimie click¹⁸⁷. Le premier possède directement le N_3 en *para* du cycle aromatique. Cependant des tests de radiomarquages à l'astate-211 de cette molécule menés en parallèle dans notre laboratoire par la chimie des sels d'aryliodonium a montré que le produit de la réaction serait trop volatile²⁹¹. Elle a tout de même été ajoutée à l'étude, mais une deuxième version a été synthétisée avec un $m\text{-CH}_2\text{N}_3$. Les synthèses des ylures d'aryliodonium se sont effectuées à partir des composés iodoaryles correspondant. La plupart étaient disponible dans le commerce, hormis les iodoaryles $p\text{-N}_3$ **17** et $m\text{-CH}_2\text{N}_3$ **18** et ont donc dû être synthétisés.

Le traitement de la 4-iodoaniline **19** par NaNO_2 en milieu acide a permis de former l'intermédiaire sel de diazonium. L'iodoaryle **17** a ensuite été obtenu par substitution nucléophile avec le groupement azoture de NaN_3 avec un rendement de 79 % (schéma 25).

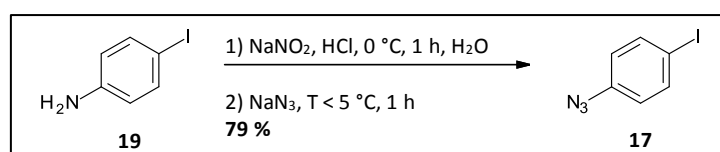


Schéma 25. Synthèse de l'iodoaryle **17**.

L'iodoaryle **18** a quant à lui été obtenu à partir du composé bromé correspondant **20** par substitution nucléophile avec le groupement azoture de NaN_3 avec un rendement de 83 % (schéma 26).

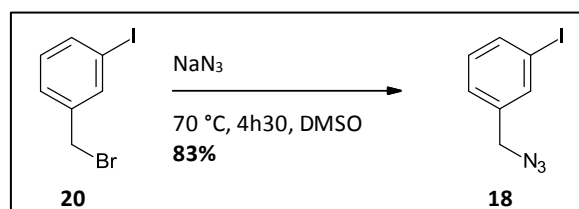
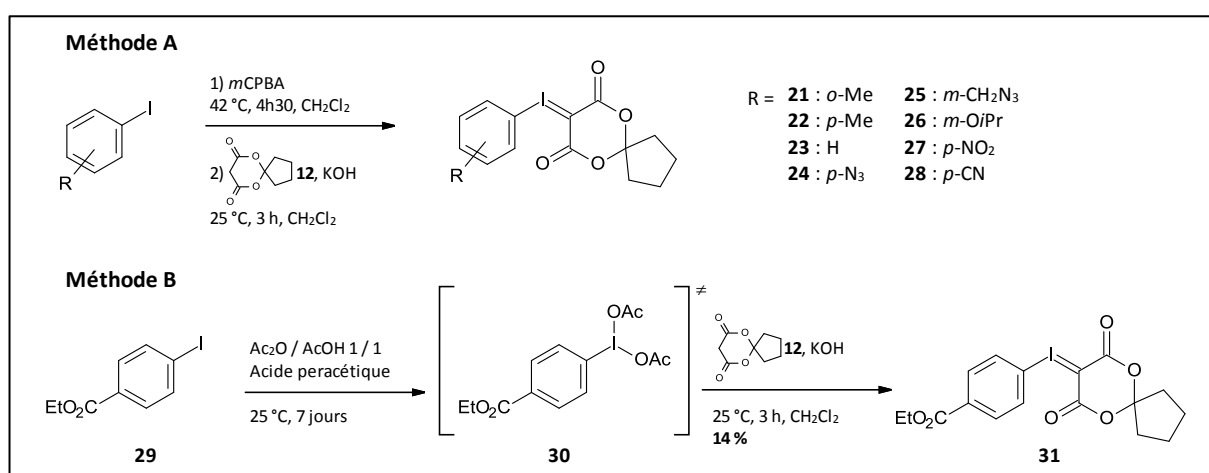


Schéma 26. Synthèse de l'iodoaryle **18**.

Deux méthodes de synthèses d'ylures d'aryliodonium ont été employées. La méthode A est la même que celle utilisée pour la synthèse de l'ylure $p\text{-chloro}$ **5**. Elle a été utilisée pour la plupart des ylures de la série. Cependant ce protocole ne semblait pas adapté pour la synthèse du composé avec le groupement ester car le milieu extrêmement basique nécessaire à l'étape de substitution

nucléophile de l'acide de meldrum **12** sur l'intermédiaire aryle iodane λ^3 (7 équivalents de KOH) pourrait engendrer sa saponification. Afin d'éviter cela, un test a été effectué en remplaçant KOH par Na_2CO_3 , qui est une base plus douce parfois employée pour cette étape^{276,277,292}. Cependant, cela n'a pas conduit à la formation de l'ylure **31**. La méthode B a ensuite été réalisée. Cette dernière consistait à réaliser l'étape d'oxydation de l'iodoaryle **29** par l'acide péraétique en présence d'acide acétique et d'anhydride acétique pour obtenir l'intermédiaire ester 4-(Diacétoxyiodo)benzoate d'éthyle **30** selon un protocole déjà décrit pour cette molécule²⁹³. L'acide de meldrum est ensuite ajouté avec seulement un équivalent de KOH sur l'intermédiaire **30** pour former l'ylure d'aryliodonium **31** avec un rendement de 14 %. Les rendements obtenus pour chaque ylure d'iodonium sont reportés dans le tableau 17 :

Tableau 17. Synthèse des ylures d'aryliodonium.



R	<i>m</i> -OiPr	<i>o</i> -Me	<i>p</i> -Me	H	<i>p</i> -N ₃	<i>m</i> -CH ₂ N ₃	<i>p</i> -COOEt	<i>p</i> -CN	<i>p</i> -NO ₂
Rendement	38 %	21 %	23 %	43 %	18 %	15 %	14 %	16 %	19 %

La nature du groupement sur le noyau aromatique a un impact sur le rendement de synthèse. Le meilleur rendement a été obtenu en l'absence de substituant. Les groupements donneurs sont ensuite les plus efficaces, avec le *m*-OiPr qui conduit à un rendement de 38 %. A l'inverse, les groupements attracteurs défavorisent la réaction, jusqu'à seulement 14 % de rendement pour l'ester. Devant les faibles rendements pour ces derniers ylures d'aryliodonium, un autre protocole a été investigué sur le composé cyano, en réalisant d'abord l'oxydation de l'iodoaryle **32** correspondant avec un mélange d'oxone et de TFA suivant un protocole déjà décrit²⁹³ pour obtenir l'intermédiaire 4-(diacétoxyiodo)benzonitrile **33**. La condensation entre **33** et l'acide de meldrum **12** en présence de KOH a permis d'obtenir l'ylure d'aryliodonium **28** avec un rendement de seulement 0,7 % (schéma 27). Malgré les rendements très faibles obtenus, il n'y a pas eu davantage de tentatives d'optimisation car très peu de matière est nécessaire pour effectuer un radiomarquage (quelques milligrammes) et suffisamment de produit a pu être obtenu.

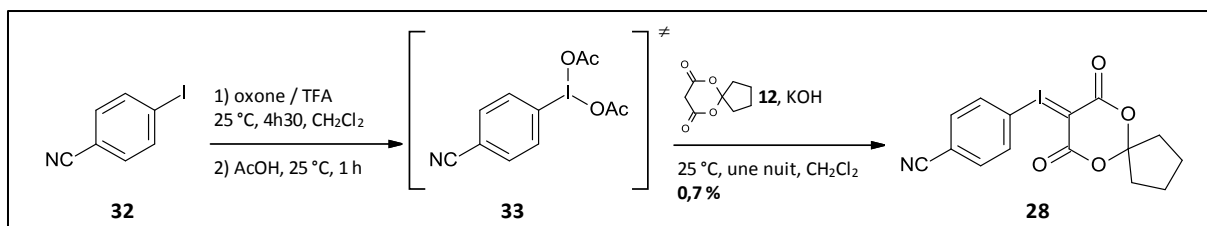
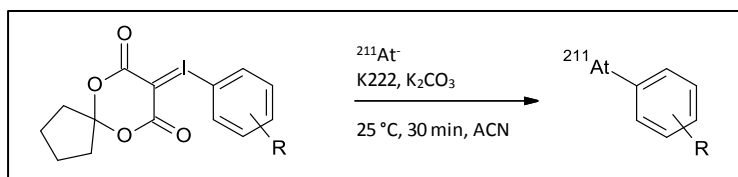


Schéma 27. Synthèse alternative de l'ylure d'aryliodonium **28**.

I.4.2.2. Radiomarquage des précurseurs à l'astate-211

Une fois la série d'ylures d'iodonium obtenus, ils ont pu être testés en radiomarquage à l'astate-211 dans les conditions optimisées précédemment établies. Les résultats sont présentés dans le tableau 18. Les RRCs sont comparés à la constante de Hammett, qui est un paramètre caractéristique de chaque substituant. Une valeur négative défavorise la réaction, tandis qu'un paramètre positif la favorise, dans le cas de processus nucléophiles. Cette logique se retrouve dans notre cas, avec des rendements plus faibles obtenus avec le groupement *p*-Me qui a une constante de Hammett négative ($\sigma = -0,17$) par rapport à l'ylure d'aryliodonium sans substituant qui sert de référence ($\sigma = 0$). L'effet *ortho* n'a pas amélioré la réaction, avec un RRC obtenu avec le substituant *o*-Me comparable avec le *p*-Me. A l'inverse, les groupements qui ont un σ positif donnent de meilleurs RRCs. La logique voudrait que le RRC augmente avec cette constante, ce qui se vérifie entre les groupements *p*-N₃, *m*-OiPr et *p*-Cl. Cependant, les groupements *p*-CO₂Et, *p*-NO₂ et *p*-CN donnent tous des rendements inférieurs au *p*-Cl alors que leur constante est supérieure. Cela peut s'expliquer par le fait que ces derniers se sont en partie dégradés pendant la réaction de radiomarquage. De plus, l'ylure d'aryliodonium **31** n'était pas entièrement soluble à 25 mM dans l'acétonitrile. Or les tests d'optimisation ont montré que la concentration en précurseur ne pouvait pas être baissée, ce qui explique un RRC moins bon dans ce cas. Les ylures d'aryliodonium sont connus pour être souvent difficilement solubles dans la plupart des solvants organiques. Cependant leur solubilité peut être améliorée par l'ajout d'un groupement coordonnant donneur en position *ortho* de l'aryle, notamment le groupement *o*-alkoxy²⁹⁴. On peut conclure de cette étude que la constante de Hammett semble tout de même être prédictive du RRC, ce qui prouve que la réaction de radiomarquage suit bien un mécanisme de S_NAr.

Tableau 18. Influence du substituant sur le RRC du radiomarquage des ylures d'iodonium à l'astate-211.



R	Constante de Hammett σ	RRC (%)
<i>o</i> -Me	-	4
<i>p</i> -Me	-0,17	5
H	0	14
<i>p</i> -N ₃ ^c	0,08	17
<i>m</i> -OiPr	0,1	21
<i>p</i> -Cl	0,227	96 ± 1 ^a
<i>p</i> -CO ₂ Et ^{b,c}	0,45	75
<i>p</i> -CN ^c	0,66	79
<i>p</i> -NO ₂ ^c	0,78	71

Conditions standard : Précurseur (25 mM), ACN, 25 °C, 30 min, K222 (10 mg/mL), K₂CO₃ (13 mM), [²¹¹At]At⁻ 1-5 MBq. ^a*n* = 3, ^bprécurseur peu soluble, ^cdégradation du précurseur. RRCs déterminés par analyse radio-HPLC du brut réactionnel.

Les ylures d'iodonium seraient donc des précurseurs adaptés pour le radiomarquage à l'astate-211 par S_NAr de molécules organiques possédant des groupements attracteurs. Cependant, la formation de l'iodoaryle a été observé lors de la plupart des radiomarquages sur les chromatogrammes HPLC UV (R = *o*-Me, *m*-OiPr, CO₂Et, H, *p*-CN, *p*-NO₂). Ce composé ayant un temps de rétention très proche du produit astaté final, ils sont difficilement séparables, ce qui peut représenter une limite de la chimie des ylures d'iodonium lorsqu'une A_m élevée est souhaitée. Néanmoins cette dégradation n'a pas été observée dans tous les cas et dépend donc du substrat.

1.4.2.3. Conclusion sur les ylures d'aryliodonium

Pour conclure sur les ylures d'aryliodonium, les conditions nécessaires à un radiomarquage efficace ne semblent pas être compatibles avec un éventuel radiomarquage de protéines pré-modifiées par ce type de fonction, de par la faible réactivité de ce type de précurseur en milieu aqueux ainsi que sa concentration importante nécessaire pour des RRCs optimaux.

Cependant, cette catégorie de précurseurs pourrait être utilisée pour le radiomarquage à l'astate-211 de molécules organiques possédant des substituants attracteurs, où des RRCs satisfaisant ont pu être obtenus. Ils présentent l'avantage par rapport aux sels de biaryliodonium de ne pas avoir de problème de régiosélectivité, un seul produit radiomarqué étant possible. Par conséquent, même avec des faibles RRCs, cela permet l'obtention de composés aryles avec des substituants désactivants.

Un composé d'intérêt pour la chimie click, porteur d'un groupement $p\text{-N}_3$ a notamment pu être synthétisé. D'autres ylures d'intérêts pourraient être envisagés. Un précurseur pour le SAB semble difficilement envisageable, car il serait difficile à synthétiser de par l'utilisation de KOH à la dernière étape, ce qui entraînerait probablement l'hydrolyse de l'ester activé. D'un autre côté, un ylure d'aryliodonium possédant une fonction maléimide qui permettrait le couplage aux cystéines des protéines pourrait être une bonne alternative. Un autre aspect à investiguer serait l'étude cinétique qui permettrait d'établir le mécanisme de la réaction et de comprendre la différence de réactivité entre l'iode-125 et l'astate-211.

I.5. Optimisation du radiomarquage *via* les acides arylboroniques

Les acides arylboroniques ont donné des RRCs quasiment quantitatifs avec les deux radionucléides en 30 minutes à haute température dans les tests préliminaires, ce qui en fait une classe particulièrement prometteuse pour le radiomarquage avec ces deux halogènes. À l'image de ce qui a été fait pour les sels de triarylsulfonium et les ylures d'aryliodonium, le premier objectif a été de déterminer les conditions optimales de radiomarquage sur le composé modèle **6**. L'importance de la présence du kryptofix a été le premier paramètre investigué. Un nouveau radiomarquage à l'astate-211 a été effectué en l'absence de K222/K₂CO₃ et sans l'évaporation azéotropique. Le RRC obtenu reste quantitatif, montrant qu'ils n'étaient pas nécessaires (tableau 19). K222/K₂CO₃ ont donc été éliminés pour la suite des tests, ce qui permet une simplification de la procédure de radiomarquage car elle ne nécessite plus d'étape d'évaporation.

Tableau 19. Influence de K222/K₂CO₃ dans le radiomarquage à l'astate-211 de l'acide arylboronique **6**.

Condition	RRC (%) ^a
Avec K222/K ₂ CO ₃	>99 %
Sans K222/K ₂ CO ₃	>99 %

^aConditions standard : **6** (25 mM), ACN, 30 minutes, 90 °C, [²¹¹At]At⁻ 1-5 MBq. RRCs déterminés par analyse radio-HPLC du brut réactionnel.

Même si le radiomarquage fonctionne de manière quantitative en acétonitrile, le précurseur est peu soluble dans ce solvant. C'est pourquoi il a été remplacé par du méthanol, qui permet une parfaite solubilisation du précurseur et du catalyseur, tout en maintenant un RRC quantitatif. L'étude de l'influence de la température a ensuite été réalisée sur le radiomarquage à l'astate-211 (tableau 20). Un RRC quantitatif est obtenu pour chaque température testée, même à 25 °C.

Tableau 20. Influence de la température sur le radiomarquage à l'astate-211 de l'acide arylboronique **6**.

Température (°C)	RRC (%) ^a
90^b	>99
90	99
60	>99
42	>99
25	>99

^aConditions standard : **6** (25 mM), Cu(OTf)₂pyr₄ (25 mM), MeOH, [²¹¹At]At⁻ 1-5 MBq, ^b CH₃CN. RRCs déterminés par analyse radio-HPLC du brut réactionnel.

Ces conditions optimisées obtenues pour le radiomarquage à l'astate-211 (absence de K₂S₂O₈/K₂CO₃, MeOH, 25 °C) ont ensuite été appliquées en radioiodation et des RRCs de 99 ± 1 % (n = 3) ont été obtenu. Le radiomarquage d'acides boroniques à l'iode-131 a déjà été décrit à température ambiante avec un catalyseur de cuivre I (Cu₂O) en présence de la 1,10-phénantroline²⁰⁹. Reprendre ces conditions a conduit à un RRC de seulement 73 % à l'iode-125 dans notre cas^k. Nos conditions ont alors été préservées.

La suite de cette l'étude très prometteuse consistait à réaliser un radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 sur différents acides boroniques avec des substituants variés afin d'évaluer la portée de cette réaction. Cependant ce travail a été publié par le laboratoire de R. Mach *et al* de l'université de Pennsylvanie en 2018 alors que nous commençons cette phase du projet²¹⁰. Ce groupe a montré la grande versatilité de ce radiomarquage qui fonctionne sur une large gamme de composés modèles (hétéro)aromatiques avec des substituants aux différents effets électroniques et l'a appliqué à la synthèse du [²¹¹At]PARP-1, une petite molécule d'intérêt pour le traitement de divers cancers. Par conséquent, la suite du travail s'est orientée plus rapidement que prévu vers l'exploitation de cette classe de précurseurs prometteuses pour le radiomarquage en milieu aqueux dans l'optique de radiomarquer des protéines pré-modifiées par des acides boroniques. Ce travail est décrit dans la deuxième partie de la thèse.

I.6. Conclusion

L'objectif de cette partie était de trouver de nouvelles classes de précurseurs pour le radiomarquage à l'astate-211. Parmi toutes celles testées, trois se sont révélées digne d'intérêt : les sels de sulfonium, les ylures d'iodonium et les acides boroniques. Le sel de sulfonium présente l'avantage, par rapport aux sels d'iodonium déjà connu, de posséder une meilleure sélectivité, ce qui permet d'accéder à des RRCs plus élevés, en plus de ne pas engendrer de sous-produit iodé qui ne

^k Conditions : 1 h, 25 °C, CH₃CN, 50 µL, **6** (40 mM), Cu₂O (≈ 8 mM), 1,10-phénantroline (16 mM)

serait pas séparable du produit final. Cependant une haute température est nécessaire, ainsi qu'une concentration importante en précurseur. Ce type de composé semble donc adapté pour le radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 de petites molécules organiques, mais est inenvisageable pour un radiomarquage direct de protéines. Concernant cette catégorie de précurseur, il resterait à réaliser la synthèse d'autres composés aux substituants variés afin d'évaluer l'influence des effets électroniques et stériques sur les RRCs. La synthèse de composés d'intérêts, comme un précurseur pour la synthèse du SIB ou du SAB pourrait être envisagée.

Les ylures d'iodonium ont la particularité de ne fonctionner qu'au radiomarquage à l'astate-211. Des rendements quantitatifs ont pu être obtenus à 25 °C avec le composé modèle. Cependant ils restent des composés très sensibles et des dégradations ont pu être observées lors du radiomarquage à l'astate-211 de la plupart des ylures d'aryliodonium testés. Ils peuvent toutefois donner des RRCs intéressants lorsque des groupements activants sont présents sur le cycle aromatique. Leur faible réactivité dans les solvants polaires laisse penser qu'ils seront difficilement utilisables dans le cadre de radiomarquage de protéines. Néanmoins, ils restent intéressants pour le radiomarquage de molécules organiques, avec comme avantage considérable par rapport aux sels de biaryliodonium de ne pas poser de problème de régiosélectivité. La synthèse de nouveaux ylures d'intérêts, notamment possédant un groupement maléimide pour le couplage aux cystéines des protéines, pourrait être envisagée. De plus, une étude cinétique pourrait être réalisée afin de mieux comprendre le mécanisme de la réaction de radiomarquage et ainsi expliquer la différence de réactivité entre l'iode-125 et l'astate-211.

Enfin, les acides boroniques donnent des RRCs quantitatifs pour les radiomarquages à l'iode-125 et à l'astate-211 du composé modèle, même à 25 °C. L'étude de sa réactivité en milieu aqueux a donc été envisagée afin de savoir s'ils peuvent être utilisés pour le radiomarquage direct de protéines, ce qui sera le sujet de la partie II.

II. Mise au point d'une méthode de radiomarquage d'anticorps en une étape par halodéboronation nucléophile

Les acides arylboroniques ont déjà montré dans la partie précédente qu'ils pouvaient permettre le radiomarquage à 25 °C et que la présence de 10 % d'eau dans le milieu réactionnel ne perturbait pas la réaction. Si c'est un début prometteur, de nombreux points restent à investiguer sur le composé modèle avant d'envisager un radiomarquage d'anticorps. Notamment, la concentration en précurseur (25 mM) qui doit être considérablement réduite et surtout, l'efficacité du radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 dans un milieu majoritairement aqueux. Une part de solvant organique devra tout de même être conservée afin de solubiliser les réactifs, mais elle ne devra pas excéder 15 % en volume car c'est la valeur maximale tolérée par les protéines. Si la réaction est toujours possible dans de telles conditions, alors des tests sur des protéines peuvent être effectués. L'anticorps anti-CD22 a été le premier testé car il présente l'avantage d'être disponible en large quantité dans le laboratoire, permettant de mener des tests d'optimisation de la chimie. Cependant, le laboratoire ne possède pas l'antigène cible de cet anticorps, par conséquent, il ne sera pas possible d'effectuer des tests biologiques, qui seront pourtant nécessaires afin de vérifier que le nouveau procédé de radiomarquage n'altère par ses propriétés. C'est pourquoi une fois les conditions optimales déterminées avec l'anti-CD22, ces dernières seront appliquées à un autre anticorps produit au laboratoire, le 9E7.4, sur lequel des tests biologiques sont possibles.

II.1. Mise au point sur un composé modèle

La première étape de ce travail a consisté en l'étude de la réaction de radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 sur un composé modèle afin de déterminer si elle était réalisable dans un milieu compatible avec les protéines. Pour ce faire, le même composé modèle que celui utilisé dans la partie I, l'acide 4-chlorobenzène boronique **6** a été utilisé. Tout d'abord, le premier paramètre travaillé a été la concentration en précurseur qui devait être diminuée afin que, d'une part, il puisse être plus facilement solubilisé lorsque le radiomarquage sera effectué en milieu aqueux et d'autre part, pour avoir une concentration qui correspondrait à un nombre raisonnable d'acides arylboronique greffés par anticorps. Comme vu dans la partie précédente, des RRCs quantitatifs sont obtenus en 30 minutes à 25 °C en méthanol avec une concentration en précurseur de 25 mM pour les deux radionucléides (tableau 21). Il est intéressant de noter que la même réaction sans catalyseur ne conduit à aucune radioiodation, tandis que 44 % d'astatation est observé. Or, un procédé nucléophile sans catalyseur ne devrait pas pouvoir conduire à une conversion radiochimique. Il est possible que l'anion astature s'oxyde partiellement dans le milieu réactionnel en At^+ et réagit en tant qu'électrophile sur la fonction

acide boronique, à l'image de ce qui a été observé pour la radioiodation électrophile d'aryltrifluoroborate ou d'acides boroniques qui peut s'effectuer en présence ou en l'absence de catalyseur.^{196,295} La concentration en précurseur et en catalyseur a ensuite été réduite, afin de faciliter leur solubilisation une fois que le radiomarquage passera en milieu aqueux d'une part, et de ramener le précurseur à une concentration acceptable pour le radiomarquage d'une protéine d'autre part. Des RRCs toujours quantitatifs ont alors été obtenus, même à une concentration de 250 μ M, une condition qui correspondrait à approximativement une solution d'anticorps concentré à 6 mg/mL avec environ 6 acides boroniques par protéines en terme de groupements acides boroniques disponibles, ce qui semble adapté. La concentration de 6 mg/mL est suffisamment faible pour être supportée par la plupart des anticorps. Quant au nombre de modifications, il semble suffisamment faible pour ne pas altérer les propriétés de reconnaissances de l'anticorps. Aneheim *et al* ont notamment reportés des anticorps modifiés avec un nombre de linkers de structure similaire compris entre 5 et 9 par anticorps et dont les immunoréactivités n'étaient pas altérées^{266,296}.

Le passage en milieu aqueux a ensuite été effectué, en gardant toujours 15 % de méthanol en co-solvant pour permettre la dissolution du précurseur et du catalyseur. Ces conditions ont conduit à une chute des RRCs pour les deux radionucléides. Si la radioiodation a chuté jusqu'à 17 %, l'astatation est toutefois restée relativement haute avec un RRC de 74 %. La première hypothèse pour expliquer cette différence est le même mécanisme électrophile formulé pour le radiomarquage à l'astate-211 qui peut s'effectuer sans catalyseur en méthanol. Cependant cette hypothèse a été éliminée car un test mené dans les mêmes conditions aqueuses en l'absence de catalyseur a conduit à un RRC nul. La deuxième hypothèse qui pourrait expliquer cette différence entre les deux halogènes est la plus grande polarisabilité de l'astature. Par conséquent, il est moins désactivé que l'anion iodure par le phénomène d'hydratation dans un mécanisme nucléophile.

Les ligands de types phénantrolines ont montré leur capacité à améliorer la radiohalogénéation nucléophile *via* les acides boroniques à l'iode et à l'astate en milieu organique.^{209,210} C'est pourquoi la 1,10-phénantroline **34** a été utilisée, conduisant à une nette amélioration des RRCs en milieu aqueux, passant de 17 à 85 % pour la radioiodation et de 74 à > 99 % pour l'astatation. D'autres solvants organiques couramment utilisés avec les protéines (quand ils sont utilisés dans des proportions inférieures à 20 %) ont ensuite été testés, et bien qu'aucune différence notable n'a été observée pour le radiomarquage à l'astate, le DMF s'est avéré légèrement meilleur pour la radioiodation. Il permet de plus une meilleure dissolution du catalyseur par rapport au méthanol. C'est pourquoi le DMF a été conservé comme co-solvant pour la suite des tests.

Tableau 21. Investigation préliminaire de la ^{125}I -radioiodation et l' ^{211}At -astatation de l'acide 4-chlorobenzène boronique **6**. RRCs déterminés par analyse radio-HPLC du produit brut^a.

[6] (mM)	[Cu(OTf) ₂ pyr ₄] (mM)	[1,10-phénanthroline] (mM)	Solvant	RRC (%)	
				^{125}I	^{211}At
25	0	0	MeOH/H ₂ O (9/1)	0	44 ± 7 ^b
25	25	0	MeOH/H ₂ O (9/1)	99 ± 1	99 ± 1
10	10	0	MeOH/H ₂ O (9/1)	>99	98 ± 3
0,25	10	0	MeOH/H ₂ O (9/1)	>99	99 ± 1
0,25	10	0	H ₂ O/MeOH (85/15)	17 ± 2	74 ± 5
0,25	0	0	H ₂ O/MeOH (85/15)	-	0
0,25	10	10	H ₂ O/MeOH (85/15)	85 ± 2	>99 %
0,25	10	10	H ₂ O/DMF (85/15)	91 ± 1	99 ± 1
0,25	10	10	H ₂ O/DMSO (85/15)	88 ± 2	99 ± 1

^aConditions standard : [^{125}I]NaI ou [^{211}At] (0,5 – 2 MBq), 100 μL , 30 min, $n = 3$, ^b $n = 7$.

Il est à noter que le DTT, qui était utilisé comme réducteur de l'astate de la partie précédente, a été remplacé ici par une solution de sulfite de sodium à 1 mg/mL en eau car le DTT entraînait une dégradation de la 1,10-phénanthroline faisant chuter le RRC.

Enfin, pour se rapprocher des conditions de radiomarquage d'une protéine qui sont généralement stockées et utilisées dans une solution tampon et non en eau pure, la réaction a été investiguée dans plusieurs solutions tampons (tableau 22). Tous les tampons ont été utilisés à un même pH autour de 7,4 - 7,5 pour dissocier les effets du pH de la nature des ions en solution dans la réaction. Tous les tests ont conduit à une diminution drastique du RRC. La chute de ce dernier en solution NaCl montre que les ions chlorures défavorisent la réaction. L'hypothèse est que le chlore entre en compétition avec l'iode ou l'astate dans la réaction d'halogénéation. Ceci peut également en partie expliquer le très faible RRC obtenu en PBS (21 et 31 % pour la radioiodation et l'astatation respectivement) qui contient également des ions chlorures (139,7 mM). Mais le fait que le RRC obtenu en PBS soit inférieur à celui observé en solution NaCl peut être expliqué également par la présence de phosphates (11,76 mM) qui sont connus pour causer la précipitation du cuivre sous certaines conditions. Dans notre cas, aucune précipitation n'a été observée. Cependant, des interactions entre les ions phosphate et le cuivre altèrent probablement la réaction. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le tampon borate, qui a donné des RRCs de 55 % en radioiodation et 90 % pour le radiomarquage à l'astate. Ce dernier a donc été utilisé pour les tests suivants.

Tableau 22. Influence du tampon sur la ^{125}I -radioiodation et l' ^{211}At -astatation de l'acide 4-chlorobenzène boronique **6**. RRCs déterminés par l'analyse radio-HPLC du produit brut^a.

Solvant	RRC (%) ^a	
	^{125}I	^{211}At
NaCl/DMF (85/15)	38 ± 2,5	78 ± 13
PBS/DMF (85/15)	21 ± 2,1	31 ± 7,2
Tampon acétate de sodium 0,1 M pH 7,5 / DMF (85/15)	40 ± 4,4	84 ± 7,9
Tampon borate de sodium 0,5 M pH 7,5 / DMF (85 /15)	55 ± 3,2	90 ± 3,5
Tampon Tris 0,5 M pH 7,5 /DMF (85/15)	35 ± 7,9	47 ± 9,2

Conditions standard : **6** (0,25 mM), $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$ (10 mM), 1,10-phénantroline (10 mM), $^{125}\text{I}]\text{NaI}$ ou $^{211}\text{At}]\text{NaAt}$ (1-5 MBq), 30 min, 100 μL , 25 °C, $n = 3$.

L'étape d'optimisation de la concentration des différents constituants du mélange a alors été initiée, à commencer par celles du catalyseur et du ligand pour le radiomarquage à l'iode-125 (tableau 23) et à l'astate-211 (tableau 24). Il apparaît que des meilleurs RRCs sont obtenus lorsque ces deux réactifs sont introduits en proportions équimolaires, ce qui permet de diminuer considérablement leur concentration, jusqu'à 625 μM pour la radioiodation et 39,1 μM pour l'astatation. On note que le RRC augmente lorsque la concentration passe de 10 mM à 2,5 mM pour la radioiodation. Il est à noter que ces derniers tests ont été réalisés selon une autre procédure dans laquelle le solvant de radiomarquage est le tampon borate/DMF 90/10 alors que ce ratio était à 85/15 dans les tests précédents. De plus, les solutions de réactifs ont été préparées dans un mélange tampon borate/DMF 90/10 alors que pour les tests effectués avant, les réactifs étaient en DMF purs.

Tableau 23. Influence de la concentration en catalyseur et en ligand sur la ^{125}I -radioiodation de l'acide 4-chlorobenzène boronique **6**. RRCs (%) déterminés par l'analyse radio-HPLC du produit brut.

C_{Ligand}	10 mM	2,5 mM	1,25 mM	625 μM	312,5 μM	156,25 μM
$\text{C}_{\text{Catalyseur}}$						
10 mM	55 ± 3,2 ^a	-	-	-	-	-
2,5 mM	-	87	85 ± 2,8 ^b	59 ± 13 ^a	-	-
1,25 mM	-	82	85	78 ± 3,5 ^b	-	-
625 μM	-	12	-	83	75	34
312,5 μM	-	-	-	-	71 ± 9,7 ^a	51 ± 5,7 ^b
156,25 μM	-	-	-	-	31 ± 5,7 ^b	49

Conditions standard : **6** (0,25 mM), $^{125}\text{I}]\text{NaI}$ (1-5 MBq), 30 min, 100 μL , 25 °C, tampon borate 0,1 M pH 7,5/DMF 90/10, ^atampon borate 0,1 M pH 7,5/DMF 85/15, $n = 3$, ^b $n = 2$.

Tableau 24. Influence de la concentration en catalyseur et en ligand sur l'²¹¹At-astatation de l'acide 4-chlorobenzène boronique **6**. RRCs (%) déterminés par l'analyse radio-HPLC du produit brut.

C _{Ligand}	10 mM	2,5 mM	1,25 mM	625 μM	312,5 μM	156,3 μM	78,13 μM	39,1 μM	19,5 μM
C _{Catalyseur}									
10 mM	90 ± 3,5 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5 mM	-	90 ± 3,5 ^b	-	-	-	-	-	-	-
1,25 mM	-	89	91	85	77	87 ± 5,7 ^b	47	-	-
625 μM	-	12	-	-	-	-	-	-	-
312,5 μM	-	-	-	-	>99	-	-	-	-
156,25 μM	-	-	-	-	-	>99	-	-	-
78,13 μM	-	-	-	-	-	-	98 ± 2,8 ^b	-	-
39,1 μM	-	-	-	-	-	-	-	93 ± 6,5 ^b	92
19,5 μM	-	-	-	-	-	-	-	86	62 ± 34 ^b

Conditions standard : **6** (0,25 mM), [²¹¹At]NaAt (1-5 MBq), 30 min, 100 μL, 25 °C, tampon borate 0,1 M pH 7,5/DMF 90/10, ^atampon borate 0,1 M pH 7,5/DMF 85/15, n = 3, ^bn = 2

La concentration en précurseur a ensuite été testée pour savoir s'il était possible de la réduire, ce qui correspondrait à un radiomarquage sur un anticorps moins concentré, ou comportant moins de modification (tableau 25). Cependant, le RRC commence à diminuer dès que cette concentration est divisée par deux. Cependant cela n'est pas un problème car 250 μM est parfaitement compatible pour un radiomarquage de protéines pré-modifiées par des acides boroniques.

Tableau 25. Influence de la concentration en précurseur sur la ¹²⁵I-radioiodation et l'²¹¹At-astatation de l'acide 4-chlorobenzène boronique **6**. ^aRRCs déterminés par l'analyse radio-HPLC du produit brut.

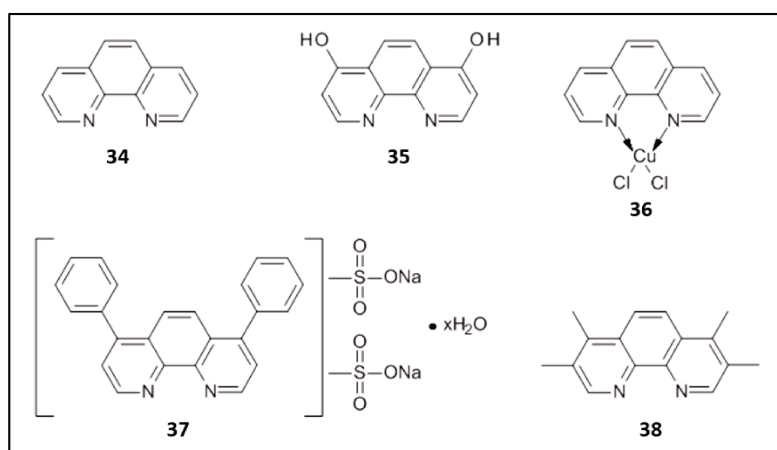
C _{Précurseur 6} (μM)	RRCs ^a (%)	
	¹²⁵ I	²¹¹ At
250	87	90 ± 3,5 ^b
125	75	82
62,5	-	81
25	-	0

Conditions standard : Cu(OTf)₂pyr₄ (2,5 mM), 1,10-phénantroline (2,5 mM), [¹²⁵I]NaI ou [²¹¹At]NaAt (1-5 MBq), 30 min, 100 μL, 25 °C, tampon borate 0,1 M pH 7,5/DMF 90/10, ^bn = 2.

Enfin, d'autres phénantrolines ont été testées afin d'essayer d'améliorer encore la réaction (tableau 26). La première est la 4,7-dihydroxy-1,10-phénantroline **35**. La dichloro(1,10-phénantroline) de cuivre II **36** a également été choisie car elle est déjà chélatée à du cuivre, ce qui pourrait peut-être permettre de s'affranchir du Cu(OTf)₂pyr₄. L'hydrate de sel disodique de l'acide bathophénantrolinedisulfonique **37** a notamment été évalué en raison de sa solubilité en milieu aqueux. La 3,4,7,8-tétraméthyl-1,10-phénantroline **38** étant le ligand utilisé dans la publication reportant le radiomarquage à l'astate des esters boroniques, elle a également été ajoutée aux tests²¹⁰. Afin de savoir si l'une d'entre elles était supérieure à la 1,10-phénantroline utilisée jusqu'à présent, des conditions non optimales en termes de concentration en catalyseur et ligand ont été choisis. Il

ressort de ces tests qu'aucun des ligands testés n'a conduit à de bons RRCs de radioiodation tandis que tous sauf la 3,4,7,8-tétraméthyl-1,10-phénantroline **38** a conduit à des RRCs d'astatation similaires à la 1,10-phénantroline **34**. Il est à noter que les ligands **35** et **38** n'étaient pas solubles dans les conditions utilisées, ce qui peut expliquer les mauvais RRCs obtenus. On remarque que l'utilisation du ligand **36** sans catalyseur conduit à une légère diminution du RRC avec les deux radionucléides, ce qui indique que le catalyseur CuCl_2 doit être moins efficace que $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$. La 1,10-phénantroline **34** a donc été conservée pour la suite de l'étude.

Tableau 26. Influence du ligand sur la ^{125}I -radioiodation et l' ^{211}At -astatination de l'acide 4-chlorobenzène boronique **6**. RRCs déterminés par l'analyse radio-HPLC du produit brut.



Ligand	RRCs (%)	
	$^{125}\text{I}^a$	$^{211}\text{At}^b$
34	$85 \pm 2,8^c$	$87 \pm 5,7^c$
35	1,3	85
36	48	87
36 ^d	34	72
37	13	83
38	8,8	36

Conditions standard : **6** (0,25 mM), 30 min, 100 μL , 25 $^\circ\text{C}$, tampon borate 0,1 M pH 7,5/DMF 90/10, $n = 1$, $^c n = 2$, $^a \text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$ (2,5 mM), ligand (2,5 mM), $^{125}\text{I}^a \text{NaI}$, $^b \text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$ (1,25 mM), ligand (156,3 μM), $^{211}\text{At}^b \text{NaAt}$ (1-5 MBq), $^d \text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$ 0 mM

A l'issu de cette partie, le radiomarquage du composé modèle à l'iode-125 et à l'astate-211 a pu être réalisé en milieu aqueux grâce à l'ajout du ligand 1,10-phénantroline **34**. Les conditions optimales ont été déterminées, que ce soit en terme de concentration en précurseur, catalyseur ou ligand, ou en terme de solvant, où le mélange DMF/tampon borate pH 7,5 s'est révélé être le plus efficace. La réaction s'avère fonctionner bien plus facilement avec l'astate-211 par rapport à l'iode-125. La concentration en catalyseur et en ligand peut notamment être largement plus abaissée dans le cas de l'astate.

Les conditions optimales du radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 ayant été déterminées sur le composé modèle, les premiers tests sur un anticorps pré-modifié par des acides boroniques, à commencer par une IgG anti-CD22, ont débutés. Cependant, la précipitation de ce dernier a rapidement été observée à l'ajout du catalyseur. Cette précipitation a donc été attribuée à la présence de cuivre II en solution. En effet, les sels de cuivres, et plus généralement les ions métalliques multivalents, sont connus pour interagir avec les protéines, conduisant à leur précipitation ou à leur dégradation^{297,298}. Diminuer la concentration en catalyseur afin de limiter ce phénomène aurait pu être une option. Cependant cette précipitation a été observée même avec une concentration en catalyseur et ligand de seulement 78,13 μ M. Il a alors été décidé d'investiguer l'influence de la nature du tampon utilisé lors du radiomarquage sur la précipitation de l'anti-CD22 (tableau 27). Les tampons ont été testés avec différentes concentrations en sels car plus ces derniers sont concentrés, moins les protéines sont susceptibles de précipiter. Pour cela, l'anticorps non modifié a été conditionné dans le tampon à tester, puis le catalyseur ajouté. Sur les tampons testés, seuls les tampons citrate, phosphate, tricine (*N*-[tris(hydroxyméthyl)méthyl]glycine) et Tris (tris-hydroxyméthyl)aminométhane) n'ont pas conduits à la précipitation de l'anticorps. Les ions phosphates sont néanmoins connus pour faire précipiter le cuivre, ce qui a d'ailleurs pu être observé. Cette précipitation a donc empêché le cuivre d'interagir avec la protéine et donc de la faire précipiter. Le tampon tricine peut former des complexes avec les métaux de transition, notamment le cuivre II,^{299,300} ce qui empêche également le cuivre II de se fixer aux protéines. Il en va de même pour le tampon Tris, qui est capable d'agir comme un agent chélatant efficace pour Cu^{2+} *via* ses trois groupements hydroxyles et son amine primaire à des $\text{pH} \geq 7$ ³⁰¹. Ces tampons ont par la suite été testés pour la radioiodation du composé modèle et seul le tampon Tris a permis d'obtenir un radiomarquage. Comme la concentration n'a pas d'impact sur le RRC obtenu, celle à 0,5 M a été conservée afin de limiter les risques de précipitation.

Tableau 27. Influence de la nature du tampon sur la précipitation de l'anti-CD22 et sur le RRC de la ¹²⁵I-radioiodation de **6**.

Tampon ^a	Concentration du tampon	Précipitation de l'anti-CD22 ^b	RRC (%) avec 6 ^c
Borate de sodium	0,1 M	Oui	-
	0,5 M	Oui	55 ± 3,2 ^f
	0,7 M	Oui	-
Acétate de sodium	0,5 M	Oui	-
Citrate de sodium	0,5 M	Non	0 ^d
Phosphate de sodium	0,3 M	Non	0 ^{d,e}
	0,5 M	Non	0 ^{d,e}
HEPES	0,25 M	Oui	-
	0,5 M	Oui	-
	1 M	Oui	-
MES	1 M	Oui	-
Gly-Gly	0,5 M	Oui	0
MOPS	0,5 M	Oui	-
	0,9 M	Oui	-
Tricine	0,5 M	Non	0
Tris	0,25 M	Non	49
	0,5 M	Non	35 ± 7,9 ^f
	1 M	Non	-
NaCl (0.9%)	-	Oui	38 ± 2,5 ^f

^apH = 7,5, HEPES = 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonate de sodium, MES = 2-(N-morpholino)éthanesulfonate de sodium, Gly-Gly = glycylglycine, MOPS = 3-(N-morpholino)propanesulfonate de sodium. ^banti-CD22 (240 µg) incubés 5 min avec Cu(OTf)₂Pyr₄ (10 mM) en tampon/DMF (9:1). ^cConditions standard : **6** (250 µM), catalyseur (10 mM), ligand (10 mM), [¹²⁵I]NaI (1-5 MBq), 30 min, 25 °C en tampon/DMF (92,5:7,5). ^dcatalyseur (625 µM), ligand (625 µM). ^ePrécipitation du catalyseur observée. ^fn = 3.

Les RRCs obtenu en tampon Tris sont tout de même loin d'être optimaux pour le développement d'une méthode de radiomarquage efficace. Afin d'améliorer la réaction, une étude de l'influence du pH sur le radiomarquage du composé modèle **6** a alors été réalisée. On observe ainsi que des RRCs quantitatifs peuvent être obtenus avec les deux radionucléides lorsque le pH est inférieur à 7,5 jusqu'à pH = 2, pH en dessous duquel le catalyseur précipite (figure 36). Afin de préserver un pH qui reste doux pour l'anticorps, le pH 6 a été sélectionné pour poursuivre les investigations.

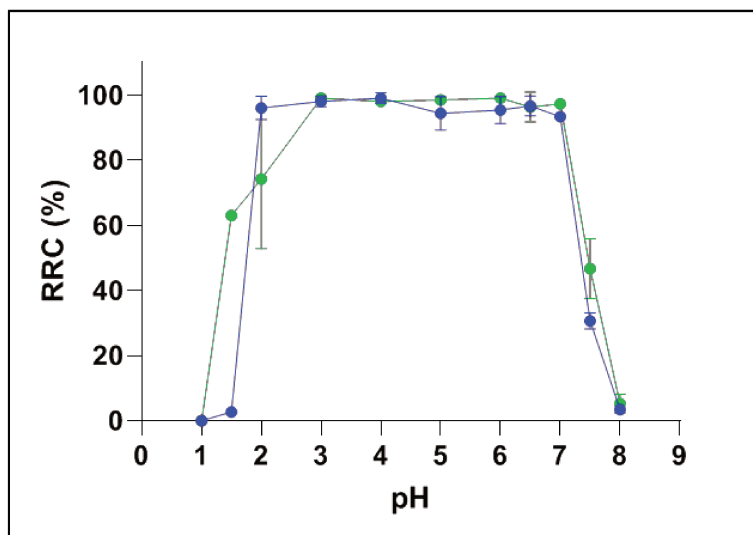


Figure 36. Influence du pH sur la ^{125}I -radioiodation (●) et l' ^{211}At -astatation (●) de l'acide 4-chlorobenzène boronique **6**.

Conditions standard : **6** (0,25 mM), $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$ (10 mM), 1,10-phénantroline (10 mM), $^{125}\text{I}]\text{NaI}$ ou $^{211}\text{At}]\text{NaAt}$ (1-5 MBq), 30 min, 100 μL , 25 °C en tampon Tris 0,5 M/DMF (92,5:7,5), $n = 2$ ou 3. RRCs déterminés par l'analyse radio-HPLC du produit brut.

Les conditions optimales de radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 du composé modèle à présent déterminées, la transposition de cette chimie aux anticorps pré-modifiés par des acides boroniques a été investiguée.

II.2. Radiomarquage d'anticorps pré-modifiés par des acides boroniques

II.2.1. Modification des anticorps

La bioconjugaison des groupements acides boroniques sur les anticorps a été réalisée avec l'acide 3-(succinimidylxycarbonyl)phénylboronique **40** qui a été synthétisé afin de réaliser le couplage sur les lysines *via* une approche conventionnelle (schéma 28). Ce précurseur a été choisi car il conduit à la même protéine radiomarquée que dans l'approche de radiomarquage classique en deux étapes basée sur la conjugaison du SIB ou du SAB sur les groupements lysines, ce qui permettra de comparer directement les deux méthodes. **40** a été obtenu par substitution nucléophile de la *N*-hydroxysuccinimide sur l'acide 3-(dihydroxylboryl)benzoïque **39** en présence de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) et de triéthylamine avec un rendement de 45 %. Le couplage aux protéines se fait en tampon borate à pH 8,6 afin d'activer les lysines des protéines. Ces dernières, originellement stockés en PBS, sont conditionnées dans ce tampon par ultracentrifugation. Les anticorps sont amenés à une concentration de 5 mg/mL puis **40** en solution dans le DMSO est ajouté à hauteur de 10, 25 ou 50 équivalents. Afin d'éviter une dégradation de la protéine, chaque couplage a été réalisé avec un ratio tampon borate/DMSO toujours supérieur à 93/7. Une fois le couplage achevé, les protéines sont purifiées par ultracentrifugation dans le tampon qui servira au

radiomarquage, à savoir le tampon Tris 0,5 M à pH 6 déterminé comme optimal dans le travail préliminaire.

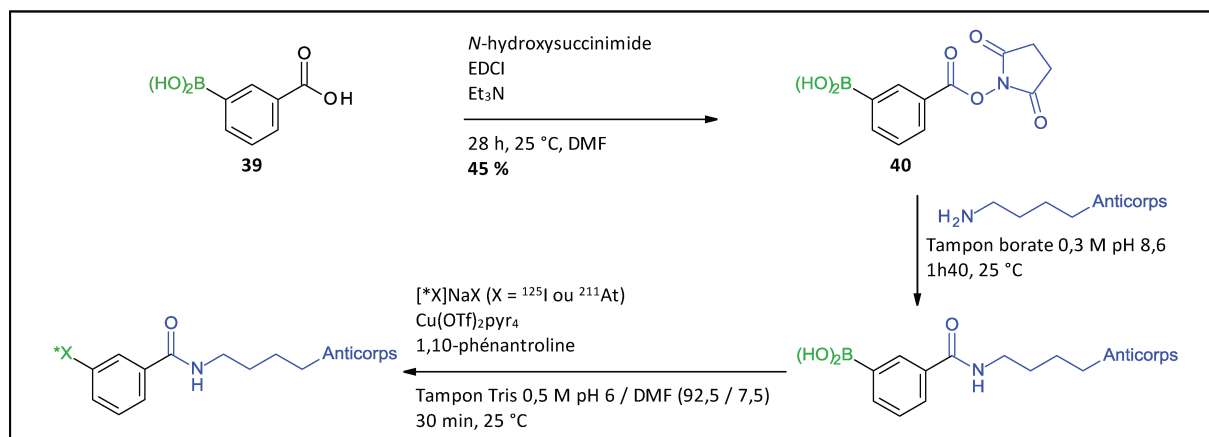


Schéma 28. Stratégie de radiomarquage d'anticorps.

Le nombre d'acides arylboroniques fixés par anticorps a ensuite été déterminé par analyse en spectrométrie de masse en mode d'ionisation par électrospray, une technique qui a déjà été utilisée dans le laboratoire³⁰². Une déconvolution du spectre de masse obtenu a été réalisée, ce qui permet d'obtenir des pics correspondant aux différents poids moléculaires possibles, le plus probable étant représenté par le pic le plus intense. Deux méthodes ont été utilisées. La première consistait à analyser l'anticorps entier. Un exemple est illustré en figure 37. La différence de masse entre le pic le plus intense observé pour l'anticorps modifié et le non modifié divisée par la masse molaire du greffon (148 g/mol) a permis de déterminer le nombre d'acides arylboroniques greffés par anticorps. Dans l'exemple illustré sur la figure 37 le ratio déterminé était de 5,7 acides boroniques/anticorps.

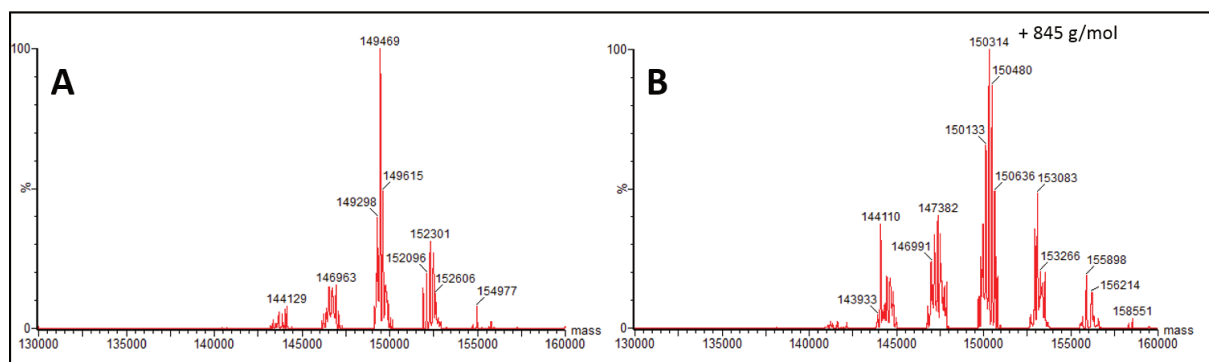


Figure 37. Spectres de masses déconvolués de l'anti-CD22 (A) et de l'anti-CD22-AB (B) modifié avec 10 équivalents de 40 lors du couplage.

La deuxième méthode consistait à réduire l'anticorps avec du tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) permettant de réduire les ponts disulfures de l'anticorps, dissociant ainsi les chaînes lourdes et les chaînes légères. L'exemple du spectre de masse déconvolué obtenu à partir de cette méthode pour le même lot d'anticorps que celui de l'exemple précédent est illustré en figure 38. Cette méthode est

plus précise que l'analyse de la protéine entière. De plus, elle permet d'identifier sur quels fragments de l'anticorps se trouvent les greffons. Dans l'exemple de la figure 38, une modification de + 126 g/mol a été faite sur les chaînes légères et + 124 g/mol sur les chaînes lourdes. Un anticorps ayant deux chaînes lourdes et deux chaînes légères, cela a amené à une modification de + 500 g/mol, ce qui donne environ 3,4 acides boroniques/anticorps répartis équitablement entre les chaînes lourdes et les chaînes légères.

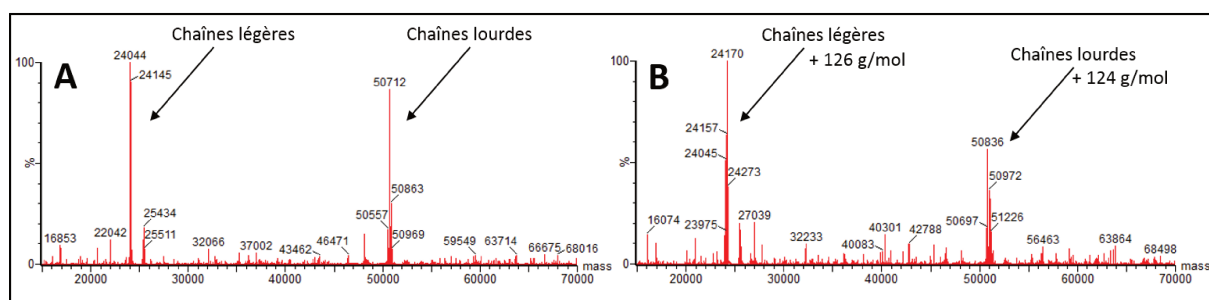


Figure 38. Spectres de masses déconvolués de l'anti-CD22 (A) et de l'anti-CD22-AB (B) modifié avec 10 équivalents de **40** lors du couplage, après réduction par le TCEP.

On obtient dans ce cas une différence assez prononcée de la valeur d'acides boroniques par anticorps suivant la méthode utilisée. La déconvolution est une méthode mathématique qui va calculer les pics de masse moléculaire les plus probables. Des résultats plus précis sont obtenus avec des molécules de petites tailles, dans notre cas avec des fragments d'anticorps plutôt que sur l'anticorps entier. La mesure réalisée par la deuxième méthode est donc plus fiable.

II.2.2. Radiomarquage de l'anticorps anti-CD22

L'antigène CD22 est une protéine transmembranaire exprimé sur les cellules B et est responsable de leur régulation ou de leur activation³⁰³. Cet antigène est surexprimé sur les cellules B malignes et est utilisé comme cible pour le traitement des lymphomes non hodgkiniens. L'anti-CD22 utilisé, également appelé epratuzumab, a été sélectionné en raison de sa grande disponibilité au laboratoire, ce qui a permis de multiplier les tests de mise au point. Cependant le laboratoire ne possédant pas les cellules cibles de cet anticorps, il n'a pas été possible de réaliser des tests biologiques permettant de vérifier si les propriétés de reconnaissance de l'anticorps sont préservées avec notre nouvelle méthode. Les résultats présentés ci-dessous ne permettent donc qu'une validation de la méthode d'un point de vue chimique.

Le couplage de l'anti-CD22 a été réalisé avec 10, 25 et 50 équivalents de **40**, formant l'anti-CD22-AB, afin de déterminer le nombre minimal d'équivalents à ajouter pendant le couplage pour avoir un radiomarquage optimal. Comme expliqué plus haut, ajouter un trop grand nombre de greffons pourrait certes permettre de meilleurs RRCs, mais risquerait de dénaturer l'anticorps, notamment s'ils

sont couplés sur les zones de reconnaissances de ce dernier, le rendant donc inapte à reconnaître sa cible.

Les conditions optimales déterminées sur le composé modèle ont servi de base au radiomarquage de l'anticorps modifié anti-CD22-AB en repartant de concentrations assez importantes en catalyseur et en ligand (10 mM) dans un premier temps afin de favoriser la réaction. La concentration en anticorps pour les premiers tests de radiomarquage a été fixée à 4,8 mg/mL, ce qui correspond à celle utilisée lors du radiomarquage en deux étapes *via* la méthode SIB ou SAB. Les différents lots d'anticorps modifiés par 50, 25 et 10 équivalents ont été testés afin de déterminer le minimum nécessaire pour obtenir un radiomarquage optimal. Un quatrième test a été réalisé en divisant la concentration de l'anti-CD22-AB modifié avec 10 équivalents par deux, afin de mimer un anticorps modifié par 5 équivalents. L'anticorps non modifié a également été testé afin de savoir si l'iode-125 ou l'astate-211 pouvaient réagir sur d'autres sites que les acides boroniques, ce qui résulterait en une liaison faible qui serait instable *in vivo*. Ce type de liaison non spécifique n'est donc pas souhaitable car après injection dans l'organisme du radiopharmaceutique, l'halogène libre ira s'accumuler dans ses organes cibles, notamment la thyroïde, l'estomac et les reins, causant alors une radiotoxicité non négligeable.

Les RRCs ont été déterminés par radiolTLC-SG (Instant Thin Layer Chromatography-Silica Gel) du produit brut. Cette technique consiste à mesurer l'activité présente sur la bande ITLC-SG grâce à un scanner Cyclone phosphorimager. Dans notre cas, le méthanol est choisi comme éluant afin de faire précipiter l'anticorps au point de dépôt, tandis que toutes les autres espèces migrent en haut de l'ITLC. Le RRC a pu être déterminé en faisant le rapport entre l'activité détectée au dépôt et l'activité totale sur la bande ITLC. Chaque ITLC-SG est réalisée en duplicata et le RRC moyen est calculé (figure 39).

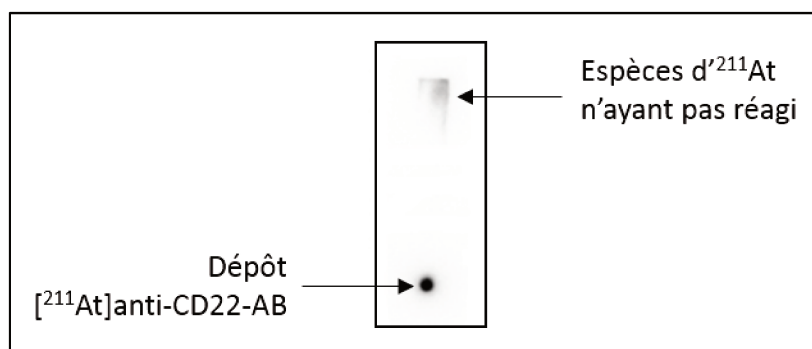


Figure 39. Exemple d'ITLC-SG de radiomarquage à l'astate de l'anti-CD22-AB.

Des RRCs quasi-quantitatifs sont obtenus pour ceux avec 50, 25 et 10 équivalents (tableau 28). Passer à 5 équivalents entraîne une diminution jusqu'à 58 % et 49 % pour la radioiodation et l'astatation, respectivement. Cependant, les anticorps modifiés avec 50 et 25 équivalents précipitent

à l'ajout du catalyseur. Dans le mécanisme, le catalyseur se lie à l'aryle par transmétallation avec l'acide boronique. On peut émettre l'hypothèse qu'un trop grand nombre d'acides arylboroniques sur l'anticorps provoque le rapprochement du catalyseur en quantité suffisante pour causer sa précipitation. Comme attendu, aucun marquage non spécifique significatif n'est observé pour l'iode-125. A l'inverse, un RRC important est obtenu lors du radiomarquage de l'anticorps non modifié à l'astate-211 (22 %). Le phénomène de couplage de l'astate sur les protéines est déjà connu et sera discuté plus en profondeur dans la partie II.2.3.

Tableau 28. Influence du nombre d'équivalents de **40** ajoutés lors du couplage avec l'anti-CD22 sur la ^{125}I -radioiodation, l' ^{211}At -astatation et la précipitation de l'anti-CD22-AB sur l'étape de radiomarquage^a.

Equivalents de 40 lors du couplage	RCY (%) ^b		Précipitation de l'anticorps
	^{125}I	^{211}At	
0	1,3	22	Non
5	58	49	Non
10	93	94	Non
25	94	95	Oui
50	98	98	Oui

^aConditions standard : anti-CD22-AB (4,8 mg/mL), $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{Pyr}_4$ (10 mM), 1,10-phénantroline (10 mM), $^{125}\text{I}]\text{NaI}$ ou $^{211}\text{At}]\text{NaAt}$ (1-5 MBq), 30 min, 25 °C en tampon Tris 0,5 M pH 6/DMF (92,5:7,5), ^b RRCs déterminés sur l'analyse ITLC-SG du produit brut.

10 équivalents de **40** utilisés lors de l'étape de couplage a donc été considéré comme les conditions les plus adaptées pour le radiomarquage d'anticorps. L'analyse par spectrométrie de masse des anticorps entiers montre que ce nombre d'équivalents conduit à $4,6 \pm 1,1$ ($n = 2$) acides boroniques greffés par anticorps. Cependant, l'analyse des anticorps réduits indique une valeur inférieure, $3,5 \pm 0,1$ ($n = 2$), une valeur sans doute plus précise et plus reproductible d'un anticorps à l'autre. Dans tous les cas, ce nombre de modification suffit donc à obtenir un radiomarquage optimal, tout en étant suffisamment faible pour espérer ne pas altérer les propriétés pharmacocinétiques de l'anticorps.

Afin de limiter le risque d'altérer la protéine ou la présence de cuivre résiduel dans le radiopharmaceutique final, la suite de l'optimisation a visé à réduire la concentration en catalyseur pendant l'étape de radiomarquage, tout en gardant une proportion équimolaire de ligand (tableau 29). Les RRCs obtenus en radioiodation diminuent lorsque la concentration en catalyseur passe de 10 mM à 2,5 mM (de 93 à 58 %) tandis qu'ils sont restés quasi-quantitatifs, même à une concentration de 1,25 mM pour le radiomarquage à l'astate. Le marquage non-spécifique a également été évalué en effectuant le radiomarquage sur l'anticorps non modifié. Comme attendu, le marquage non-spécifique est resté négligeable pour la radioiodation (< 1,4 %). Pour l'astatation, on remarque que le marquage

non spécifique est réduit lorsque la concentration en catalyseur et ligand diminue (de 22 % pour 10 mM à 7,8 % pour 1,25 mM).

Tableau 29. Influence de la concentration en catalyseur et en ligand sur la ^{125}I -radioiodation et l' ^{211}At -astatation de l'anti-CD22-AB et de l'anti-CD22 (marquage non spécifique)^a.

Concentration en Catalyseur et Ligand (mM)	RCC (%) ^b			
	^{125}I		^{211}At	
	Anti-CD22-AB	Anti-CD22	Anti-CD22-AB	Anti-CD22
10	93	1,3	95	22
5	80	1,3	93	18
2,5	58	1,4	90	13
1,25	-	-	95	7,8

^aConditions standard : mAb (4,8 mg/mL), $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{Pyr}_4$, 1,10-phénantroline, $^{125}\text{I}]/\text{NaI}$ ou $^{211}\text{At}]/\text{NaAt}$ (1-5 MBq), 30 min, 25 °C en tampon Tris 0,5 M pH 6/DMF (92,5:7,5), ^b RCCs déterminés par l'analyse ITLC-SG du produit brut.

Afin de déterminer si du couplage non spécifique de l'astate-211 se réalisait lors du radiomarquage du 9E7.4-AB, un test de stabilité de l' ^{211}At]anti-CD22-AB et l' ^{211}At]anti-CD22 conservés à 37 °C en PBS et en sérum humain sur 7 h a également été réalisé (figure 40). Une excellente stabilité a été constatée dans le cas de l' ^{211}At]anti-CD22-AB qui passe d'une pureté radiochimique > 99 % à 95 % et 97 % au bout de 7 h en PBS et en sérum humain, respectivement. Quant à l' ^{211}At]anti-CD22 obtenu par un marquage non-spécifique, sa pureté radiochimique après purification était de seulement 72 %. Cette dernière est passée à 36 % et 60 % après 7 h en PBS et en sérum humain respectivement, montrant la faiblesse de la liaison formée. Cette expérience a démontré que très peu de marquage non spécifique se produit de façon compétitive à l'astatodéboronation espérée et que cette faible proportion est probablement éliminée lors de la purification.

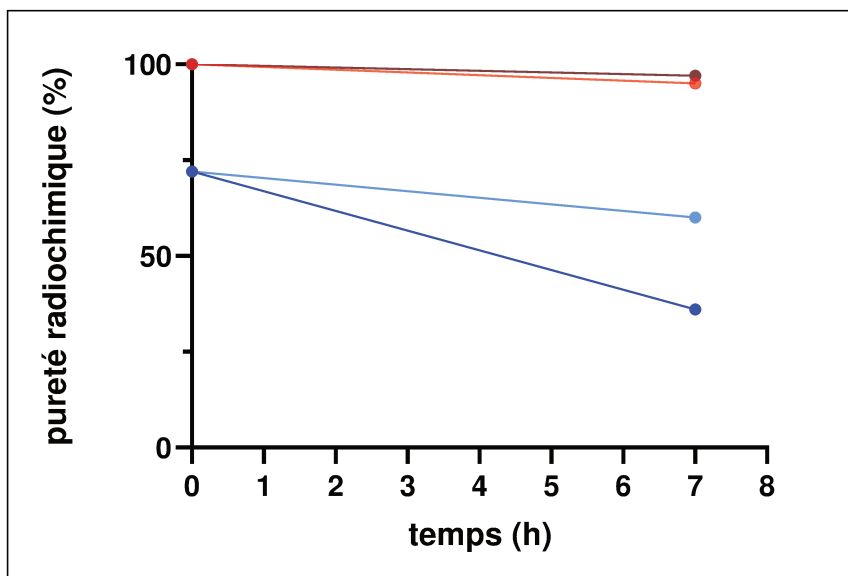


Figure 40. Pureté radiochimique du [²¹¹At]anti-CD22-AB conservé à 37 °C en PBS (●) et en sérum humain (○) et du [²¹¹At]anti-CD22 conservé à 37 °C en PBS (●) et en sérum humain (○).

Les tests d'optimisation ont jusqu'à présent été réalisés sur faible activité (entre 1 et 5 MBq). Cependant il a rapidement été constaté que les résultats commençaient à être difficilement reproductibles lorsque des activités plus élevées étaient employées (de l'ordre de 20-25 MBq) avec des RRCS allant de 21 à 90 % dans les conditions optimisées établies. Si une hypothèse possible serait que l'augmentation de l'activité s'accompagne d'un effet de radiolyse plus marqué, il est peu probable que les effets de la radiolyse produits pendant la réaction s'en ressentent étant donné que 25 MBq représentent une activité relativement faible. En revanche, la source d'astate-211 reçu au laboratoire est de plusieurs centaines de mégabecquerels. La radiolyse du chloroforme dans lequel le radionucléide est dissous peut s'effectuer entre le moment où l'astate-211 est solubilisé en chloroforme au cyclotron Arronax jusqu'à la paillasse (soit 1h30 à 2h00 en moyenne), générant des impuretés (peroxydes ou composés chlorés)^{262,263,286}. Lorsqu'une plus grande activité de cette source est prélevée pour le radiomarquage, cela s'accompagne également d'une plus grande concentration d'impuretés qui peuvent perturber la réaction ou l'étape de réduction de l'astate, ce qui peut éventuellement expliquer ces problèmes de reproductibilité.

Une étude de la réduction de l'astate a alors été menée sur des activités de l'ordre de 20-25 MBq afin de mieux maîtriser cette étape. Initialement la méthode de réduction consistait à ajouter de l'acétonitrile et la solution de sulfite de sodium à 1 mg/mL sur l'astate à sec. L'astate réduit ainsi obtenu est prélevé et est introduit dans le milieu de marquage contenant l'anticorps, le catalyseur et le ligand. La première étape a été de voir l'influence de la concentration en sulfite sur la réduction de l'astate, puis sur le radiomarquage de l'anti-CD22 (tableau 30). De façon surprenante, abaisser la concentration en réducteur permet d'obtenir de meilleurs RRCS, jusqu'à $93 \pm 2,5$ % avec 0,125 mg/mL.

Tableau 30. Influence de la réduction de l'astate sur l' ^{211}At -astatation de l'anti-CD22.^a RRCs déterminés par l'analyse ITLC-SG du produit brut.

Concentration en réducteur (mg/mL)	RRC (%)
1	38
0,5	79
0,25	87
0,125	87
0,125 ^b	93 ± 2,5

^aConditions standard : Réduction de l'astate : ACN (10 μL), Na_2SO_3 (10 μL) ; Radiomarquage : mAb (4,8 mg/mL), $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{Pyr}_4$, 1,10-phénantroline, $^{211}\text{At}[\text{NaAt}]$ (20 - 25 MBq), 30 min, 25 °C en tampon Tris 0,5 M pH 6/DMF (92,5:7,5) ; ^bréduction sans acétonitrile.

La solution de sulfite de sodium est instable en milieu aqueux et l'ion sulfite peut notamment s'oxyder en sulfate. Une première hypothèse est que les ions sulfates formés perturbent la réaction, et que réduire la concentration en réducteur permet de limiter la formation de ces ions. Une autre explication serait que la présence en trop grande quantité des ions sulfite soit également néfaste pour la réaction. Le sulfite est notamment sujet au phénomène d'autoxydation (oxydation en présence d'oxygène) et peut former l'espèce $\text{SO}_4^{\bullet-}$. Cette réaction peut être activée par la présence de métal, dont le cuivre(II) qui est un catalyseur fort sur une large gamme de pH (schéma 29)³⁰⁴. Dans ce mécanisme, l'ion Cu^{2+} forme un complexe avec SO_3^{2-} , puis va être réduit en Cu(I). Cette interaction pourrait se réaliser partiellement dans notre cas entre le réducteur et le catalyseur, ce qui abaisserait les RRC.

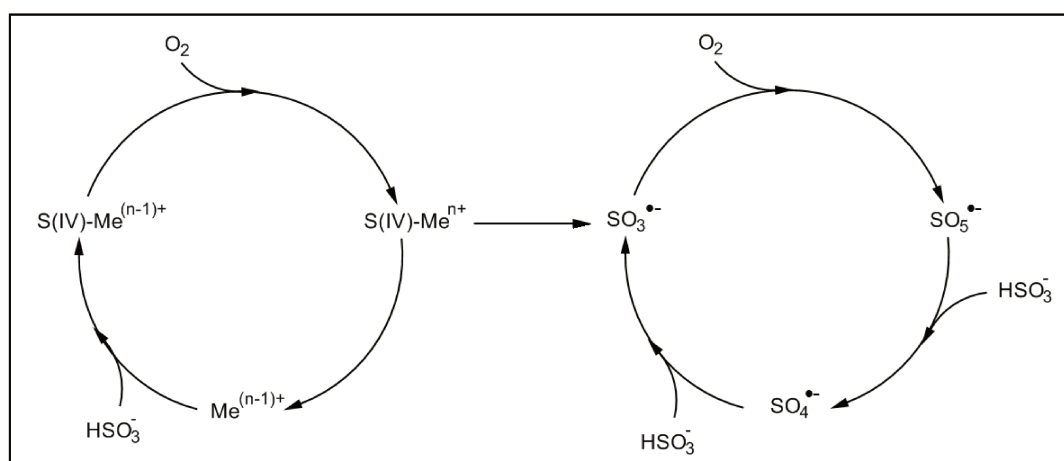


Schéma 29. Réaction d'autoxydation du sulfate métallo-catalysée en milieu acide.

Abaisser la concentration permettrait donc de limiter cette réaction secondaire, ce qui expliquerait les meilleurs RRCs obtenus à plus basse concentration de réducteur. La solution à 0,125 mg/mL a donc été conservée pour la suite de l'étude. Le deuxième point à vérifier était l'influence de la présence de l'acétonitrile dans la réduction. Ce dernier est ajouté afin de faciliter la

solubilisation de l'astate. On observe qu'un meilleur RRC est obtenu en l'absence de ce dernier (87 vs 93 % de RRC pour une réduction avec et sans acétonitrile respectivement). Une explication possible serait que l'acétonitrile dissous également des formes d'astate qui ne se réduisent pas. Le retirer permettrait donc de ne prélever que les espèces réduites réactives de l'astate. De nouvelles conditions de réduction de l'astate ont donc pu être déterminées, avec une solution de sulfite de sodium à 0,125 mg/mL sans utilisation d'acétonitrile.

Une fois la réduction de l'astate mieux maîtrisée, la suite de l'optimisation de la réaction de radiomarquage a été menée, notamment en étudiant l'influence de la concentration en mAb, l'intérêt étant premièrement de savoir si le marquage non-spécifique de l'astate sur l'anticorps pouvait être réduit et deuxièmement d'augmenter l' A_s qui peut être obtenue avec cette nouvelle procédure de marquage. Jusqu'à présent, les tests utilisaient l'anticorps à une concentration de 4,8 mg/mL. Cette dernière a été choisie car il s'agit de la concentration minimale nécessaire à une radioiodation ou astatation efficace d'anticorps par la méthode en deux étapes. Le test de concentration a été effectué uniquement pour le radiomarquage à l'astate sur l'anti-CD22-AB et sur l'anti-CD22 (figure 41). Des RRCs optimaux sont obtenus jusqu'à 3,6 mg/mL pour le radiomarquage de l'anti-CD22-AB (> 90 %). En parallèle, les résultats obtenus avec l'anti-CD22 non modifié montrent que le radiomarquage non spécifique diminue légèrement avec la concentration. Ce nouveau procédé permet donc d'avoir potentiellement accès à de meilleures activités spécifiques par rapport à la méthode en deux étapes.

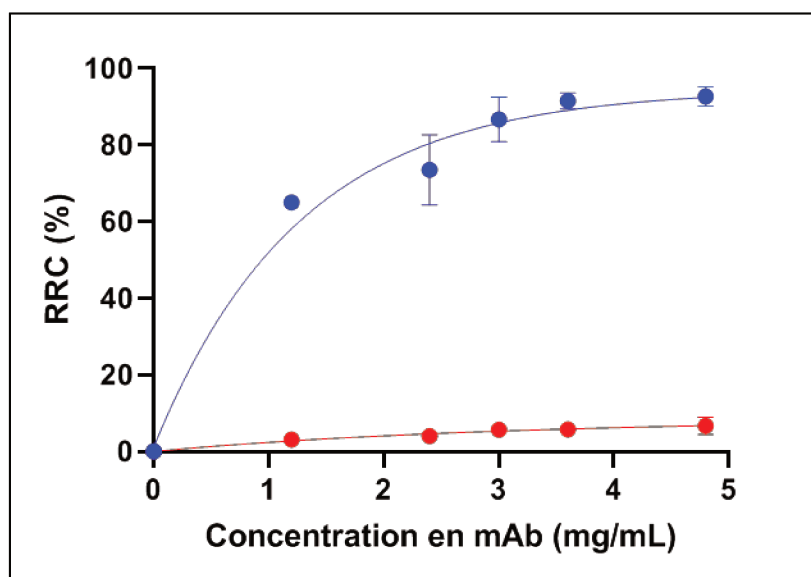


Figure 41. Influence de la concentration en anticorps sur le radiomarquage à l'astate-211 de l'anti-CD22-AB (●) et l'anti-CD22 (●).

Conditions standard : $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{Pyr}_4$ (2,5 mM), 1,10-phénantroline (2,5 mM), $^{211}\text{AtNaAt}$ (1-5 MBq), 30 min, 25 °C en tampon Tris 0,5 M pH 6/DMF (92,5:7,5), ^b RRCs déterminés par l'analyse ITLC-SG du produit brut.

La même étude aurait pu être réalisée pour le radiomarquage à l'iode. Cependant les travaux avec cet anticorps n'avaient pour but que de valider sur une protéine l'efficacité de la réaction mise au point sur le composé modèle. Il est probable que les conditions optimales varient d'un anticorps à un autre. Cet anticorps modèle ne pouvant pas servir à aller plus profondément dans l'étude du nouveau procédé, *via* des études biologiques, les expérimentations se sont poursuivies à partir d'un anticorps d'intérêt biologique pour l'équipe, l'anti-CD138 noté 9E7.4.

II.2.3. Radiomarquage de l'IgG 9E7.4

Le 9E7.4 est un anticorps murin qui a été produit au sein de l'équipe d'Oncologie Nucléaire par immunisation de rats. C'est une IgG_{2ak} qui cible l'antigène CD138 (nommé aussi Syndecan-1), surexprimé par les cellules de myélome multiple et qui participe à la prolifération tumorale. Cet anticorps a déjà montré d'excellentes propriétés dans des études de thérapie alpha ou bêta vectorisée et en imagerie immunoTEP du myélome multiple dans un modèle animal syngénique^{305–307}.

10 équivalents de **40** lors de la bioconjugaison de l'anti-CD22 s'étant avérés suffisants pour un RRC optimal, le même nombre a été utilisé pour celle du 9E7.4, formant ainsi le 9E7.4-AB. L'analyse par spectrométrie de masse de l'anticorps entier a montré que cela conduisait à $3,4 \pm 0,6$ acides boroniques par anticorps, une valeur qui semble suffisante pour faire des tests de radiomarquages tout en restant suffisamment faible pour préserver les propriétés pharmacocinétiques de l'anticorps. L'analyse de l'anticorps réduit par le TCEP a également été réalisée mais s'est avérée plus difficile à analyser dans le cas du 9E7.4 et pouvait parfois conduire à des résultats aberrants (comme 25 acides boroniques/anticorps, valeur impossible car seulement 10 équivalents ont été utilisés). Pour cette raison, la valeur donnée par l'analyse de l'anticorps entier a été privilégiée.

Les conditions optimales pour le radiomarquage de l'anti-CD22 et le 9E7.4 pouvant être potentiellement différentes, l'étude de l'optimisation de la réaction a été menée de la même façon sur ce nouvel anticorps, à commencer par l'investigation de l'influence de la concentration en catalyseur et en ligand (tableau 31). Les premiers tests de radiomarquages à 10 mM ont donné d'excellents résultats, avec des RRCs de $87 \pm 1 \%$ et $94 \pm 3 \%$ pour la ¹²⁵I-radioiodation et l'²¹¹At-astatation respectivement, de façon similaire à ce qui a été obtenu avec l'anti-CD22. La diminution de la concentration en catalyseur et en ligand entraîne une chute du RRC notable en radioiodation (de 87 % à 58 %) lorsque cette dernière passe de 10 mM à 1,25 mM. Concernant le radiomarquage à l'astate, les RRCs sont restés inchangés, même à la plus basse concentration testée. Le marquage non spécifique a également été évalué en réalisant le radiomarquage du 9E7.4 non modifié. Ce dernier est resté non significatif en radioiodation (<1,2 %), à l'image de ce qui a été obtenu avec l'anti-CD22, tandis qu'il apparaît considérablement plus élevé en astatation ($62 \pm 8 \%$ pour une concentration en

catalyseur et ligand de 10 mM). Cette valeur a été divisée par deux en passant à 5 mM, mais n'a pas pu être réduite davantage avec des concentrations plus basses. La radioiodation restant suffisamment élevée à 5 mM ($79 \pm 4 \%$), cette concentration a été choisie pour la suite de l'étude, tandis que 2,5 mM a été choisi pour le radiomarquage à l'astate, similairement aux conditions de marquage de l'anti-CD22.

Tableau 31. Influence de la concentration en catalyseur et en ligand sur la ^{125}I -radioiodation et l' ^{211}At -astatation du 9E7.4-AB et du 9E7.4^a.

Concentration en Catalyseur et Ligand (mM)	RCC (%)			
	^{125}I		^{211}At	
	9E7.4-AB	9E7.4	9E7.4-AB	9E7.4
10	87 ± 1	0,4	94 ± 3	62 ± 8
5	79 ± 4	1,2	93 ± 4	42 ± 5
2,5	73 ± 2	-	96 ± 1	32 ± 7
1,25	58 ± 8	0,3	93 ± 4	37 ± 12

^aConditions standard : mAb (4,8 mg/mL), $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{Pyr}_4$, 1,10-phénantroline, $^{125}\text{I}]\text{NaI}$ ou $^{211}\text{At}]\text{NaAt}$ (1-5 MBq), 30 min, 25 °C en tampon Tris 0,5 M pH 6/DMF (92,5:7,5), $n \geq 3$, RCCs déterminés par l'analyse ITLC-SG du produit brut.

L'influence de la concentration en anticorps sur la radioiodation et l'astatation du 9E7.4 a ensuite été évaluée, toujours dans l'optique de déterminer si l' A_s peut être améliorée (figure 42). Les premiers tests ont été réalisés avec une concentration de 4,8 mg/mL. Les RCCs en radioiodation restent optimaux ($80 \pm 9 \%$) lorsque la concentration en 9E7.4-AB est abaissée à 3,6 mg/mL, puis diminuent progressivement aux concentrations plus faibles. Dans le cas du radiomarquage à l'astate-211, la concentration en anticorps peut être réduite jusqu'à 1,8 mg/mL sans impacter de manière significative le RCC ($91 \pm 2 \%$ vs $96 \pm 1 \%$ à 4,8 mg/mL). Il est intéressant de noter que le radiomarquage non spécifique de l'astate sur le 9E7.4 diminue également avec la concentration en mAb de $32 \pm 7 \%$ à 4,8 mg/mL à $16 \pm 4 \%$ à 1,8 mg/mL ou même jusqu'à $6 \pm 1 \%$ à 0,6 mg/mL.

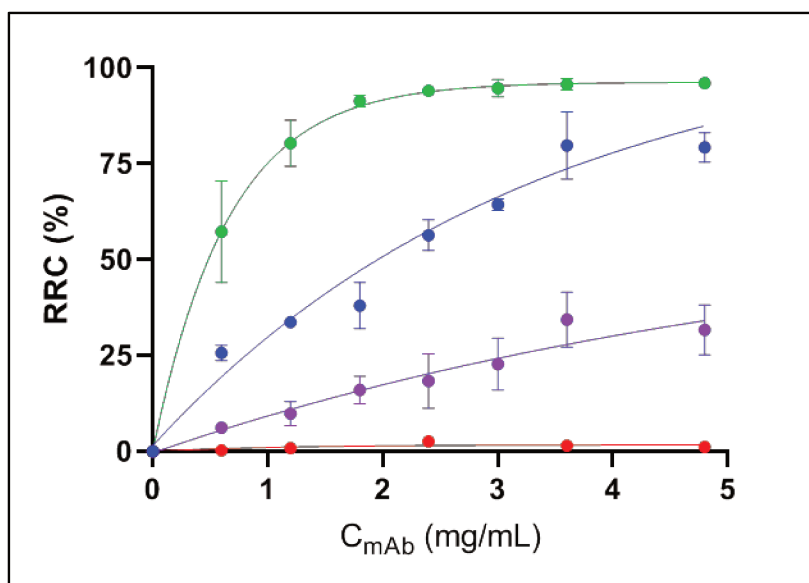


Figure 42. Influence de la concentration en anticorps sur le radiomarquage à l'iode-125^a du 9E7.4-AB (●) et du 9E7.4 (●) et à l'astate-211^b du 9E7.4-AB (●) et du 9E7.4 (●).

Conditions standard : mAb, 30 min, 25 °C en tampon Tris 0,5 M pH 6/DMF (92,5:7,5), $n = 3$, ^a Cu(OTf)₂pyr₄ (2,5 mM), 1,10-phénantroline (2,5 mM), [²¹¹At]NaAt (1-5 MBq) ^b Cu(OTf)₂pyr₄ (5 mM), 1,10-phénantroline (5 mM), [¹²⁵I]NaI (1-5 mBq). RRCs déterminés par l'analyse ITLC-SG du produit brut.

Il est déjà connu que l'astate libre puisse se lier avec des protéines. L'espèce At(I) a montré pouvoir former des liaisons faibles avec les protéines en l'absence de groupements thiols provenant des cystéines, ce qui conduit à un radiomarquage qui se dissocie facilement. Ces liaisons sont tellement faibles que l'astate se dissocie lors de la précipitation des protéines ou lorsque cette dernière est passée sur une colonne chromatographique Sephadex lors d'une analyse ou d'une purification²¹⁴. Le fait que du radiomarquage non spécifique soit observé avec l'astate-211 peut représenter un problème dans la mesure où la liaison formée est trop faible pour subsister lorsque le radiopharmaceutique sera injecté *in vivo*. C'est pourquoi la possibilité que le radiomarquage non spécifique se réalise de manière compétitive à l'astatodéboronation a été investiguée. Afin d'élucider cette question, la pureté radiochimique après purification par exclusion stérique (colonne PD10) du 9E7.4-AB et du 9E7.4 non modifié radiomarqués à l'astate-211 ont été comparées par analyse ITLC-SG (éluant : méthanol). L'analyse chromatographique montre qu'après purification, l'activité est détectée le long de la bande ITLC-SG dans le cas du [²¹¹At]9E7.4 non modifié dû à la dissociation progressive de l'astate-211 faiblement lié à l'anticorps pendant l'élution (figure 43B). Au contraire, la pureté radiochimique du [²¹¹At]9E7.4-AB était très élevée, la plupart de l'activité restant au bas de l'ITLC (>99 %) (figure 43A). Ces résultats, similaires aux observations de Visser²¹⁴, montrent que très peu, voir aucun couplage non-spécifique ne se produit lors du radiomarquage du 9E7.4-AB, ou que s'il se produit, il est éliminé pendant l'étape de purification.

Le comportement chromatographique et de précipitation sur le radiomarquage non spécifique du le 9E7.4 suggère l'établissement d'une liaison faible, comme déjà rapportée par Visser et al²¹⁴. Cependant, la nature exacte de cette liaison est encore inconnue aujourd'hui.

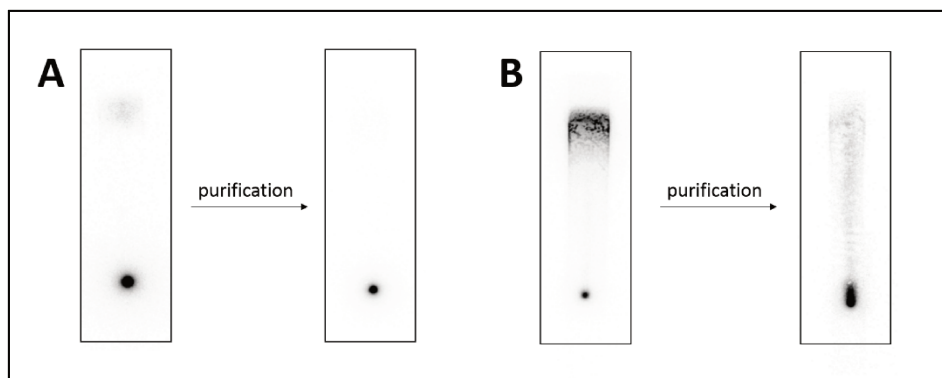


Figure 43. Analyses ITLC-SG (MeOH comme éluant) de A) [²¹¹At]9E7.4-AB avant et après purification sur une colonne PD-10 ; B) [²¹¹At]9E7.4 (marquage non-spécifique) avant et après purification sur une colonne PD-10.

Il est intéressant de noter que les RRCs plus faibles obtenus aux concentrations d'anticorps plus basses ont pu être améliorées par l'augmentation du temps de radiomarquage ou de la température (tableau 32). Lorsque le temps de radiomarquage a été étendu de 30 à 60 minutes, le RRC d'astatation a augmenté de $55 \pm 17 \%$ à $85 \pm 4 \%$ pour une concentration en mAb de 0,6 mg/mL. En ce qui concerne la radioiodation, les RRCs ont pu passer de $34 \pm 1 \%$ à 74% en augmentant le temps de réaction de 30 minutes à 6 h pour une concentration en anticorps de 1,2 mg/mL. Dans tous les cas, aucune augmentation du radiomarquage non spécifique sur le 9E7.4 n'a été observée. De plus, chauffer la réaction à 42 °C accélère la cinétique de réaction et augmente de manière significative le RRC du radiomarquage à l'astate-211 de $55 \pm 17 \%$ à $73 \pm 4 \%$ en 30 minutes avec une concentration en 9E7.4-AB de 0,6 mg/mL. Cependant, cela s'accompagne d'une augmentation du marquage non spécifique, qui passe de $6 \pm 1 \%$ à 25 °C à $16 \pm 2 \%$ à 42 °C. Le même chauffage n'accélère pas la cinétique de la radioiodation. En effet, les RRCs obtenus après 30 minutes de réaction pour une concentration en 9E7.4-AB de 0,6 et 1,2 mg/mL restent similaires entre 25 °C ($26 \pm 2 \%$) et 42 °C ($20 \pm 1 \%$). Ce chauffage semble même défavorable, les RRCs diminuant de $60 \pm 8 \%$ à 25 °C à $34 \pm 4 \%$ à 42 °C et de 74% à 25 °C à $58 \pm 8 \%$ à 42 °C au bout de 6 h de réaction pour une concentration en 9E7.4-AB de 0,6 et 1,2 mg/mL, respectivement. La cinétique de la radioiodation dans ces conditions étant bien plus lente que celle de l'astatation, cela explique le fait que le chauffage n'a pas eu d'influence sur les temps courts. En ce qui concerne les temps plus longs, une hypothèse est que le chauffage sur le long terme altère le catalyseur, le ligand ou même l'acide boronique. La protodéboronation est notamment un phénomène possible en milieu aqueux³⁰⁸. Ce dernier nécessite l'utilisation d'une base, souvent d'un chauffage à plus haute température (60-150 °C) et d'un catalyseur au palladium ou à l'argent. Un exemple dans la littérature fait toutefois mention d'une protodéboronation à l'aide d'un

catalyseur de cuivre (CuSO_4).³⁰⁹ Cette réaction nécessite toutefois un chauffage à 80 °C et est favorisée par la présence d'une base. Il est possible que dans notre cas, le chauffage prolongé à 42 °C conduise tout de même à une légère protodéboronation, ce qui expliquerait le RRC inférieur par rapport à la réaction réalisée à 25 °C.

Pour la suite de l'étude, les conditions optimales ont donc été sélectionnées sur la base de 30 minutes de réaction à 25 °C. Les concentrations optimales choisies sont respectivement de 3,6 mg/mL et 1,8 mg/mL pour le radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211.

Tableau 32. Optimisation de l' A_s du $[^{125}\text{I}]9\text{E7.4-AB}$ et du $[^{211}\text{At}]9\text{E7.4-AB}$.

Temps de réaction (h)	Concentration en 9E7.4-AB (mg/mL)	Température (°C)	RRC (%)	
			$^{125}\text{I}^a$	$^{211}\text{At}^b$
0,5	0,6	25	26 ± 2	55 ± 17
0,5	0,6	42	20 ± 1	73 ± 4
0,5	1,2	25	34 ± 1	-
0,5	1,2	42	36 ± 4	-
1	0,6	25	-	85 ± 4
1	0,6	42	-	81 ± 3
6	0,6	25	60 ± 8	-
6	0,6	42	34 ± 4	-
6	1,2	25	74^c	-
6	1,2	42	58 ± 8	-

^aConditions standard : 9E7.4-AB, $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$ (5 mM), 1,10-phénantroline (5 mM), tampon Tris 0,5 M pH 6/DMF (92,5:7,5), $[^{125}\text{I}]\text{NaI}$ (1-5 MBq), $n = 3$. ^bConditions standard : 9E7.4-AB, $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$ (2,5 mM), 1,10-phénantroline (2,5 mM), tampon Tris 0,5 M pH 6/DMF (92,5:7,5) $[^{211}\text{At}]\text{NaAt}$ (1-5 MBq), $n = 3$. ^c $n = 1$.

Une fois ces conditions optimales déterminées, des tests sur plus haute activité (environ 30 MBq) ont été menés dans l'optique de pouvoir réaliser des tests précliniques qui permettront de valider cette nouvelle procédure. Si la montée en échelle du radiomarquage à l'iode n'a pas posé de problèmes particuliers, elle s'est avérée plus laborieuse à l'astate. Les RRCs obtenus étaient notamment plus faibles lorsque l'activité utilisée lors de la réduction de l'astate était de l'ordre de 50 MBq comparé à 5 MBq ou moins (81% pour une réduction sur 50 MBq contre $91 \pm 2\%$ pour une réduction sur 5 MBq). De plus, une activité non négligeable restait dans le flacon de réduction de l'astate et ne pouvait pas être transférée dans le milieu de marquage (pertes jusqu'à 80% pour une activité autour de 50 MBq contre 33% pour 10 MBq). Une nouvelle étude de la réduction a donc dû être effectuée pour permettre d'avoir une activité suffisante en fin de procédure pour pouvoir faire les tests précliniques. Dans un premier temps, les tests ont été effectués sur une activité de 10 MBq

utilisés à l'étape de réduction afin de voir si les paramètres auxquels on s'intéressait pouvaient avoir une influence positive ou négative sur le radiomarquage du 9E7.4-AB avant de passer à une activité plus haute. Le premier paramètre testé a été l'influence de la concentration en sulfite de sodium (tableau 33). Initialement, la réduction se faisait par l'ajout 10 μ L de sulfite de sodium à 0,125 mg/mL comme il avait été déterminé lors du radiomarquage de l'anti-CD22, ce qui conduisait à un RRC de 89 % pour le radiomarquage à l'astate du 9E7.4-AB pour 10 MBq utilisés lors de la réduction de l'astate. Lorsque cette concentration est multipliée par deux, cela entraîne une diminution du RRC jusqu'à 54 %, tandis que lorsqu'elle est divisée par deux, cela n'a pas d'influence significative (88 ± 7 %). Comme ce qui avait été observé avec l'anti-CD22, utiliser trop de réducteur semble perturber la réaction. Le volume de la réduction a ensuite été doublé. On constate qu'à concentration égale, le RRC diminue de manière significative (78 % pour 20 μ L contre 88 ± 7 % pour 10 μ L pour une concentration en réducteur de 0,0625 mg/mL). D'un autre côté, à quantité égale de réducteur (donc lorsque la concentration est divisée par deux), on retrouve des RRCs similaires (92 % pour 20 μ L de Na_2SO_3 à 0,3123 mg/mL contre 88 ± 7 % pour 10 μ L de Na_2SO_3 à 0,625 mg/mL).

Tableau 33. Influence de la concentration en Na_2SO_3 sur le radiomarquage à l'astate du 9E7.4-AB pour 10 MBq d'astate lors de l'étape de réduction.

Concentration en Na_2SO_3 (mg/mL)	RRC (%) ^a
0,25	54
0,125	89
0,0625	88 ± 7^c
0,0625 ^b	78
0,0313 ^b	92

^aConditions standard : Réduction : Na_2SO_3 (10 μ L), Radiomarquage : 30 min, 25 °C, tampon Tris 0,5 M pH 6/DMF (92,5:7,5), 9E7.4-AB (1,8 mg/mL), $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$ (2,5 mM), 1,10-phénantroline (2,5 mM), $n = 1$, ^b Na_2SO_3 (20 μ L), ^c $n = 6$.

D'autres réducteurs ont également été testés afin de voir si la réaction pouvait être améliorée en se basant sur 10 μ L de réducteur à 0,0625 mg/mL (tableau 34). Le métabisulfite de sodium a donné des résultats similaires au sulfite de sodium. Le dithiothréitol a également été testé mais n'a donné que 15 % de RRC, comme on pouvait s'y attendre car l'étude sur le composé modèle a montré que ce dernier dégradait la 1,10-phénantroline. L'hydrazine a été rapportée pour la réduction de l'astate³¹⁰ et a donc été testée. Son utilisation pure a conduit à un faible RRC de seulement 13 %. Diluer ce réducteur dans l'eau à une concentration de 0,5 mol/L a néanmoins pu augmenter le RRC jusqu'à 36 %. Cependant il est à noter que ce réducteur semble dégrader le catalyseur, une couleur orangée étant obtenue lors que ces deux réactifs sont mis en contact. Bien que d'autres réducteurs existent pour réduire l'astate, il a été choisi de passer directement sur des tests de plus haute activité afin de pouvoir passer aux tests précliniques le plus rapidement possible. Le sulfite de sodium et le métabisulfite de

sodium ont été les réducteurs les plus efficaces et afin de garder une cohérence avec tout le travail effectué précédemment, le sulfite de sodium a été conservé pour la suite des expériences.

Tableau 34. Influence du réducteur sur le radiomarquage à l'astate du 9E7.4-AB pour 10 MBq d'astate lors de l'étape de réduction.

Réducteur	RRC (%) ^a
Na ₂ SO ₃	88 ± 7 ^d
Na ₂ S ₂ O ₅	90 ± 1 ^e
DTT	15
NH ₂ NH ₂ .H ₂ O ^b	13
NH ₂ NH ₂ .H ₂ O ^c	36

Conditions standard : Réduction : Réducteur (0,0625 mg/mL, 10 µL), Radiomarquage : 30 min, 25 °C, tampon Tris 0,5 M pH 6/DMF (92,5:7,5), 9E7.4-AB (1,8 mg/mL), Cu(OTf)₂pyr₄ (2,5 mM), 1,10-phénantroline (2,5 mM), n = 1, ^bNa₂SO₃ (20 µL), n = 1, ^bNH₂NH₂.H₂O pur, ^cNH₂NH₂.H₂O à 0,5 mol/L, ^dn = 6, ^en = 2.

Les tests de réduction ont ensuite été réalisés sur une activité autour de 50 MBq lors de la réduction de l'astate. Les conditions initiales de réduction (10 µL de Na₂SO₃ à 0,125 mg/mL) ont conduit à un RRC de 84 ± 4 %, mais 81 ± 2 % de l'activité réduite est restée dans le flacon de réduction et n'a pas pu être introduite dans le flacon de radiomarquage (selon la méthode A, figure 44). Afin de limiter les pertes, il a été tenté de réaliser le radiomarquage directement dans le flacon de réduction (méthode B, figure 44). Cependant cela a conduit à une diminution drastique du RRC (68 %). De plus, seulement 60 % de l'activité a pu être récupérée lorsque que milieu de marquage a été prélevé et introduit dans un autre flacon, les 40 % restants étant absorbé sur le verre du flacon de marquage.

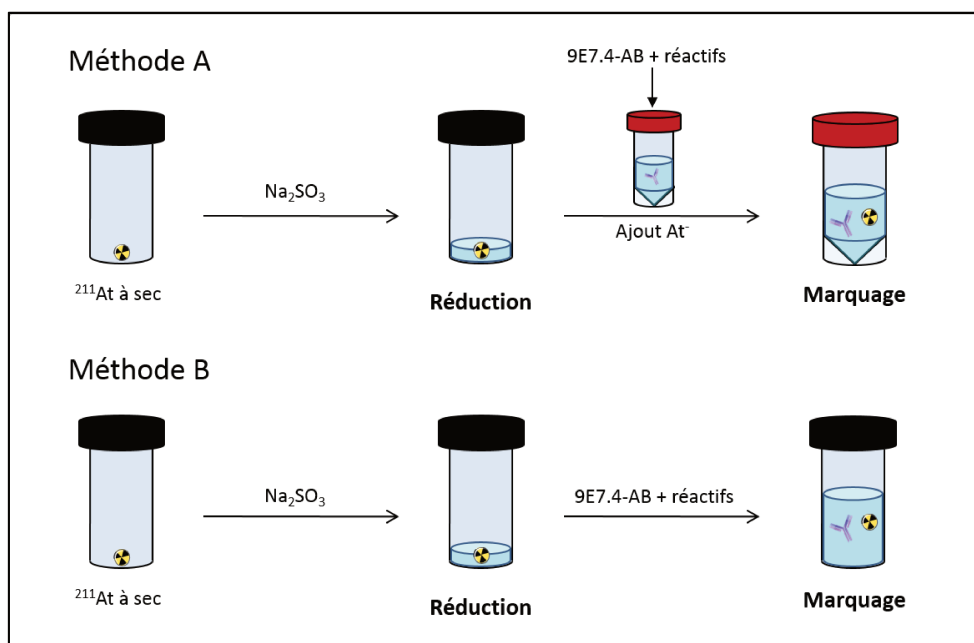


Figure 44. Procédure du radiomarquage du 9E7.4-AB avec la méthode A où le marquage s'effectue dans un flacon différent que le flacon de réduction de l'astate-211 et la méthode B où le marquage s'effectue directement dans le flacon de réduction de l'astate-211.

L'idée de réaliser le radiomarquage dans le même flacon que celui utilisé pour réduire l'astate (méthode B) a donc été abandonnée. Il a alors été décidé de faire varier la concentration en réducteur et de voir son influence sur le RRC, ainsi que sur les pertes d'activité occasionnées lors du transfert de l'astate réduit vers le milieu de marquage (tableau 35). Ramener la concentration en réducteur à 0,0625 mg/mL donne des résultats difficilement reproductibles, aussi bien en termes de RRCs (62 ± 13 %) que de perte d'astate dans le flacon de réduction (60 ± 19 %). Il en va de même lorsque le volume passe à 20 μL en conservant une concentration à 0,0625 mg/mL, même si on observe en moyenne un meilleur RRC et moins de perte d'activité due à l'étape de réduction, la plus faible étant de seulement 19 %. Un seul test a été réalisé avec 20 μL de Na_2SO_3 à 0,313 mg/mL et bien que le RRC obtenu fût satisfaisant, 84 % de l'activité est restée dans le flacon de réduction.

Tableau 35. Influence de la concentration et de la quantité de Na_2SO_3 sur le radiomarquage à l'astate du 9E7.4-AB pour 50 MBq d'astate lors de l'étape de réduction.

Concentration en Na_2SO_3 (mg/mL)	Volume de réducteur (μL)	RRC (%) ^a	Perte d'activité (%)
0,125	10	84 ± 4^b	81 ± 2^b
0,0625	10	62 ± 13^c	60 ± 19^c
0,0625	20	84 ± 4^d	38 ± 24^d
0,0313	20	70	84

^aConditions standard : Réduction : Na_2SO_3 , Radiomarquage : 30 min, 25 °C, tampon Tris 0,5 M pH 6/DMF (92,5:7,5), 9E7.4-AB (1,8 mg/mL), $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$ (2,5 mM), 1,10-phénantroline (2,5 mM), $n = 1$, ^b $n = 2$, ^c $n = 3$, ^d $n = 5$.

Même si peu reproductibles, les conditions utilisant 20 μL de Na_2SO_3 à 0,0625 mg/mL nous ont parues les plus adaptées. Lors des meilleures expériences, partir d'environ 50 MBq d'astate à l'étape de réduction permettait d'obtenir entre 30 et 40 MBq d'astate réduit transférable dans le milieu de marquage, ce qui était suffisant pour réaliser les tests précliniques. Il serait néanmoins intéressant de poursuivre ce travail afin d'obtenir des résultats qui permettent d'obtenir des RRCs suffisants tout en limitant la perte due au transfert de l'astate réduit dans le milieu de marquage et ce de façon reproductible. En plus d'étudier la façon de réduire l'astate, il pourrait être utile de réfléchir à des méthodes de purification de la source reçu en laboratoire, en utilisant des colonnes de tellure, déjà rapportée pour cette utilisation⁵⁹.

Les conditions de radiomarquages optimales ayant été déterminées à l'iode-125 et à l'astate-211, le procédé entier a pu être testé sur des activités compatibles avec des études précliniques (radiomarquage sur environ 30 MBq) depuis le radiomarquage jusqu'à l'obtention du radiopharmaceutique final purifié. Les résultats ont été comparés avec l'approche classique en deux étapes *via* la méthode électrophile et nucléophile déjà rapportée pour cet anticorps¹⁸⁶ (tableau 36). Ce nouveau procédé a conduit à de meilleurs résultats, avec un RRC final quasiment doublé pour la radioiodation comparée à la méthode en deux étapes nucléophile. Le radiomarquage à l'astate-211 donne également de meilleurs résultats, avec des RRCs jusqu'à 68 %. La différence entre le RRC brut et final pour l'astatation peut s'expliquer par une partie de radiomarquage non-spécifique qui serait éliminé lors de l'étape de purification. De plus, entre 15 et 25 % de l'anticorps est généralement perdu lors de l'étape de purification sur PD-10. Comparé aux autres méthodes en deux étapes, le temps de la procédure est considérablement réduit grâce au fait qu'une seule étape de radiomarquage soit nécessaire, ce qui est un paramètre important à prendre en compte avec les radionucléides de court temps de demi-vie tels que l'astate-211. Le gain de temps, couplé au fait que moins d'anticorps est nécessaire pour un radiomarquage optimal, de meilleures activités spécifiques et de meilleurs rendements radioactifs peuvent être obtenus. L'utilisation du catalyseur au cuivre pouvant être un problème lié à la toxicité du cuivre, la présence résiduelle de ce métal a été dosé par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) sur le ^{211}At 9E7.4-AB purifié. Les résultats ont montré que la concentration de cuivre était en-dessous de la limite de détection de 1 ppm.

Tableau 36. Comparaison entre les méthodes électrophiles et nucléophiles en deux étapes et notre nouvelle méthode pour la radioiodation et astatation en une étape via les acides boroniques du 9E7.4.

Méthode	RRCs		Rendement		A _s [*]		Temps (min)
	(%)		radioactif* (MBq)		(MBq/mg)		
	¹²⁵ I	²¹¹ At	¹²⁵ I	²¹¹ At	¹²⁵ I	²¹¹ At	
Méthode électrophile ^a	-	20 - 30 %	-	5,5	-	24,4	200 ± 10
Méthode nucléophile ^b	43 %	53 - 57 %	12,9	13,2	57,3	58,7	140 ± 10
Ce travail	80 %	56 - 68 %	24	16,1	66,7	119	90 ± 10

^aSAB obtenu à partir du précurseur organostannique avec le N-chlorosuccinimide comme agent oxydant avant la conjugaison au mAb (n = 2). ^bSAB obtenu à partir du précurseur sel de diaryliodonium avec le sulfite de sodium en agent réducteur avant la conjugaison au mAb (n = 5). * valeurs uniformisée à partir d'une valeur théorique de départ de 30 MBq.

II.3. Etudes biologiques

Le radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 du 9E7.4-AB a pu être réalisé et les conditions optimales déterminées. Cependant cette nouvelle procédure peut potentiellement avoir un impact négatif sur les propriétés de l'anticorps, notamment en ce qui concerne son affinité pour sa cible ou encore sa pharmacocinétique *in vivo* : la protéine est alourdie par 3 à 4 greffons, soumise à la présence de solvants organiques (bien qu'en proportions raisonnables) lors du couplage et du marquage, et à un catalyseur et un réducteur lors du marquage. Il est donc nécessaire de vérifier la validité de cette nouvelle procédure en réalisant des tests d'immunoréactivité, ainsi que des études de biodistribution.

II.3.1. Immunoréactivité

Afin de vérifier si les modifications apportées sur l'anticorps n'altèrent pas ses propriétés de reconnaissance, des tests d'immunoréactivité ont été réalisées après radiomarquage à l'aide de billes magnétiques greffées avec un peptide composé de 40 acides aminés (produit par Genecust) qui correspond à une partie de l'antigène CD138. Si l'anticorps a conservé ses propriétés de reconnaissance, il devrait alors se fixer sur les billes. Dans le cas contraire, il se retrouverait dans la partie surnageante. Afin de déterminer la fraction immunoréactive, le 9E7.4-AB radiomarké est mis en contact avec les billes 15 minutes. Puis les billes, magnétiques, sont facilement séparées du surnageant à l'aide d'un aimant et l'activité comptée au compteur gamma. La fraction immunoréactive correspond au rapport entre l'activité comptée sur les billes et l'activité totale. 90 % et 88 % de fraction immunoréactives ont été obtenues avec le 9E7.4-AB radiomarké à l'iode-125 et à l'astate-211 respectivement, ce qui est similaire avec le 9E7.4 natif (85 %). Ces résultats montrent que l'affinité de cet anticorps pour sa cible est préservée après les modifications et le procédé de radiomarquage.

Les propriétés de stockage du 9E7.4-AB apparaissent importantes à évaluer car ce type d'information permet d'envisager le développement de kits « prêt à l'emploi » pour une application en clinique. Des radiomarquages du même lot de 9E7.4-AB conservé en tampon Tris 0,5 M pH 6 à 4 °C

et $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ont été réalisés sur 13 mois (figure 45). A la fin de cette période, l'analyse du produit brut a conduit à des RRCs de 70 % et 81 % en radioiodation et astatation respectivement pour une conservation à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Des résultats similaires ont été obtenus pour l'anticorps conservé à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ avec 83 % et 84 % pour le radiomarquage à l'iode et à l'astate respectivement (comparés à $80 \pm 9\%$ et $91 \pm 2\%$ pour la radioiodation et astatation d'un lot fraîchement préparé de 9E7.4-AB, respectivement). Les tests d'immunoréactivité réalisés sur l'anticorps radioiodé ont montré une préservation des propriétés de reconnaissances, les fractions immunoréactives étant respectivement de 85 % et 90 % pour les mAbs conservés 13 mois à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ces résultats montrent que l'anticorps modifié peut donc être préservé dans son tampon de radiomarquage pendant au moins 13 mois sans être dégradé.

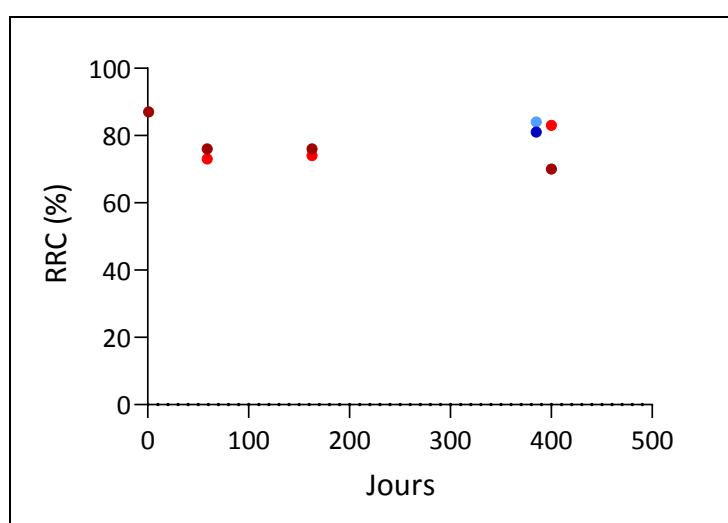


Figure 45. Radiomarquage du 9E7.4-AB à l'iode-125 conservé à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (●) ou $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (○)^a et à l'astate-211 conservé à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (●) ou $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (○)^b en tampon Tris 0,5 M pH 6.

Conditions standard : 30 min, tampon Tris 0,5 M pH 6 / DMF (92,5/7,5), 100 μL , $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. ^aCu(OTf)₂pyr₄ (5 mM), 1,10-phénantroline (5 mM), [¹²⁵I]NaI (1-10 MBq) ^bCu(OTf)₂pyr₄ (2,5 mM), 1,10-phénantroline (2,5 mM), [²¹¹At]NaAt (1-5 MBq). RRCs déterminés par analyse radiolTLC-SG du produit brut.

II.3.2. Etudes de biodistribution

Afin de confirmer la viabilité de cette chimie pour des applications en imagerie nucléaire et en thérapie, la biodistribution du 9E7.4 radiomarqué à l'iode-125 et à l'astate-211 *via* cette nouvelle procédure en une étape a été réalisée avec un suivi sur 21 h après injection intraveineuse sur des souris BALB/c préalablement greffées en sous-cutané avec la lignée cellulaire de plasmocytome MOPC-315 exprimant le CD138. Les résultats ont été comparés avec la méthode conventionnelle en deux étapes rapportée par Guérard et al¹⁸⁶ dans laquelle le [²¹¹At]SAB et le [¹²⁵I]SIB ou sont synthétisés à partir des précurseurs sels de biaryliodonium **41** et **42** respectivement avant d'être couplés à l'anticorps (figure 46).

telles études que des différences entre souris soient visibles dans le sang aux temps les plus courts, en particulier avec les molécules de grande taille tels que les anticorps. Cette différence dans le sang n'est donc pas révélatrice d'un changement de comportement de l'anticorps. Par ailleurs, les valeurs sont redevenues similaires entre les deux approches dans les temps suivants, ce qui nous conforte dans cette conclusion.

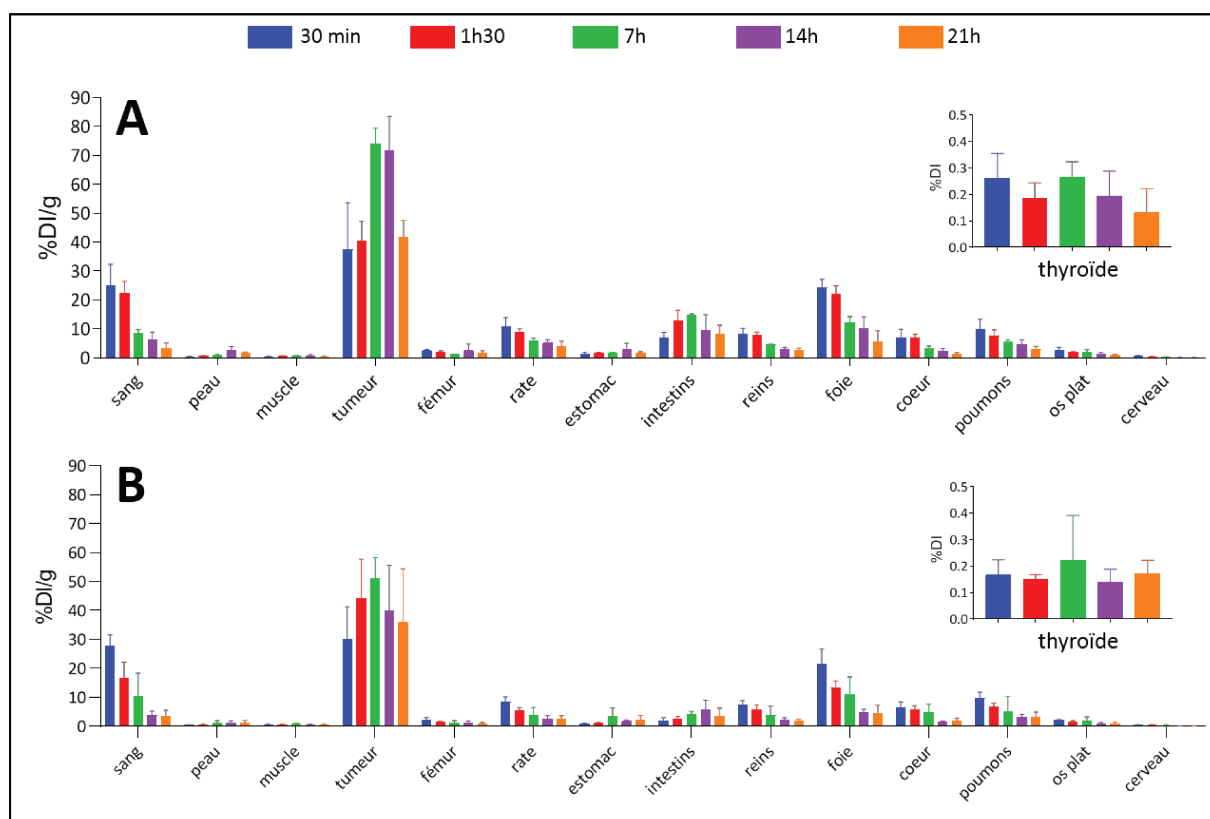


Figure 47. Biodistributions du 9E7.4 ¹²⁵I-radioiodé sur des souris BALB/c avec des tumeurs greffées en sous-cutané (MOPC-315) injectées avec : A) 37 kBq de 9E7.4-AB radiomarké à l'iode-125 via la méthode en deux étapes ; B) 37 kBq de 9E7.4-AB radiomarké à l'iode-125 via la méthode des acides boroniques en une étape.

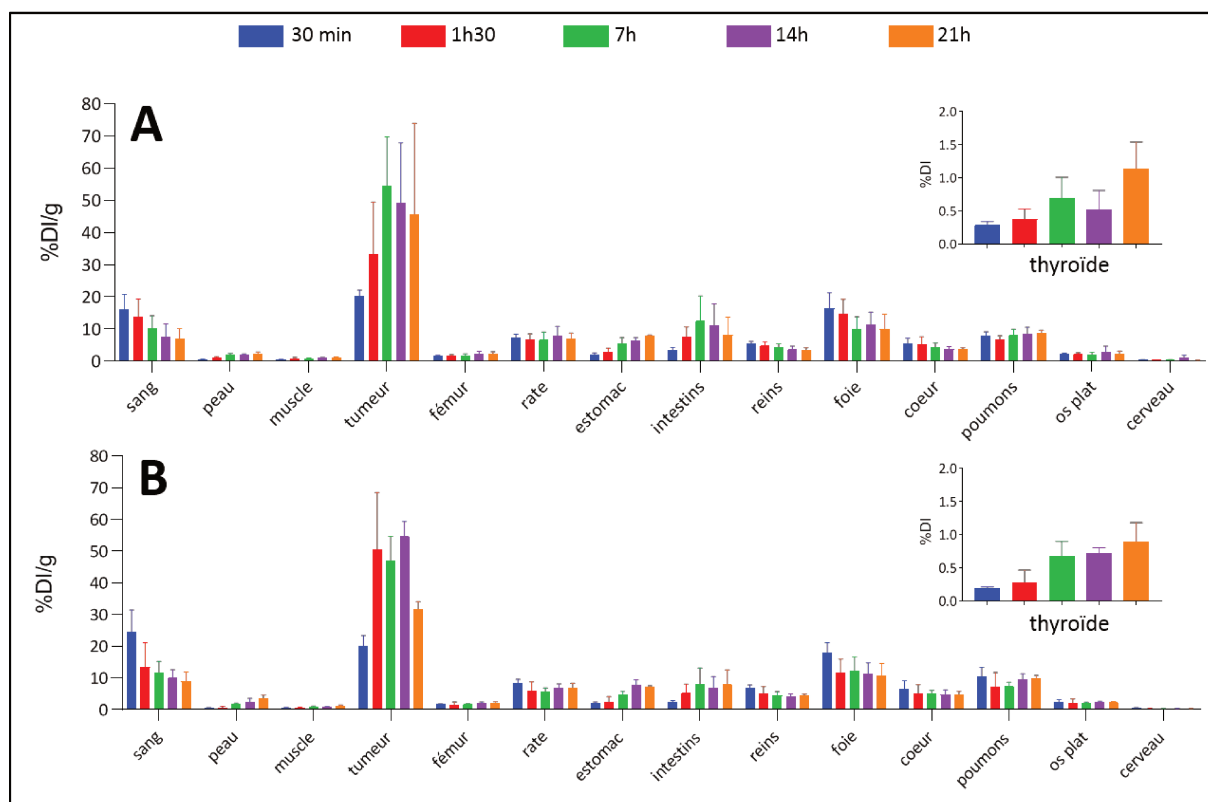


Figure 48. Biodistributions du 9E7.4 ^{211}At -astaté sur des souris BALB/c avec des tumeurs greffées en sous-cutané (MOPC-315) injectées avec : A) 1 MBq de 9E7.4-AB radiomarqué à l'astate-211 via la méthode en deux étapes ; B) 1 MBq de 9E7.4-AB radiomarqué à l'astate-211 via la méthode des acides boroniques en une étape.

Quelle que soit la méthode de marquage utilisée, une haute dose délivrée à la tumeur a été observée. L'accumulation significativement plus haute obtenue avec la radioiodation en deux étapes à 7 h ($p < 0,0001$) et à 14 h ($p < 0,0001$) ainsi qu'avec le radiomarquage à l'astate en une étape à 1h30 ($p = 0,0003$) peut être expliquée par une masse de tumeurs plus faibles pour ces groupes. En effet, l'accumulation du radioimmunoconjugué dans la tumeur semble être inversement corrélée à la masse de la tumeur (figure 49), ce qui peut s'expliquer par la différence de vascularisation entre les grosses et les petites tumeurs (observation faite dans l'équipe mais non publiée). Les tumeurs plus larges sont souvent faiblement vascularisées avec une haute pression interstitielle qui conduit au développement de tissus nécrotiques en leur centre, avec une perte de l'expression du CD138.

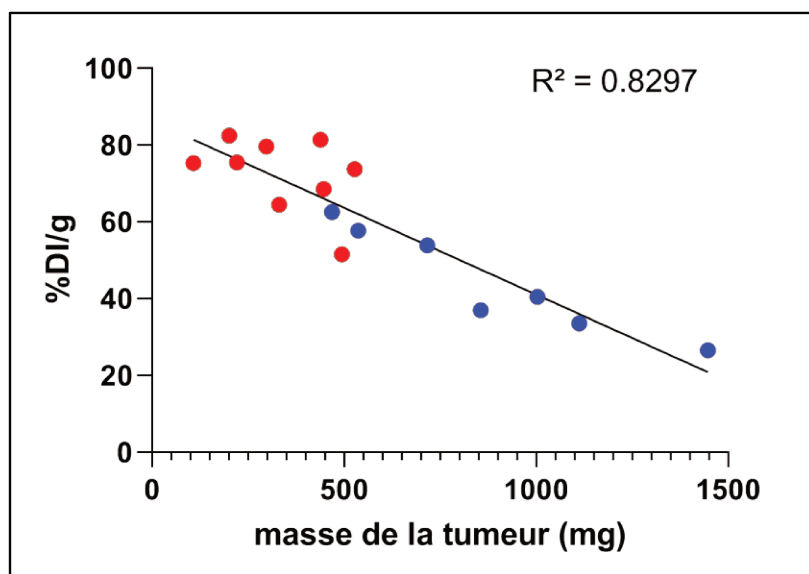


Figure 49. Pourcentage de la dose injectée par gramme en fonction de la masse de la tumeur 7 h et 14 h après injection du 9E7.4-AB radiomarké à l'iode-125 par la méthode en deux étapes (●) et la méthode des acides boroniques une étape (●).

La comparaison entre les biodistributions réalisées avec les anticorps radioiodés et leur analogue astaté avec la même méthode de radiomarquage montre une fixation plus importante dans la thyroïde, la rate, les poumons et les reins dans le cas des ^{211}At -immunoconjugués. Cette observation n'est pas surprenante et peut être attribuée à la rupture progressive de la liaison entre l'astate et son vecteur *in vivo*, ces organes étant les cibles de l'astate libre. Cette instabilité reste cependant modérée, avec une légère augmentation de la fixation du radioimmunoconjugué dans ces organes et n'est pas impactée par la méthode de radiomarquage utilisée ($p > 0,05$). Cette fixation non spécifique pourrait être réduite de façon significative par l'utilisation d'agents bloquants, tels que l'iodure de sodium ou encore le perchlorate de sodium¹¹² (cf partie introduction bibliographique, II.5.2). Dans notre cas, de tels agents n'ont pas été utilisés volontairement dans le but de maintenir notre capacité à déterminer si la solution injectée contient ou non de l'astate-211 libre, ou de l'astate-211 faiblement lié à l'anticorps, l'hypothèse d'un marquage non-spécifique insuffisamment purifié tel que discuté plus haut (cf II.2.3.) n'ayant pas été encore totalement exclue à ce stade. Si tel était le cas, une accumulation importante aurait été observée dans la thyroïde dès les temps précoces. Or, les résultats montrent une faible fixation dans la thyroïde aux temps courts ($< 0,3\%$ DI à 30 minutes), similaire à ce qui a été obtenu avec l'analogue ^{125}I -radioiodé, puis suivi par une augmentation progressive jusqu'à une différence visible seulement après 7 h. Par conséquent, l'analyse de l'activité absorbée par la thyroïde semble indiquer que l'astate fixé de manière non spécifique à l'anticorps a été éliminé de façon efficace lors de l'étape de purification du radiopharmaceutique.

II.4. Automatisation du procédé de radiomarquage

L'automatisation d'un procédé de radiomarquage est une étape importante si ce dernier doit être transféré en clinique. Il a donc été entrepris d'automatiser cette nouvelle méthode de radiomarquage d'anticorps avec l'astate-211. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Sture Lindegren à Göteborg, qui a déjà automatisé des procédés de radiomarquages à l'astate-211 de protéines.

L'automatisation vise à reproduire chaque étape du procédé de radiomarquage, depuis l'introduction de l'astate dans le flacon jusqu'à la purification du produit final dans un automate de synthèse. Les différentes étapes du procédé manuel sont schématisées dans la figure 50. L'astate est reçu au laboratoire en solution dans le chloroforme. Une partie de cette solution correspondant à l'activité souhaitée est prélevée et introduite dans un flacon de 1,5 mL. Le chloroforme est ensuite évaporé par flux d'azote. L'astate à sec obtenu est ensuite réduit par ajout de 20 μL de sulfite de sodium. Après 30 secondes de réaction, l'astate réduit est prélevé et introduit dans un autre flacon de 1,5 mL contenant déjà le 9E7.4-AB, le $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$ et la 1,10-phénantroline. La solution est ensuite agitée 30 minutes à 25 °C puis est déposée sur une colonne PD-10. Le flacon de marquage est généralement lavé par du PBS afin de perdre un minimum d'activité, puis l'anticorps radiomarqué est récupéré par élution en PBS dans un tube à hémolyse.

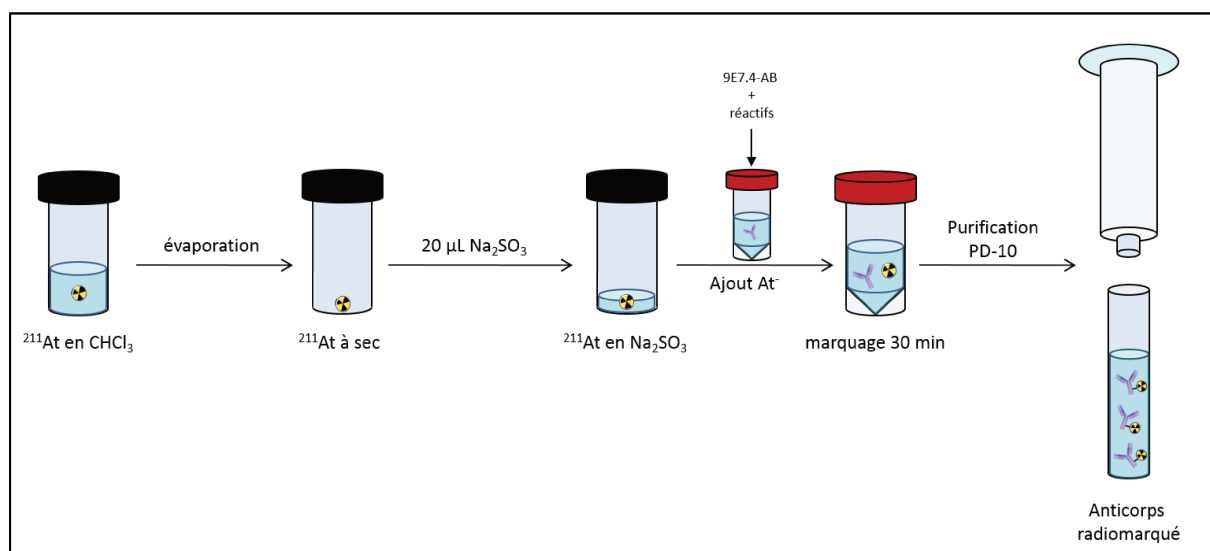


Figure 50. Schéma de la procédure manuelle de radiomarquage d'anticorps à l'astate-211 via la méthode des acides boroniques en une étape.

Bien que très simple, cette procédure comporte des problèmes quant à son application en synthèse automatisée. Tout d'abord l'étape de réduction demande un volume très faible de sulfite de sodium (20 μL) qui ne peut pas être ajouté de façon reproductible par l'automate, la plupart restant

dans les tubulures. Par conséquent, il est nécessaire de l'augmenter. Le transfert de l'astate réduit vers le flacon de marquage représente également une barrière, car en prélever un faible volume entraînerait des pertes conséquentes d'activité dans les tubulures. Un moyen de s'affranchir de ce problème est d'introduire le milieu de radiomarquage, de plus grand volume, dans le flacon de réduction de l'astate, limitant ainsi les pertes d'activité. Par ailleurs, le radiomarquage a jusqu'à présent été effectué avec un volume total de 100 μL , ce qui n'est pas suffisant pour l'application en synthèse automatisée et qui risque d'engendrer des pertes conséquentes. Un des objectifs a donc été de doubler le volume de ce dernier. Enfin, une colonne PD-10, ouverte au-dessus et destinée à un usage manuel, ne peut pas être branchée à l'automate. Il faudra donc utiliser une colonne Hi-Trap basée sur le même principe d'exclusion stérique, prévue pour l'automatisation.

II.4.1. Adaptation manuelle du procédé de radiomarquage à l'automatisation

Les premiers tests d'adaptation du procédé de radiomarquage ont été réalisés sur environ 10 MBq avant de passer à des activités plus importantes. En repartant des conditions optimisées précédemment mais en doublant le volume de réaction, une amélioration du RRC a été observée ($95 \pm 2\%$ contre $88 \pm 7\%$ pour une réaction de marquage sur 200 μL et 100 μL respectivement) (tableau 37). Quelques tests préliminaires sur la machine ont montré que 50 μL d'eau pouvaient être ajouté de manière reproductible dans le flacon de marquage. C'est pourquoi ce volume a été choisi pour introduire le sulfite de sodium pour effectuer la réduction de l'astate. Augmenter le volume de réducteur de 10 μL à 50 μL en conservant une concentration de 0,0625 mg/mL a fait diminuer le RRC à 79 %. Ce résultat était attendu étant donné que tous les tests d'optimisation précédents ont montrés qu'une trop grande quantité de réducteur faisait baisser le RRC. Abaisser cette concentration à 0,0125 mg/mL permet néanmoins d'obtenir des RRCs optimaux, jusqu'à 94 %.

Tableau 37. Adaptation du radiomarquage à l'astate du 9E7.4-AB à une version automatisée.

Volume radiomarquage (μL)	Volume Na_2SO_3 (μL)	Concentration Na_2SO_3 (mg/mL)	RRC ^a (%)
100	10	0,0625	88 ± 7^b
200	10	0,0625	95 ± 2^c
200	50	0,0625	79
200	50	0,0313	92
200	50	0,0125	94

^aConditions standard : 30 min, 25 °C, tampon Tris 0,5 M pH 6/DMF (92,5:7,5), 9E7.4-AB (1,8 mg/mL), $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$ (2,5 mM), 1,10-phénantroline (2,5 mM), $n = 1$, ^b $n = 5$, ^c $n = 2$.

Ces tests ont été réalisés de la même façon que précédemment, c'est-à-dire en réduisant l'astate dans un flacon, puis en le prélevant et en l'introduisant dans un autre flacon contenant déjà l'anticorps, le catalyseur et le ligand. Cependant pour que ce soit réalisable dans un automate de synthèse, il est plus raisonnable d'introduire l'astate directement dans le flacon de réaction, de réaliser sa réduction puis d'ajouter l'anticorps et les réactifs. Ce test a été réalisé manuellement afin de déterminer si cela n'altérerait pas le RRC. Si une légère diminution est observée pour une concentration en réducteur de 0,0313 mg/mL (85 % contre 92 % avec la méthode précédente), il reste similaire pour une concentration à 0,0125 mg/mL ($90 \pm 6 \%$ ($n = 3$) contre 94 % pour la méthode précédente).

Avant de transférer la méthode sur l'automate, une montée en échelle de l'activité a été réalisée pour deux raisons : i) l'activité perdue dans les tubulures, notamment lors du transfert du milieu de marquage sur la colonne pourrait être trop importante sur une activité aussi faible et ii) il était prévu de mettre une sonde en sortie de colonne afin de pouvoir mesurer lorsque le radioimmunoconjugué sortirait et donc de savoir quand il était nécessaire de collecter. Or, partir de 10 MBq conduirait à une activité trop faible pour être détectée en fin de purification. Il a donc été choisi de partir d'une activité de 50 MBq afin de pouvoir estimer les éventuelles pertes dans les tubulures de manière plus précise et pouvoir détecter de l'activité à la fin de l'étape de purification en sortie de colonne. Lors des tests menés pour optimiser la réaction de radiomarquage (cf II.2.3.), il a été vu que la réaction fonctionnait différemment suivant l'activité, et qu'elle était notamment plus difficile lorsque qu'elle était réalisée en partant de 50 MBq. Réduire l'astate avec 10 μ L de Na_2SO_3 à 0,0625 mg/mL avait fait passer le RRC de $88 \pm 7 \%$ pour une réduction sur 10 MBq à $62 \pm 13 \%$ pour 50 MBq. Pour obtenir un RRC optimal, la concentration ou le volume de réducteur a dû être augmenté. De plus, il a été observé qu'ajouter le milieu de radiomarquage directement sur l'astate-211 réduit conduisait à une chute du RRC, tout en ayant une partie non négligeable de l'activité qui restait absorbée sur le verre du flacon en fin de réaction. C'est pourquoi des tests d'optimisations ont été réalisés une nouvelle fois sur ces nouvelles conditions, notamment en observant l'influence de la concentration en sulfite de sodium sur le RRC. En fin de réaction, le milieu de marquage a été transvasé dans un autre flacon afin de vérifier si de l'activité restait également absorbée sur le flacon de radiomarquage (tableau 38).

Les résultats montrent que, contrairement à ce qui avait été observé à Nantes, augmenter la concentration en réducteur n'est pas nécessaire pour conserver un RRC optimal, 90 % étant obtenu avec le sulfite de sodium à 0,0125 mg/mL, ce qui est similaire à ce qui a été obtenu pour une réduction sur 10 MBq. De plus, très peu d'activité reste absorbée sur le verre du flacon lorsque que marquage est transféré en fin de réaction. Ces deux observations sont en contrastes avec ce qui a été observé à

Nantes. Cette différence peut s'expliquer par les effets de radiolyses qui peuvent se produire dans ce solvant entre la fin de la purification de l'astate-211 et son utilisation (comme discuté en partie I.2.1), conduisant à des sous-produits. Or, la source d'astate-211 reçue au laboratoire Nantais est restée en chloroforme pendant environ 2 h avant d'être utilisée (temps de transport et des contrôles). Dans le cas de l'astate-211 de Göteborg, la distillation de l'astate-211 se fait sur place et donc le radionucléide ne reste que quelques minutes dans le chloroforme avant utilisation, ce qui conduit potentiellement à la formation de moins de sous-produits par rapport à celle de Nantes. Dans tous les cas, la concentration de 0,0125 mg/mL a été conservée pour la suite de l'étude.

Tableau 38. Influence de la concentration en Na_2SO_3 sur le radiomarquage à l'astate du 9E7.4-AB pour 50 MBq d'astate lors de l'étape de réduction.

Concentration en Na_2SO_3 (mg/mL)	RRC (%) ^a	Activité absorbée sur le flacon de marquage (%)
0,0625	76 ± 0^b	20 ± 7^b
0,0313	89	15
0,0125	90	16

^aConditions standard : Réduction : Na_2SO_3 (50 μL), Radiomarquage : 30 min, 200 μL 25 °C, tampon Tris 0,5 M pH 6/DMF (92,5:7,5), 9E7.4-AB (1,8 mg/mL), $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$ (2,5 mM), 1,10-phénantroline (2,5 mM), $n = 1$, ^b $n = 2$.

II.4.2. Transfert de la procédure sur l'automate de synthèse

Après ce travail d'optimisation, la procédure de radiomarquage est désormais adaptée pour être transférable sur l'automate de synthèse. Le module utilisé est un Hot Box III, Scintomics GmbH (figure 51A). Cet automate a déjà été utilisé dans des radiomarquages d'anticorps à l'astate-211 par l'équipe de Göteborg^{267,268}. La figure 51B représente schématiquement le procédé d'automatisation de la méthode de radiomarquage du 9E7.4-AB développé. Les réactifs de départ (sulfite de sodium, 9E7.4-AB, catalyseur et ligand) sont introduits dans des conteneurs scellés tandis que l'astate en chloroforme est directement introduit dans le réacteur. La première étape consiste à évaporer le chloroforme sous flux d'azote. Ce dernier est stoppé par activation d'un bouton virtuel lorsque le solvant est totalement évaporé. Le sulfite de sodium est ensuite acheminé jusqu'au réacteur sur l'astate-211 sec par un flux d'azote. Après 30 s – 1 min, les autres réactifs sont ensuite ajoutés de la même manière. Après 30 minutes de réaction, le milieu réactionnel est introduit sur la colonne Hi-Trap à l'aide du distributeur. L'élution se fait par ajout de PBS avec le distributeur et une sonde placée en sortie de colonne permet de mesurer l'activité et de repérer la sortie du radioimmunoconjugué afin de le collecter.

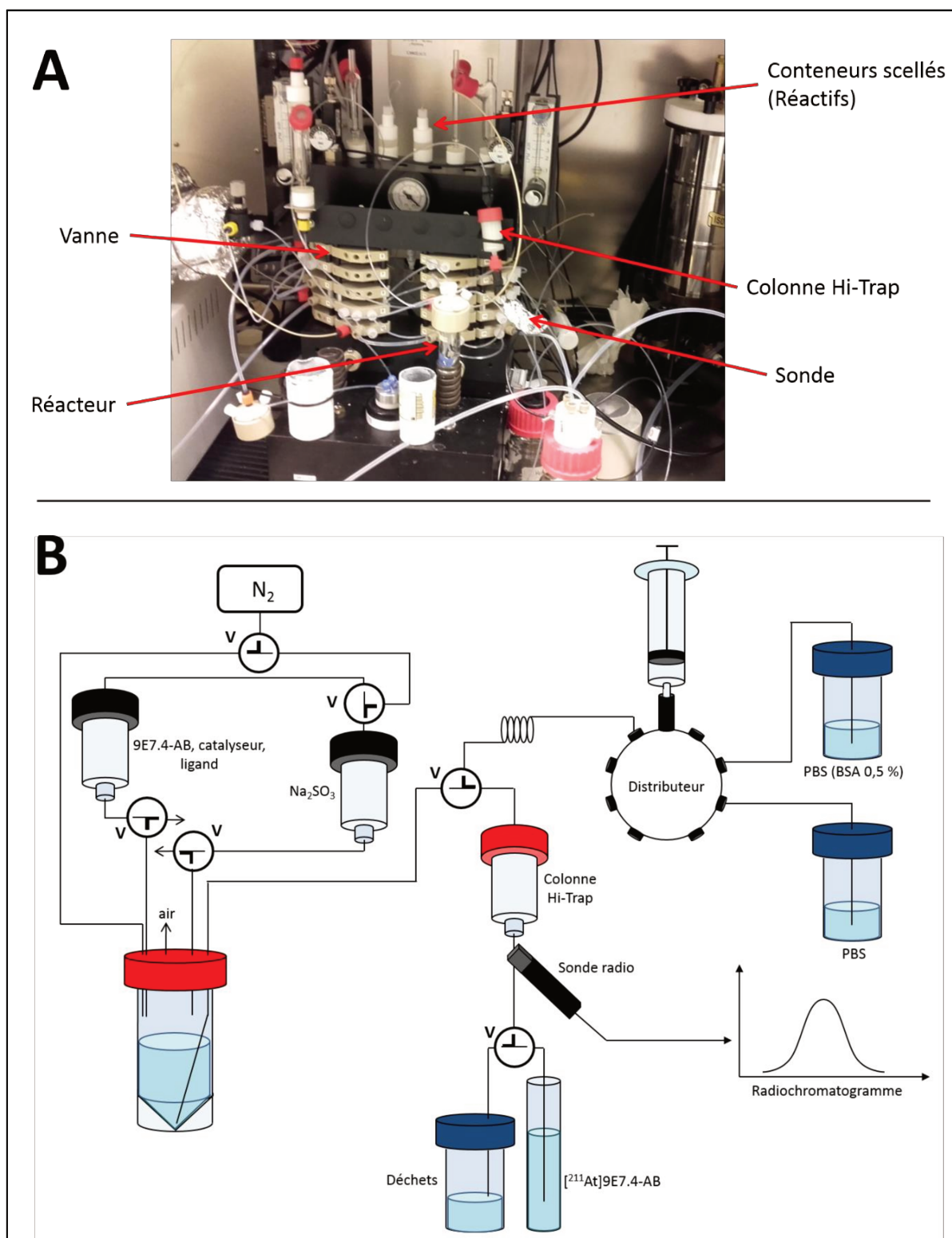


Figure 51. A) Photographie de l'automate Hot Box III, Scintomics GmbH ; B) Schéma du procédé d'automatisation (V : vanne).

Les tests de radiomarquages à l'astate-211 ont ainsi pu débuter sur l'automate de synthèse. Les premiers essais ont été réalisés en partant d'environ 10 MBq afin de vérifier si le radiomarquage fonctionnait aussi bien sur le module qu'en synthèse manuelle, avant de passer à 50 MBq. Or l'analyse du brut réactionnel par ITLC-SG indiquait des RRCs inférieurs lorsque le marquage a été réalisé sur le

module, chutant alors jusqu'à 48 ± 16 % en partant de 10 MBq et 64 % en partant de 50 MBq (tableau 39). La première hypothèse est qu'une partie des réactifs reste dans les tubulures et ne va pas jusqu'au flacon de réaction. Cependant, après vérification du volume final, il correspond à ce qui est attendu, ce qui élimine cette hypothèse. La deuxième explication possible est qu'une partie de l'anticorps est absorbée sur les tubulures. Toutefois, après vérification de la concentration de l'anticorps une fois arrivé dans le flacon de réaction par mesure de l'absorption UV, la concentration n'était pas modifiée. Le dernier paramètre qui pourrait expliquer cette différence est l'atmosphère entre la méthode manuelle et la version automatisée. En effet, le module de synthèse se trouve dans une boîte à gant sous atmosphère inerte, tandis que les radiomarquages manuels sont réalisés sous hotte où il n'y a pas de contrôle de l'atmosphère. Or dans le mécanisme supposé de la réaction, une étape d'oxydation du cuivre II en cuivre III est nécessaire (voir partie bibliographique, III. 1. 1. 6). Il n'est pas encore bien connu si cette oxydation se réalise par dismutation ou par oxydation avec le dioxygène présent dans l'air. Toutefois, les travaux de Taylor *et al*²⁰⁴ en radiofluoration ont montrés que la présence d'air permet d'obtenir des RRCs optimaux pour ce type de réaction, ce qui semble donc aller dans le sens de la seconde hypothèse et qui expliquerait les résultats obtenus dans notre cas.

Tableau 39. Comparaison du radiomarquage du 9E7.4-AB entre la méthode manuelle et la méthode automatisée.

Méthode	Activité de départ	RRC (%) ^a
Manuelle	~ 10 MBq	90 ± 6^b
Automatisée	~ 10 MBq	48 ± 16^c
Manuelle	~ 50 MBq	90
Automatisée	~ 50 MBq	64

^aConditions standard : Réduction : Na_2SO_3 (50 μL), Radiomarquage : 30 min, 200 μL 25 °C, tampon Tris 0,5 M pH 6/DMF (92,5:7,5), 9E7.4-AB (1,8 mg/mL), $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$ (2,5 mM), 1,10-phénantroline (2,5 mM), $n = 1$, ^b $n = 3$, ^c $n = 2$.

L'étape de purification a également posée problème car malgré le fait que le radiomarquage soit lancé sur 50 MBq, aucune activité n'était détectée en sortie de colonne. Il est possible que le radioimmunoconjugué sorte sur un volume trop grand et soit donc trop dilué pour être détecté. Ce problème serait sans doute réglé si le radiomarquage était lancé sur plusieurs centaines de mégabecquerels. Cependant cela aurait demandé trop d'activité et éventuellement des tests d'optimisation préalables, c'est pourquoi des activités de l'ordre de 50 MBq ont été préférés. Une autre solution serait de déterminer quel est le volume de rétention du radioimmunoconjugué et de programmer le volume pour le collecter au bon moment.

II.5. Conclusion

Les acides boroniques sont connus pour être particulièrement efficaces pour le radiomarquage à l'iode et à l'astate de molécules en milieu organique. L'étude réalisée ici a permis de mettre en lumière tout leur potentiel pour le radiomarquage de protéines. Dans un premier temps, le travail effectué sur le composé modèle (acide 4-chlorobenzène boronique **6**) a prouvé qu'ils pouvaient réagir efficacement en milieu aqueux et à 25 °C, qui sont des conditions tout à fait compatibles avec des biomacromolécules. La transposition de cette chimie sur un anticorps anti-CD22 a permis de montrer la faisabilité du radiomarquage direct à l'iode-125 et à l'astate-211 *via* les acides boroniques, avec des RRCs quasi-quantitatifs dans les conditions optimisées. L'application au deuxième anticorps, le 9E7.4, a également permis d'obtenir des RRCs du même ordre, mais avec des concentrations en anticorps bien inférieures à celles utilisées pour l'anti-CD22, ce qui montre que les conditions optimales sont anticorps dépendantes. Les études d'immunoréactivités et de biodistributions, comparées avec la méthode de radiomarquage en deux étapes décrite par Guérard *et al*¹⁸⁶, ont montrés par la suite que cette nouvelle méthode de radiomarquage n'altérerait pas les propriétés de reconnaissance de l'anticorps pour sa cible, le CD138, et qu'il préservait son profil pharmacocinétique. De plus, le fait que l'anticorps modifié puisse être conservé dans son tampon de radiomarquage pendant au moins un an facilitera le développement de kits « prêt à l'emploi » pour la clinique.

Par rapport aux autres méthodes de radiomarquages en deux étapes déjà existantes, la nouvelle approche développée ici possède de nombreux avantages. Tout d'abord, de meilleures activités spécifiques sont obtenues, ce qui permet d'augmenter les chances qu'un anticorps radioactif atteigne sa cible plutôt qu'un anticorps non radiomarké et conduit donc à un meilleur ciblage, en particulier si l'antigène cible est présent en faibles quantités à la surface des cellules. De plus, le fait qu'il s'agisse d'une procédure en une seule étape raccourcit considérablement le temps nécessaire à sa réalisation, ce qui est un avantage non négligeable lorsque des radionucléides de courts temps de demi-vie tels que l'astate-211 sont mis en jeu. Cela permet également l'accès à des rendements radioactifs bien meilleurs. Etant une procédure en une seule étape, elle pourra également être transférée en clinique plus facilement de par le fait qu'elle soit plus facile à mettre en place en synthèse automatisée. C'est un travail qui a d'ailleurs été débuté lors d'une mobilité dans le laboratoire de Sture Lindegren, dont les résultats préliminaires présentés ici sont prometteurs. La méthode développée ici est la première approche de radiomarquage direct d'anticorps par voie nucléophile qui puisse être applicable à l'astate-211, mais également à l'iode-125. L'iode possédant des radioisotopes utilisés en imagerie (¹²³I et ¹²⁴I), ce nouveau procédé devrait permettre le développement d'outils théranostiques basés sur les paires ^{123,124}I/²¹¹At, un concept qui repose sur l'utilisation d'un même composé pour une

application en imagerie et en thérapie, ce qui s'insère parfaitement dans le désir de la médecine actuelle de se concentrer sur des thérapies personnalisées.

Avant d'envisager une injection aux patients *via* cette technologie, cette étude devra être complétée, notamment avec l'investigation de la réaction de radiomarquage sur des activités plus importantes représentatives de celles utilisées en cliniques (100 MBq – 1 GBq). À de telles activités, les effets de radiolyses dus aux particules alpha émises peuvent intervenir et perturber la réaction en plus de pouvoir endommager les vecteurs. En effet, au-delà de 1000 Gy³¹¹, la radiolyse peut provoquer divers phénomènes sur les anticorps, principalement leur fragmentation, les rendant inaptes à reconnaître leur cible. Afin de limiter ce phénomène, des pièges à radicaux peuvent être utilisés, tels que l'acide ascorbique³¹².

Conclusion générale

La radiothérapie alpha vectorisée est une discipline de médecine nucléaire qui correspond au principe de « Magic Bullet » énoncé par Paul Ehrlich qui consiste à utiliser des composés capables de cibler précisément une maladie sans détériorer les organes sains. Les émetteurs alphas produisent des rayonnements fortement ionisants sur de courtes distances, ce qui les rend particulièrement adaptés pour le traitement de tumeurs micrométastatiques, de maladies résiduelles ou de cancers hématologiques. Le radium-227 est aujourd'hui le seul émetteur alpha approuvé cliniquement, sous le nom de Xofigo, mais des essais cliniques impliquant d'autres émetteurs alpha se multiplient, notamment avec le bismuth-213^{313,314}, l'actinium-225^{315,316}, le plomb-212³¹⁷ et le thorium-227³¹⁸.

L'astate-211 a fait l'objet d'un intérêt croissant ces dernières années et apparaît comme l'un des radionucléides les plus prometteurs. Deux essais cliniques de phase I menés avec ce radionucléide ont montré des résultats encourageants^{143,146–148}. Un essai clinique de phase I/II est actuellement en cours au Fred Hutchinson cancer research center (Seattle, Etats-Unis) sur le traitement de patients atteints de leucémie myéloïde et de leucémie lymphoblastique aigüe avec l'anticorps [²¹¹At]BC8-B10¹⁴⁹. Des essais cliniques sont attendus prochainement à Nantes. Cependant, ce nombre limité d'essais montre la difficulté de faire passer l'astate-211 en clinique. Cela est dû à plusieurs causes, la première étant le manque de disponibilité de ce radionucléide. Seulement une vingtaine de cyclotrons dans le monde sont potentiellement capable de le produire et parmi eux, neuf le produisent de façon routinière : cinq se situent au Japon (RCNP à Osaka, QST-Takasaki à Takasaki, QST-NIRST à Chiba, Fukushima Medical University à Fukushima et RIKEN à Wako Saitama), deux aux Etats-Unis (University of Washington à Seattle et Duke University à Durham), et deux en Europe, avec un au Danemark (Copenhagen University Hospital à Copenhague) et le dernier en France (Arronax à Nantes)³¹⁹. Toutefois, deux autres cyclotrons commencent à produire ce radionucléide aux Etats-Unis (Pen Medicine à Philadelphie et Texas A&M à College Station) et deux autres sont en cours de construction, un en Pologne (IFJ-PAN Cyclotron Centre Bronowice à Cracow) et un dernier en Allemagne (Forschungszentrum Jülich à Jülich), ce qui montre l'intérêt grandissant pour l'astate-211. Le deuxième frein est le coût nécessaire à la réalisation d'un essai clinique, qui est tellement élevé que souvent seuls des industriels peuvent les mettre en place et ces derniers sont encore rares à s'intéresser à ce radionucléide. De plus, le peu d'études encore réalisées à l'astate-211 fait que les données de toxicité et de dosimétrie liées à ce radionucléide sont encore trop limitées d'un point de vue réglementaire pour des applications en cliniques. Cependant les données collectées récemment avec d'autres émetteurs alpha tels que l'actinium-225 ou le bismuth-213 pourraient faciliter l'arrivée de l'astate-211 en clinique. Enfin, la dernière difficulté liée à ce radionucléide est l'absence d'une méthode de radiomarquage de vecteurs d'intérêts robuste et fiable qui soit bien établie.

Les méthodes les plus répandues de radiomarquage d'anticorps à l'astate-211 actuelles consistent à créer une liaison C-²¹¹At. Le radiomarquage par voie électrophile en une ou deux étapes utilise des précurseurs toxiques, ainsi que l'astate sous sa forme At⁺, difficile à maîtriser et qui conduit à des RRCs non reproductibles. De plus, la méthode en deux étapes conduit à des rendements sous-optimaux à cause de l'étape de couplage qui n'est jamais totale. La méthode par voie nucléophile développée au laboratoire grâce à la chimie des sels d'iodonium a permis d'obtenir des résultats plus reproductibles grâce à l'utilisation de l'astate sous sa forme At⁻. Cependant, cela reste une méthode de radiomarquage en deux étapes et donc une partie de la radioactivité est là aussi perdue lors du couplage.

Dans ce contexte, l'objectif de la thèse a été de développer une nouvelle méthode de radiomarquage d'anticorps à l'astate-211 par voie nucléophile. Cette nouvelle approche devait allier l'avantage d'une procédure de marquage en une seule étape qui permet de s'affranchir de la perte d'activité due au couplage et l'utilisation de l'halogène sous sa forme nucléophile, plus facile à maîtriser, en utilisant des précurseurs non toxiques. L'astate-211 n'étant pas disponible en permanence, les études préliminaires sont souvent réalisées avec son élément le plus proche dans le tableau périodique et dont les propriétés chimiques sont similaires, l'iode. C'est pourquoi les études menées au cours de cette thèse ont été réalisées en parallèle avec l'iode-125, un radionucléide facile d'accès et dont son temps de demi-vie de 60 jours le rend plus pratique à manipuler. Cependant utiliser ce modèle peut parfois s'avérer inadapté, les propriétés chimiques entre ces deux éléments pouvant différer, comme par exemple le caractère métallique qui est bien plus marqué dans le cas de l'astate. Cette différence de comportement a déjà pu être observée et rapportée dans la littérature, comme par exemple pour le radiomarquage des sels de biaryliodonium¹⁸⁵, et les résultats obtenus avec la plupart des précurseurs inclus dans cette étude confirment un peu plus cette différence entre les deux éléments.

La première partie était un travail exploratoire de plusieurs types de composés pouvant potentiellement être utilisés pour le radiomarquage à l'astate-211 et à l'iode-125 par voie nucléophile et qui seraient une alternative aux sels de biaryliodonium dont la chimie est déjà bien connue, mais qui possède des limites dont la principale réside dans sa régiosélectivité. Après une recherche des composés utilisés en radiofluoruration, six classes ont été sélectionnées : les biarylsulfoxydes, les biarylsulfones, les sels de triarylsulfonium, les ylures d'aryliodonium, les acides arylboroniques et les esters arylboroniques. Un précurseur de chaque classe a alors été synthétisé, chacun possédant le même substituant *para*-chloro afin de pouvoir être comparés entre eux en radiomarquage. Un sel de biaryliodonium a également été synthétisé afin de pouvoir lui comparer toutes les nouvelles classes explorées et de déterminer si elles représenteraient une bonne alternative. A l'issue de ce travail, trois

classes de précurseurs ont donné des résultats satisfaisant pour le radiomarquage de ces radionucléides, chacun possédant des avantages par rapport aux sels de biaryliodonium : les sels de triarylsulfonium, les ylures d'aryliodonium et les acides arylboroniques. De meilleurs RRCs (quasi quantitatifs) ont notamment été obtenus à l'astate-211 grâce au fait qu'un seul site de substitution ne soit présent pour l'ylure d'aryliodonium et l'acide arylboronique, tandis qu'une meilleure régiosélectivité a été observée avec le sel de triarylsulfonium malgré la présence de trois sites de substitution potentiels. Des résultats tout aussi satisfaisants ont été obtenus avec l'iode-125, sauf avec l'ylure d'aryliodonium pour lequel la réaction de radiomarquage s'est avérée extrêmement limitée. Ce constat témoigne de la différence des propriétés chimiques entre l'iode et l'astate qui conduit parfois à des réactivités différentes.

L'investigation approfondie du radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 de l'ylure d'aryliodonium et du sel de triarylsulfonium a démontré qu'ils pouvaient être de potentiels précurseurs d'intérêts dans le cas de molécules organiques. Cela reste toutefois à confirmer avec les sels de triarylsulfonium en réalisant le radiomarquage d'une large gamme de composés possédants des substituants aux effets électroniques et stériques variés. Cependant, dans tous les cas, les conditions requises pour effectuer le marquage des composés modèles à l'iode-125 et à l'astate-211 *via* ces précurseurs et en particulier leur inefficacité en milieu aqueux, se sont avérées inadaptées pour le radiomarquage direct d'anticorps, ne laissant que les acides arylboroniques comme dernière possibilité pour cette application.

Les acides arylboroniques ont par conséquent été utilisés dans la deuxième partie de la thèse, qui visait à réaliser le radiomarquage direct d'anticorps par voie nucléophile. La radiohalogénéation catalysée au cuivre à l'iode-125 et à l'astate-211 *via* ce type de précurseurs a été rapporté comme efficace, avec des RRCs élevés sur un large nombre de substrats à basse température²¹⁰. Cependant, les réactions de radiomarquages décrites s'effectuent toujours en milieu organique dénaturant pour les protéines. Récemment, une étude portant sur la radiobromation a montré que la réaction pouvait tolérer jusqu'à 50 % d'eau, bien qu'un chauffage jusqu'à 80 °C soit nécessaire²⁸⁵.

Le travail préliminaire en ¹²⁵I-radioiodation et ²¹¹At-astatation sur l'acide 4-chlorobenzène boronique **6** a montré que la réaction pouvait s'effectuer en milieu aqueux à basse température avec des RRCs élevés grâce à l'ajout d'un ligand, la 1,10-phénantroline, rapportée comme améliorant ce type de réactions^{209,210}. Une fois ces conditions adaptées aux protéines, cette chimie a pu être transférée sur deux anticorps : un anti-CD22 et un anti-CD138 (9E7.4). Dans les deux cas, des RRCs supérieurs à 90 % ont pu être obtenus avec les deux radiohalogènes. Il est à noter que les conditions optimales diffèrent entre les deux anticorps, ce qui indique qu'un travail d'optimisation sera

systématiquement nécessaire lorsque cette technologie sera appliquée à un nouveau vecteur. Les études de biodistribution menées sur le 9E7.4 radiomarké à l'iode-125 et à l'astate-211 *via* la voie des acides boroniques, comparées avec la méthode classique en deux étapes qui consiste à réaliser la synthèse du [¹²⁵I]SIB ou du [²¹¹At]SAB qui sont ensuite couplés à l'anticorps, ont montré des profils identiques, avec une accumulation à la tumeur élevée. Cela a démontré que la nouvelle procédure de radiomarquage développée au cours de cette thèse n'altère pas les propriétés pharmacocinétiques de l'anticorps, ni sa capacité à reconnaître sa cible.

Les méthodes de radiomarquage de protéines en une étape présentent de nombreux avantages par rapport au radiomarquage en deux étapes, notamment en terme de gain de temps, de rendements et d'une plus grande facilité à être automatisée. Cependant le risque que présente ce type d'approche réside dans le fait que l'halogène libre est mis en contact avec la protéine, ce qui peut dans certains cas conduire à un couplage sur d'autres sites que la fonction de radiomarquage ciblée (couplage non-spécifique). Cela conduit alors à une liaison faible entre la protéine et l'halogène, ce qui entraîne sa dissociation *in vivo* et une toxicité dans ses organes cibles. C'est notamment la raison pour laquelle les autres méthodes de radiomarquage direct d'anticorps existantes, que ce soit la méthode développée par Lindgren basée sur la formation d'une liaison carbone-astate²⁶⁵ ou celle de Wilbur qui utilise des cages de bores²⁴⁰, bien qu'efficaces pour le radiomarquage à l'astate-211, ne sont pas applicable à l'iode car elles demandent toutes deux l'halogène sous sa forme électrophile. Or, l'iode sous sa forme I⁺ peut réagir de manière compétitive avec les tyrosines et les histidines présentes sur les anticorps, ce qui résulte en une liaison facilement dissociable *in vivo*³²⁰. L'iode-123 et l'iode-124 sont des radionucléides utilisés en imagerie. Cette incompatibilité d'application de ces méthodes de radiomarkages avec les radioisotopes de l'iode est un frein au développement d'outils théranostiques basés sur des anticorps en utilisant la paire ^{123,124}I/²¹¹At. Le concept des pharmaceutiques radiothéranostiques est basé sur l'utilisation d'un composé unique pour réaliser l'imagerie et la thérapie³²¹. Dans le cas idéal, l'agent utilisé pour le diagnostic et la thérapie sont chimiquement identiques et sont deux radioisotopes du même élément. On peut citer dans ce cas le couple ⁶⁴Cu/⁶⁷Cu (⁶⁴Cu utilisé pour l'imagerie TEP et le ⁶⁷Cu utilisé pour la thérapie β⁻) ou encore le couple ¹²³I/¹³¹I (l'¹²³I pour l'imagerie TEMP et l'¹³¹I pour la thérapie β⁻). L'imagerie TEP permet notamment de quantifier, ce qui permet de prédire la dose qui sera délivrée à chaque tissu du patient lors de l'injection du radioisotope thérapeutique. Lorsqu'une paire thérapeutique n'est pas disponible avec le même élément, les agents d'imagerie et de thérapie doivent provenir d'éléments le plus proches possibles chimiquement. Dans ce cas-ci, on peut citer la paire ⁶⁸Ga/¹⁷⁷Lu (⁶⁸Ga utilisé en imagerie TEP et ¹⁷⁷Lu en thérapie β⁻)³²², ou encore ^{99m}Tc/¹⁸⁸Re (^{99m}Tc utilisé en scintigraphie et ¹⁸⁸Re en thérapie β⁻)³²³. Dans le cas de l'astate, un couple théranostique pourrait être envisagé avec ²⁰⁹At/²¹¹At, l'astate-209 (t_{1/2} =

5,41 h) pouvant être utilisé en imagerie TEMP³²⁴. Cependant ce radioisotope n'est à ce jour pas une option viable de par son manque de disponibilité et son mode de production complexe. C'est pourquoi les radioisotopes de l'iode lui sont préférés car accessibles dans le commerce. Par ailleurs, des développements sur cette paire théranostique sont actuellement en cours³²⁵.

La méthode développée au cours de cette thèse va pouvoir s'ajouter au développement théranostique basé sur la paire ^{123,124}I/²¹¹At car il s'agit de la première radiosynthèse divergente en une étape partant d'un anticorps commun applicable avec l'iode radioactif et l'astate-211. De plus, l'étude de stabilité de l'anticorps 9E7.4 conjugué à l'acide arylboronique a démontré que l'immunoconjugué pouvait être conservé pendant plus d'un an dans son tampon de radiomarquage à 4 °C ou – 18 °C sans altération du RRCs à l'iode-125 et à l'astate-211 et sans diminution de son immunoréactivité. Cela pourra permettre la création de kits « prêts à l'emploi », un autre point qui permettra de faciliter l'arrivée de cette technologie, ainsi que de l'astate-211, en clinique.

Les immunoréactivités obtenues dans notre cas ont par ailleurs été préservées, ce qui montre que peu de greffons se sont fixés sur les zones de reconnaissances de l'anticorps lors du couplage de l'acide arylboronique sur ce dernier, dû au faible nombre d'équivalents utilisé. Ce couplage s'effectuait sur les lysines, qui sont présentes en large nombre sur les anticorps, même sur les zones de reconnaissances. Afin de limiter le risque de greffer à ces endroits-là, des approches de couplages sites-spécifiques pourraient être envisagées. Ces méthodes sont nombreuses et permettent de faire des modifications sur différents groupements de la protéine de façon sélective³²⁶. Certains sels de diazonium porteurs de substituants électroattracteurs en position *para* peuvent par exemple réagir de façon chimiosélective sur les tyrosines^{327,328}. Des méthodes métallo-catalysées ont également vu le jour avec des complexes de palladium, rhodium ou encore iridium capables de réagir à basse température et en milieu aqueux³²⁶. Les méthodes de modifications de protéines par voie enzymatique sont également utilisées³²⁹, par exemple avec la Sortase A qui a été utilisée pour des couplages en N-terminal³³⁰ ou en C-terminal³³¹ de protéines. Ces approches site-spécifique peuvent être utilisées pour l'introduction de groupement bioorthogonaux, comme ceux issus de la chimie click.

Cette nouvelle méthode a apporté une optimisation conséquente du radiomarquage d'anticorps à l'astate-211 : une meilleure A_s a été obtenue, ainsi que de meilleurs rendements radiochimiques et radioactifs en plus d'un gain de temps considérable, ce qui est un paramètre important dans le cas de l'astate-211 qui a un temps de demi-vie relativement court. Des améliorations pourraient toutefois être apportées, notamment au niveau de la purification du radioimmunoconjugué au cours de laquelle entre 15 et 25 % de l'anticorps est généralement perdu.

Cette nouvelle approche amène la chimie de radiomarquage à l'astate-211 *via* la formation d'une liaison carbone-astate au maximum de ses capacités. Cependant le travail dédié à ce radionucléide n'est pas terminé et de nombreux aspects restent encore à être découverts. Par exemple, ce n'est que récemment que son affinité électronique a pu être déterminée⁸⁵. En ce qui concerne sa chimie et plus précisément son utilisation pour le radiomarquage de protéines, des améliorations pourraient être apportées, notamment au niveau de la stabilité de la liaison entre l'astate-211 et son vecteur qui peut dans certains cas s'avérer trop faible *in vivo*. Ce phénomène de désastatation peut notamment se montrer important dans le cas de vecteurs de petites tailles aux pharmacocinétiques rapides et plus rapidement métabolisés, tels que des fragments Fab'¹⁷⁵, F(ab')₂^{216,223} ou des peptides²²² lorsqu'ils sont internalisés dans les cellules ciblées. La désastatation reste toutefois limité dans le cas des anticorps entiers faiblement internalisés. Cela a d'ailleurs été retrouvé au cours de nos études de biodistributions du 9E7.4 radiomarké à l'astate-211, où seulement une faible accumulation a été observée dans les organes cibles de l'astate libre (la thyroïde, la rate, les poumons et les reins). La modification du groupement prosthétique serait un bon moyen d'augmenter la stabilité de la liaison et ainsi de limiter ce phénomène. Une meilleure stabilité *in vivo* d'un nanobody radiomarké à l'astate-211 a été rapportée grâce à l'utilisation du SAGMB comme groupement prosthétique²³¹, ce qui serait une piste éventuelle d'amélioration. D'autres approches développées se basent sur une alternative de la liaison carbone-astate. Les cages de bore sont notamment un moyen extrêmement prometteur mais ne peuvent pas être appliquées systématiquement en raison de la lipophilie de ce type de précurseur qui entraîne une modification du profil pharmacocinétique du vecteur^{240,241}. La formation de liaisons métal-astate *via* des complexes de rhodium ou d'iridium est également une voie au fort potentiel^{243,247} et sera l'objet de futures investigations prochainement au laboratoire.

L'astate-211 a été découvert il y a de cela 80 ans et pourtant, de nombreux aspects restent encore à être explorés. La multiplication des sites de productions et des publications à son sujet sont le témoin de la volonté de la communauté scientifique d'approfondir ses connaissances sur ce radionucléide qui renferme encore bien des mystères. Le véritable engouement de ces dix dernières années pour l'astate-211 nous promet de grandes avancées dans l'avenir proche, aussi bien sur la compréhension de ses propriétés physiques que sur le développement de sa chimie, le rapprochant petit à petit d'une utilisation en clinique.

Partie Expérimentale

I. Synthèse organique

I.1. Informations générales

Produits commerciaux :

Les réactifs commerciaux ont été obtenus chez Sigma-Aldrich (Merck), Fluorochem et Tokyo Chemical Industry (TCI).

Solvants :

Les solvants ont été obtenus chez Biosolve et ThermoFischer. Lorsqu'ils sont précisés anhydres dans les protocoles, les solvants ont été obtenus chez Sigma-Aldrich (Merck).

Spectroscopie RMN :

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés avec des spectromètres Bruker AC à 400 MHz (^1H) et 100 MHz (^{13}C). Les déplacements chimiques des spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été rapportés en partie par million (ppm) relatifs au signal des protons ou des carbones résiduels des solvants CDCl_3 (δ = 7,26 (^1H) et 77,23 (^{13}C)), DMSO-d_6 (δ = 2,50 (^1H) et 39,51 (^{13}C)). Les constantes de couplage sont données en Hertz (Hz) et se réfèrent aux multiplicités apparentes indiquées par les abréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), dd (doublet de doublet), dt (doublet de triplet), m (multiplet).

Chromatographies :

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de silice 60 F254 sur support plastique fournies par Sigma-Aldrich (Merck) et ont été révélées par lampe UV (254 nm).

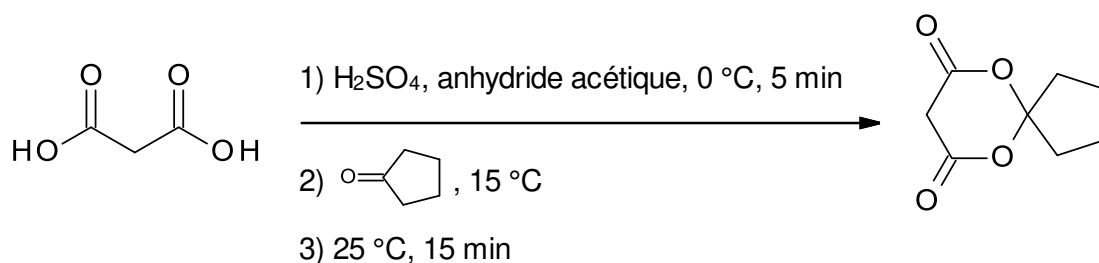
Les purifications sur colonnes ont été réalisées avec un appareil Puriflash 600 (Interchim) avec des colonnes de silices de 30 μm .

Les chromatographies liquides haute performance (HPLC) ont été effectuées sur un appareil HPLC Waters Alliance e2695 équipé d'une colonne C-18 (Spherisorb ODS2 5 μm , 4,6 mm x 25 cm, Waters) avec un débit réglé à 1,50 mL/min et le gradient suivant : t = 0 : 60 % A, 40 % B ; t = 15 min : 100 % B jusqu'à 20 minutes avec A = H_2O (0,05 % TFA) et B = ACN (0,05 % TFA).

I.2. Synthèses organiques

I.2.1. Composés auxiliaires

6,10-Dioxaspiro[4.5]décane-7,9-dione (**12**)

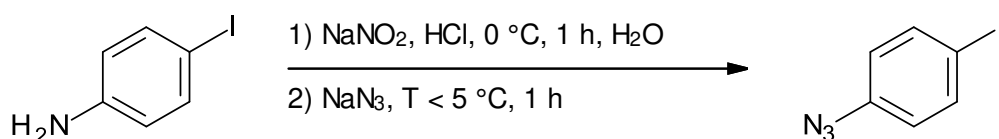


L'acide malonique (4,16 g, 0,04 mol, 1 eq) est mis en suspension dans l'anhydride acétique (3,76 mL, 0,04 mol, 1 eq). La solution est refroidie à 0 °C puis l'H₂SO₄ concentré (16 gouttes) est ajouté. La réaction est agitée 5 min à 0 °C. Le milieu est ensuite ramené à 15 °C, puis la cyclopentanone (3,56 mL, 0,04 mol, 1 eq) est ajoutée goutte à goutte. La réaction est agitée 15 min à 25 °C puis le mélange est placé la nuit à - 20 °C. Le solide obtenu est filtré puis rincé avec Na₂CO₃ 1 M froid pour donner le composé **12** (2,82 g, 41 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,55 (s, 2H) ; 2,14 (m, 4H) ; 1,83 (m, 4H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 164,2 ; 110,2 ; 57,0 ; 37,3 ; 23,3.

1-Azido-4-iodobenzène (**17**)

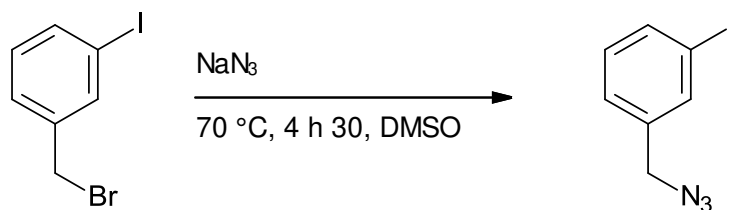


La synthèse de l'iodoaryle **17** a été réalisée suivant la procédure déjà décrite²⁹¹. A une suspension de 4-iodoaniline (1 g, 4,6 mmol, 1,0 eq) dans l'eau (10 mL) et HCl concentré (10 mL) est ajouté goutte à goutte sous vive agitation à $0\text{ }^\circ\text{C}$ une solution de NaNO_2 (441 mg, 6,4 mmol, 1,4 eq) dans l'eau (20 mL). La réaction est agitée 1 h à $0\text{ }^\circ\text{C}$. Une solution de NaN_3 (683 mg, 10,5 mmol, 2,3 eq) dans l'eau (20 mL) est ajoutée goutte à goutte à $0\text{ }^\circ\text{C}$. La réaction est agitée 1 h à une température inférieure à $5\text{ }^\circ\text{C}$. La solution est extraite au CH_2Cl_2 (3 x 40 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées à l'eau (3 x 80 mL), séchées sur MgSO_4 , puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (heptane) pour obtenir le composé **17** sous la forme d'un liquide marron (887 mg, 79 %).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,73 – 7,60 (m, 2H) ; 6,87 – 6,75 (m, 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 140,2 ; 138,9 ; 121,3 ; 88,4 ; 77,2.

1-(Azidométhyl)-3-iodobenzène (**18**)



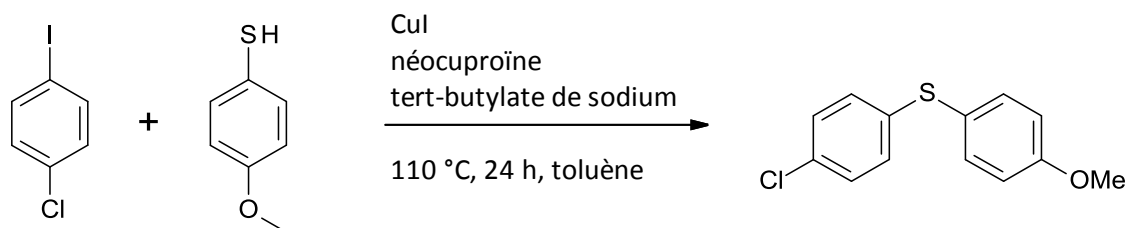
La synthèse de l'iodoaryle **18** a été réalisée suivant la procédure déjà décrite²⁹¹. A une solution de 1-(bromométhyl)-3-iodobenzène (1 g, 3,37 mmol, 1 eq) dans du DMSO anhydre (30 mL) est ajouté du NaN_3 (876 mg, 13,5 mmol, 4 eq). La réaction est agitée 4 h 30 à 70°C sous argon. De l'eau (30 mL) est ajoutée et la phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 (2 x 30 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 , puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (heptane) pour obtenir le composé **18** sous la forme d'un liquide incolore (723 mg, 83 %).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,76 – 7,62 (m, 2H) ; 7,29 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H) ; 7,12 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H) ; 4,30 (s, 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 137,9 ; 137,6 ; 137,2 ; 130,7 ; 127,5 ; 94,8 ; 54,1.

I.2.2. Diarylthioéther

1-chloro-4-[(4-méthoxyphényl)sulfanyl]benzène (10)



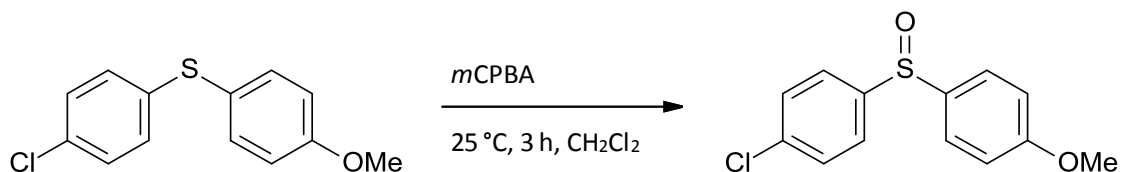
La synthèse du diarylthioéther **10** a été réalisée suivant la procédure décrite par *Barbosa et al*²⁸⁰. Dans un ballon tricol sous agitation magnétique sont ajoutés le 1-chloro-4-iodobenzène (1 g, 4,19 mmol, 1 eq), le *tert*-butylate de sodium (606 mg, 6,31 mmol, 1,5 eq), l'iodure de cuivre (I) (79 mg, 0,419 mmol, 0,1 eq) et la néocuproïne (87 mg, 0,419 mmol, 0,1 eq). Le tricol est fermé hermétiquement par des septums et placé sous argon. Le 4-méthoxybenzèneshthiol (606 mg, 4,32 mmol, 1,03 eq) et 6 mL de toluène sont ajoutés. La réaction est agitée 24 h à 110 °C. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Heptane/AcOEt 95/5) pour obtenir le produit **10** sous la forme d'un liquide incolore qui cristallise après une nuit à – 18 °C (705 mg, 67 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,46 – 7,39 (m, 2H) ; 7,25 – 7,18 (m, 2H) ; 7,13 – 7,06 (m, 2H) ; 6,96 – 6,89 (m, 2H) ; 3,84 (s, 3H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 160,0 ; 137,3 ; 135,4 ; 131,6 ; 129,3 ; 129,0 ; 123,8 ; 115,1 ; 55,3.

I.2.3. Biarylsulfoxyde

1-chloro-4-[(4-méthoxyphényl)sulfinyl]benzène (2)



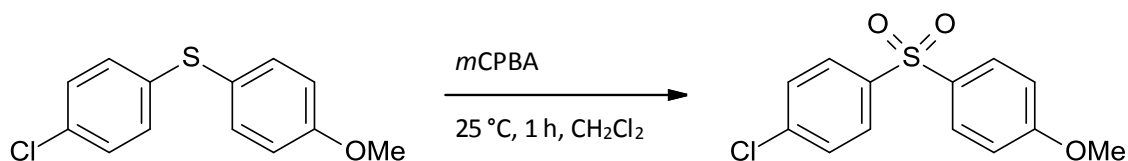
La synthèse du biarylsulfoxyde **2** a été réalisée suivant la procédure décrite par Barbosa *et al*²⁸⁰. A une solution de **10** (150 mg, 0,60 mmol, 1 eq) dans du CH_2Cl_2 (20 mL) est ajouté du *m*CPBA 77 % (134 mg, 0,60 mmol, 1 eq). La réaction est agitée pendant 3 h à 25 °C. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Heptane/ CHCl_3 65/35) pour obtenir **10** sous la forme d'un liquide incolore qui cristallise après une nuit à 4 °C (132 mg, 83 %).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,62 – 7,52 (m, 4H) ; 7,48 – 7,41 (m, 2H) ; 7,04 – 6,94 (m, 2H) ; 3,83 (s, 3H).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 162,2 ; 144,4 ; 136,9 ; 136,4 ; 129,4 ; 127,2 ; 125,9 ; 114,9 ; 55,5.

I.2.4. Biarylsulfone

1-chloro-4-[(méthoxyphényl)sulfonyl]benzène (3)



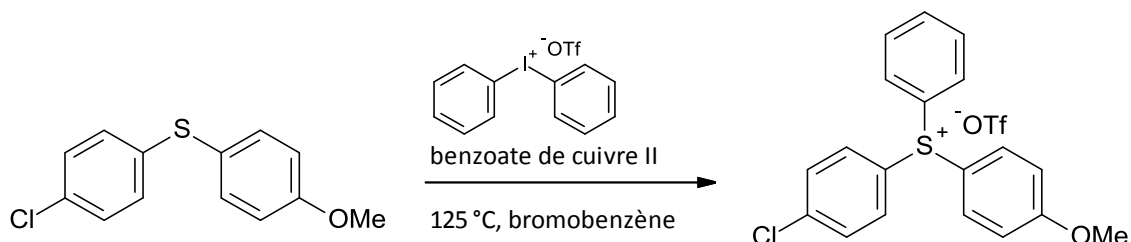
La synthèse de la biarylsulfone **3** a été réalisée suivant la procédure décrite par Barbosa *et al*²⁸⁰. A une solution de **10** (150 mg, 0,60 mmol, 1 eq) dans du CH_2Cl_2 (7 mL) est ajouté du *m*CPBA 77 % (268 mg, 1,6 mmol, 2 eq). La réaction est agitée pendant 1 h à 25 °C. Une solution de KOH est ajoutée puis la phase organique est extraite, séchée sur MgSO_4 et évaporée sous pression réduite pour obtenir **3** sous la forme d'un solide blanc (165 mg, 98 %).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,62 – 7,52 (m, 4H) ; 7,48 – 7,41 (m, 2H) ; 7,04 – 6,94 (m, 2H) ; 3,83 (s, 3H)

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 163,5 ; 140,9 ; 139,4 ; 132,6 ; 129,8 ; 129,5 ; 128,7 ; 114,6 ; 55,7.

I.2.5. Sel de triarylsulfonium

Triflate de 1-(4-chlorophényl)-1-(4-méthoxyphényl)-1-phényl-3-(trifluorométhyl)-1λ⁴-dithioxane-3,3-dioxide (**4**)



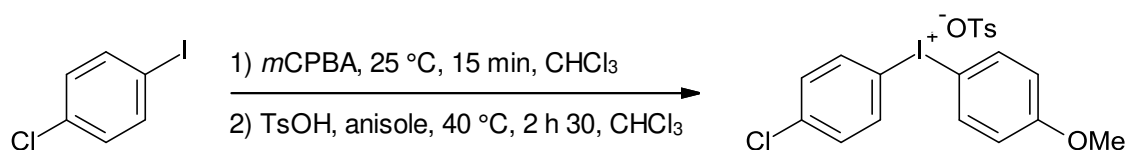
La synthèse du sel de triarylsulfonium **4** a été réalisée suivant la procédure décrite par Barbosa *et al*²⁸¹. A une solution de **10** (100 mg, 0,40 mmol, 1 eq) dans du bromobenzène (10 mL) sont ajoutés le triflate de biphenyle iodonium (172 mg, 0,40 mmol, 1 eq) et le benzoate de cuivre (II) (6,5 mg, 0,40 mmol, 1 eq). La réaction est agitée à 125 °C pendant plusieurs heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite. L'huile obtenue est lavée par de l'éther diéthylique (3 x 10 mL). Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 92/8) pour obtenir **4** sous la forme d'une huile orange (146 mg, 77 %).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,90 – 7,73 (m, 10 H) ; 7,38 – 7,28 (m, 3H) ; 3,88 (s, 3 H).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 164,0 ; 139,2 ; 134,1 ; 133,9 ; 132,5 ; 131,2 ; 131,1 ; 121,1 ; 130,8 ; 126,0 ; 125,0 ; 116,9 ; 113,8 ; 56,1.

I.2.6. Sel de biaryliodonium

Tosylate de (4-chlorophényl)(4-méthoxyphényl)iodonium (**1**)



La synthèse du sel de biaryliodonium **1** a été réalisée suivant une procédure générale décrite par Guérard *et al*¹⁸⁵. A une solution de 1-chloro-4-iodobenzène (300 mg, 1,26 mmol, 1,0 eq) dans du CHCl₃ (13 mL) est ajouté du *m*CPBA 77 % (336 mg, 1,5 mmol, 1,2 eq). La réaction est agitée 15 min à 25 °C. Le TsOH (285 mg, 1,5 mmol, 1,2 eq) et l'anisole (739 µL, 6,8 mmol, 5,4 eq) sont ajoutés et la réaction est agitée 2 h 30 à 40 °C. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le solide jaune obtenu est cristallisé en MeOH/Et₂O. Le produit **1** est récupéré par filtration et est rincé à l'Et₂O froid (411 mg, 63 %).

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 8,22 (m, 4H) ; 7,64 (dd, *J* = 8,6 ; 3,4 Hz, 2H) ; 7,50 (dd, *J* = 8,0 ; 3,3 Hz, 2H) ; 7,12 (m, 4H) ; 3,83 (s, 3H) ; 2,32 (s, 3H)

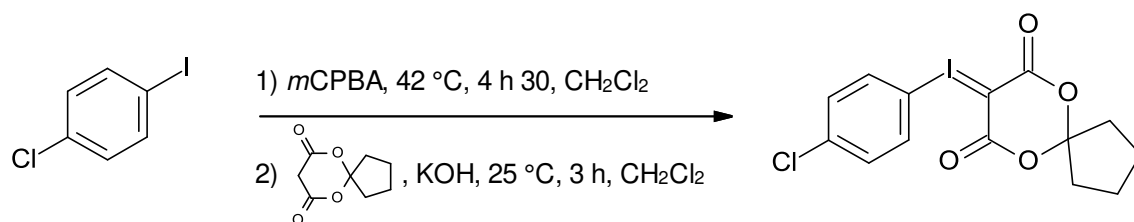
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 163,0 ; 146,8 ; 138,4 ; 138,2 ; 138,1 ; 137,5 ; 132,5 ; 128,9 ; 126,4 ; 118,4 ; 115,8 ; 101,6 ; 56,6 ; 21,1

I.2.7. Ylures d'aryliodonium

Sauf indiqué, les ylures d'aryliodonium sont synthétisés suivant la procédure décrite par Cardinal *et al*²⁷⁵.

A une solution d'iodoaryle correspondant (1,0 eq) dans du CH₂Cl₂ (3 mL) est ajouté du *m*CPBA 77 % (1,1 eq). La réaction est scellée et agitée 4 h 30 à 42 °C. **12** (1,3 eq) est dissous dans du CH₂Cl₂ (3 mL) puis est ajouté à la réaction avec du KOH (7,2 eq). La solution est recouverte de papier aluminium et est agitée 3 h à 25 °C. Le résidu obtenu est filtré sur célite, puis rincé au CH₂Cl₂. Le filtrat est évaporé sous pression réduite, puis le solide blanc obtenu est agité 30 min à 25 °C dans l'heptane (10 mL). Le solide est filtré puis cristallisé en acétone/heptane. Le produit final est récupéré par filtration.

8-[(4-chlorophényl)- λ^3 -iodanylidène]-6,10-dioxaspiro[4.5]décane-7,9-dione (5)



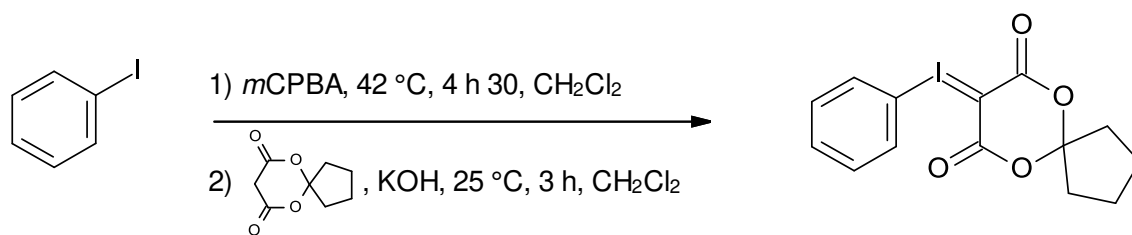
Rendement : 27 %

Aspect : Solide blanc

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,84 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H) ; 7,41 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H) ; 2,20 – 2,11 (m, 4H) ; 1,84 – 1,76 (m, 4H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 164,3 ; 139,2 ; 134,7 ; 132,0 ; 114,2 ; 110,9 ; 57,3 ; 37,3 ; 23,3

8-phényl- λ^3 -iodanylidène]-6,10-dioxaspiro[4.5]décane-7,9-dione (**23**)



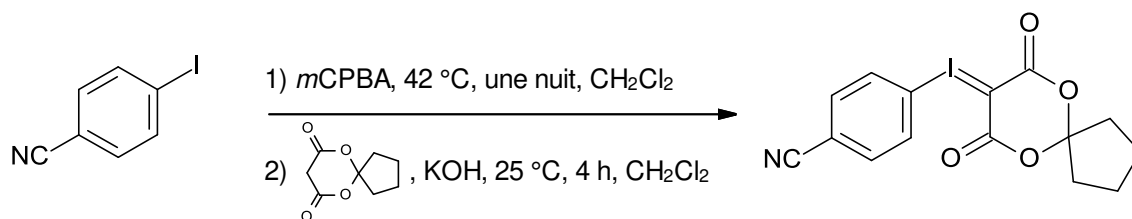
Rendement : 43 %

Aspect : Solide blanc

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,89-7,83 (m, 2H) ; 7,57 (dt, *J* = 7,1, 1,0 Hz, 1H) ; 7,42 (dt, *J* = 7,8, 2,1, 2H) ; 2,19 – 2,11 (m, 4H), 1,83 – 1,75 (m, 4H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) 164,5 ; 133,5 ; 132,4 ; 132,2 ; 114,4 ; 114,2 ; 57,0 ; 37,6 ; 23,6

8-[(4-cyanophényl)- λ^3 -iodanylidène]-6,10-dioxaspiro[4.5]décane-7,9-dione (28)



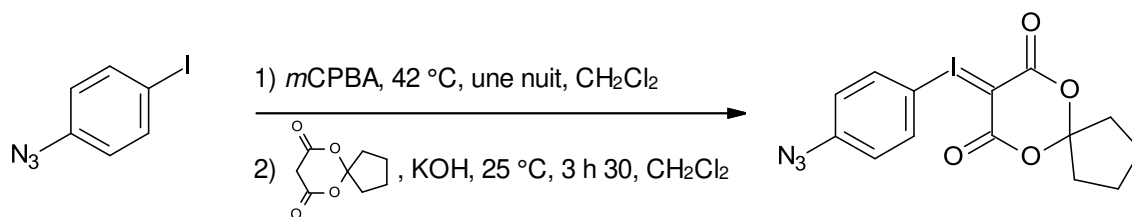
Rendement : 16 %

Aspect : Solide blanc

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,98 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H) ; 7,72 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 2,17 (t, *J* = 7,4 Hz, 4H) ; 1,87-1,76 (m, 4H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 164,4 ; 135,2 ; 133,7 ; 118,1 ; 116,8 ; 116,7 ; 114,8 ; 57,2 ; 37,7 ; 23,6.

8-[(4-azidophényl)-λ³-iodanylidène]-6,10-dioxaspiro[4.5]décane-7,9-dione (24)



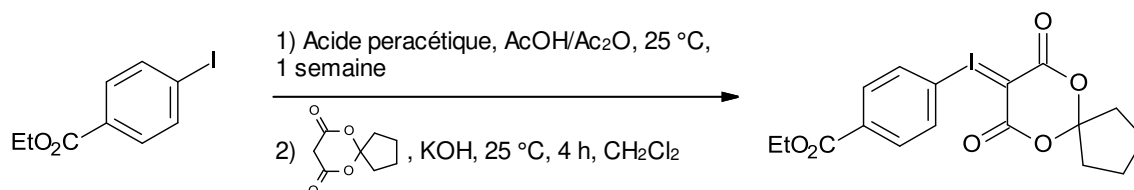
Rendement : 18 %

Aspect : Solide blanc

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,88 (d, J = 8,9 Hz, 2H) ; 7,05 (d, J = 8,9 Hz, 2H) ; 2,20 – 2,08 (m, 4H) ; 1,84 – 1,73 (m, 4H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 164,5 ; 145,2 ; 135,9 ; 122,5 ; 114,4 ; 107,5 ; 57,9 ; 37,6 ; 23,6.

8-[(4-éthoxycarbonyl)benzyl- λ^3 -iodanylidène]-6,10-dioxaspiro[4.5]décane-7,9-dione (**31**)

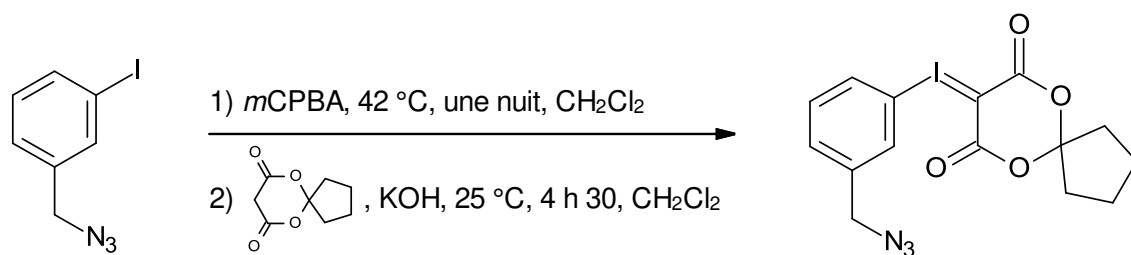


A une solution de 4-iodobenzoate d'éthyle (333 μ L, 2 mmol, 1 eq) dissous dans un mélange d'AcOH/Ac₂O 1/1 (3,4 mL) est ajouté goutte à goutte l'acide peracétique 39 % (7 mL). La solution est ramenée à 25 °C et est agitée une semaine. De l'eau (70 mL) est ajouté et la phase aqueuse est extraite avec du CH₂Cl₂ (3 x 35 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé sous vide et l'huile obtenue est reprise dans l'heptane (7 mL) puis est placée la nuit à -20 °C. Le solide blanc obtenu est récupéré par filtration puis est rincé avec de l'heptane (3 x 7 mL). Le solide est dissous dans du CH₂Cl₂ (3 mL) et **12** (146 mg, 0,9 mmol, 0,5 eq) et KOH (38 mg, 0,7 mmol, 0,4 eq) sont ajoutés et le mélange est agité 4 h à 25 °C. Le solide obtenu est filtré sur célite et est rincé au CH₂Cl₂. Le filtrat est évaporé sous pression réduite, puis le solide blanc obtenu est agité 30 min à 25 °C dans l'heptane (5 mL). Le solide est filtré puis cristallisé en CH₂Cl₂/heptane. **31** est obtenu par filtration sous la forme d'un solide blanc (122 mg, 14 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,06 (d, J = 8,5 Hz, 2H) ; 7,90 (d, J = 8,5 Hz, 2H) ; 4,40 (d, J = 7,1 Hz, 2H) ; 2,16 (t, J = 7,4 Hz, 4H) ; 1,85 – 1,73 (m, 4H) ; 1,40 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 164,9 ; 164,4 ; 134,43 ; 132,9 ; 118,4 ; 114,6 ; 62,1 ; 56,9 ; 37,6 ; 23,6 ; 14,4.

8-[(4-azidométhylphényl)-λ³-iodanylidène]-6,10-dioxaspiro[4.5]décane-7,9-dione (**25**)



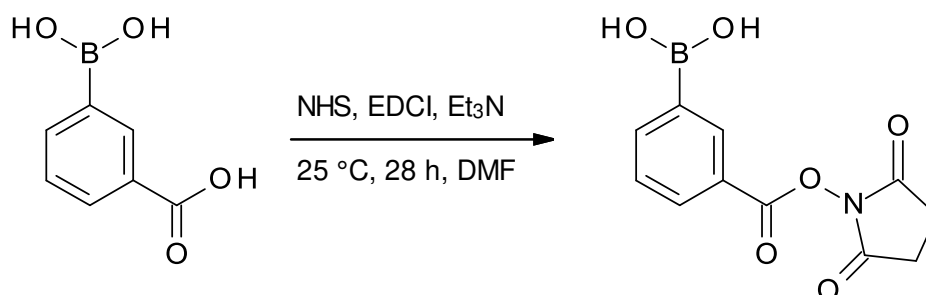
A une solution de 1-(azidométhyl)-3-iodobenzène (**20**) (357 mg, 1,38 mmol, 1,0 eq) dans du CH₂Cl₂ (3 mL) est ajouté du *m*CPBA 77 % (340 mg, 1,52 mmol, 1,1 eq). La réaction est scellée et agitée la nuit à 42 °C. **12** (300 mg, 1,76 mmol, 1,3 eq) est dissous dans du CH₂Cl₂ (3 mL) puis est ajouté à la réaction avec du KOH (550 mg, 9,80 mmol, 7,1 eq). La solution est recouverte de papier aluminium et est agitée 4 h 30 à 25 °C. Le résidu obtenu est filtré sur célite, puis rincé au CH₂Cl₂. Le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (heptane/acétone 80/20 => 65/35) pour obtenir le composé **25** sous la forme d'une huile jaune (89 mg, 15 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,90 – 7,79 (m, 2H) ; 7,52 (d, J = 7,7 Hz, 1H) ; 7,49 – 7,39 (m, 1H) ; 4,42 (s, 2 H) ; 2,21 – 2,10 (m, 4H) ; 1,89 – 1,74 (m, 4H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 164,5 ; 140,3 ; 133,1 ; 132,5 ; 132,4 ; 131,7 ; 114,5 ; 114,4 ; 57,1 ; 53,8 ; 37,6 ; 23,6.

I.2.8. Acide arylboronique

Acide (3-(((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)phényl)boronique (**40**)



A une solution d'acide 3-(dihydroxyboryl)benzoïque (500 mg, 3,01 mmol, 1,0 eq) dans du DMF anhydre (25 mL) sont ajoutés la triéthylamine (3,78 mL, 27,1 mmol, 9 eq), EDCI (866 mg, 4,52 mmol, 1,5 eq) et la *N*-hydroxysuccinimide (520 mg, 4,52 mmol, 1,5 eq). La réaction est agitée 28 h à 25 °C. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris dans du CH₂Cl₂. De l'acide chloridrique 1 N (100 mL) est ajouté et la phase aqueuse est extraite avec du CH₂Cl₂ (7 x 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 100/0 => 98,5/1,5). Le solide blanc obtenu est ensuite cristallisé en MeOH/H₂O pour obtenir le composé **40** sous la forme d'un solide blanc (358 mg, 45 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,53 (s, 1H) ; 8,42 (s, 2H) ; 8,20 (d, J = 7,4 Hz, 1H) ; 8,12 (d, J = 8,0 Hz, 1H) ; 7,63 (t, J = 7,7 Hz, 1H) ; 2,90 (s, 4H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 170,3 ; 162,1 ; 140,9 ; 135,6 ; 131,4 ; 128,6 ; 123,8 ; 25,5.

II. Radiochimie

II.1. Informations générales

II.1.1. Isotopes radioactifs

[¹²⁵I]NaI a été obtenu commercialement auprès de Perkin Elmer dans une solution de NaOH (10⁻⁵ M) avec une activité volumique de 1.85 MBq/μL.

L'²¹¹At a été produit par le cyclotron Arronax en utilisant la réaction nucléaire ²⁰⁹Bi(α,2n)²¹¹At, et récupéré de la cible irradiée dans du chloroforme en utilisant un protocole de distillation sèche adapté de la procédure décrite précédemment par Lindegren et al.⁵² Avant utilisation, la solution d'²¹¹At a été réduite à sec sous un léger courant d'azote.

II.1.2. Analyses chromatographiques

Les analyses de chromatographie liquide haute performance (HPLC) radioactives ont été réalisées sur le même système que les références analytiques non radioactives. En sortie de la cellule de détection UV, l'éluant est redirigé vers un détecteur de radioactivité Flow Star LB 513 (BERTHOLD Technologies). Après chaque analyse HPLC, la colonne est lavée par injection d'une solution de sulfite de sodium à 10 mg/mL (50 μL) afin de retirer toutes les espèces d'astate restant sur la colonne avec le gradient suivant : t = 0 : 100 % A, 0 % B ; t = 5 min, 60 % A, 40 % B jusqu'à 10 minutes avec A = H₂O (0,05 % TFA) et B = ACN (0,05 % TFA). L'activité ressortie lors de ces analyses est prise en compte dans le calcul des RRCs.

Calcul du RRC

La figure 52 illustre l'analyse du RRC d'un radiomarquage à l'astate de l'acide 4-chloroarylboronique **6**. La figure 52A représente l'analyse radioHPLC du produit brut et la figure 52B représente le radiochromatogramme obtenu lors de l'injection de la solution de sulfite à 10 mg/mL. L'activité ressortie lors de ce run a été prise en compte comme de l'astate-211 non radiomarké dans le calcul du RRC. La correction de la décroissance entre les deux injections n'a pas été comptabilisée pour le calcul du RRC car seulement 10 minutes séparaient les deux pics, ce qui est négligeable par rapport au temps de demi-vie de l'astate-211. Dans l'exemple de la figure 52, le RRC obtenu est de 8 % et non de 14 % si l'on considère uniquement le radiochromatogramme A.

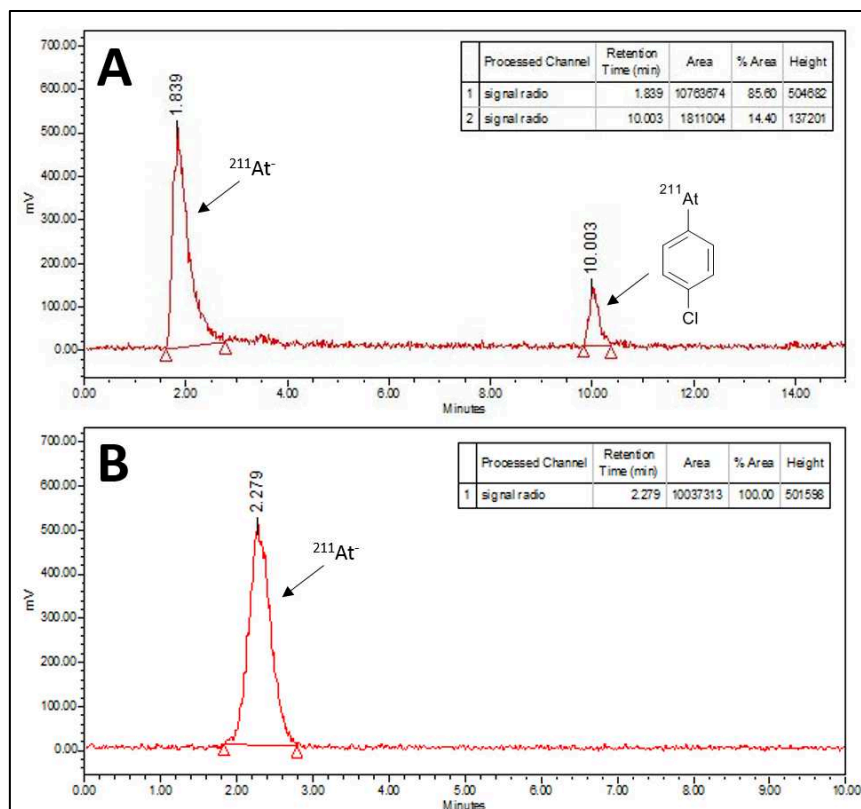


Figure 52. Analyses radioHPLC du radiomarquage à l'astate de **6** à pH 8 ; A) radiochromatogramme du radiomarquage ; B) radiochromatogramme de l'injection de la solution de sulfite réalisé après l'analyse HPLC du radiomarquage.

II.2. Radiomarquages à l'iode-125 et à l'astate-211 des composés organiques

II.2.1. Comparaison des différents précurseurs

Une solution mère de [^{125}I]NaI est préparée par dilution de la solution commerciale dans le l'eau dé-ionisée. La solution mère d'[\$^{211}\text{At}\$]NaAt est préparée par addition d'un volume approprié d'acétonitrile et d'une solution de DTT à 5 mg/mL.

II.2.1.1. Méthode générale avec K222/K₂CO₃ et sans catalyseur

Précurseurs : sel de biaryliodonium **1**, biarylsulfoxyde **2**, sel de triarylsulfonium **4**, ylures d'aryliodonium **5**, **21**, **22**, **23**, **24**, **26**, **27**, **28**, **31**.

100 μL de kryptofix K222 (10 mg/mL, ACN), 2,66 μL de K₂CO₃ (0,5 M, H₂O) et 5 μL de solution mère de [^{125}I]NaI ou de [\$^{211}\text{At}\$]NaAt sont placés dans un flacon de 1,5 mL. Le flacon est serti et le solvant est évaporé sous léger flux d'azote. 250 μL d'ACN sont ajoutés et le solvant est à nouveau évaporé. 250 μL d'ACN sont ajoutés et le solvant est à nouveau évaporé. 100 μL d'une solution de précurseur à la concentration et dans le solvant souhaité sont alors ajoutés. La réaction est incubée à la température requise pendant 30 min. Un échantillon est ensuite dilué dans une solution d'acétonitrile/eau 1/1 (0,05 % TFA) et est analysé par HPLC en phase inverse.

II.2.1.2. Méthode générale avec K222/K₂CO₃ et le catalyseur

Précurseurs : biarylsulfoxyde **2**, biarylsulfone **3**, ylure d'aryliodonium **5**, ester arylboronique **7**, acide arylboronique **6**

100 µL de kryptofix K222 (10 mg/mL, ACN), 2,66 µL de K₂CO₃ (0,5 M, H₂O) et 5 µL de solution mère de [¹²⁵I]NaI ou de [²¹¹At]NaAt sont placés dans un flacon de 1,5 mL. Le flacon est serti et le solvant est évaporé sous léger flux d'azote. 250 µL d'ACN sont ajoutés et le solvant est à nouveau évaporé. 250 µL d'ACN sont ajoutés et le solvant est à nouveau évaporé. 50 µL d'une solution de précurseur et 50 µL de Cu(OTf)₂pyr₄ à la concentration et dans le solvant souhaité sont ajoutés. La réaction est incubée à la température requise pendant 30 min. Un échantillon est ensuite dilué dans une solution d'acétonitrile/eau 1/1 (0,05 % TFA) et est analysé par HPLC en phase inverse.

II.2.1.3. Méthode générale sans K222/K₂CO₃ et sans catalyseur

Précurseurs : sel de biaryliodonium **1**, sel de triarylsulfonium **4**, ylure d'aryliodonium **5**, acide arylboronique **6**

95 µL d'une solution de précurseur à la concentration et dans le solvant souhaité et 5 µL de solution mère de [¹²⁵I]NaI ou de [²¹¹At]NaAt sont placés dans un flacon de 1,5 mL. La réaction est incubée à la température requise pendant 30 min. Un échantillon est ensuite dilué dans une solution d'acétonitrile/eau 1/1 (0,05 % TFA) et est analysé par HPLC en phase inverse.

II.2.1.4. Méthode générale sans K222/K₂CO₃ et avec le catalyseur

Précurseurs : acide arylboronique **6**, ester arylboronique **7**

45 µL d'une solution de précurseur, 50 µL de Cu(OTf)₂pyr₄ à la concentration et dans le solvant souhaité et 5 µL de solution mère de [¹²⁵I]NaI ou de [²¹¹At]NaAt sont placés dans un flacon de 1,5 mL. La réaction est incubée à la température requise pendant 30 min. Un échantillon est ensuite dilué dans une solution d'acétonitrile/eau 1/1 (0,05 % TFA) et est analysé par HPLC en phase inverse.

II.2.2. Radiomarquage de l'acide 4-chlorobenzène boronique **6**

II.2.2.1. Radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 de l'acide 4-chlorobenzène boronique **6** en milieu organique

Une solution mère de [^{125}I]NaI est préparée par dilution de la solution commerciale dans le l'eau dé-ionisée. La solution mère d' [^{211}At]NaAt est préparée par addition d'un volume approprié d'une solution de sulfite de sodium à 1 mg/mL. 70 μL de MeOH, 10 μL de **6** à 2,5 mM en MeOH et 10 μL de $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$ à 100 mM en MeOH sont placés dans un flacon de 1,5 mL et 10 μL de la solution mère de [^{125}I]NaI ou de [^{211}At]NaAt est ajoutée. Le flacon est ensuite laissé à 25 °C pendant 30 min. Un échantillon est ensuite dilué dans une solution d'acétonitrile/eau 1/1 (0,05 % TFA) et est analysé par HPLC en phase inverse.

II.2.2.2. Radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 de l'acide 4-chlorobenzène boronique **6** en milieu aqueux

Une solution mère de [^{125}I]NaI est préparée par dilution de la solution commerciale dans le l'eau dé-ionisée. La solution mère d' [^{211}At]NaAt est préparée par addition d'un volume approprié d'une solution de sulfite de sodium à 1 mg/mL. 75 μL de tampon Tris 0,5 M pH 6, 3 μL de **6** à 8,33 mM en DMF, 8 μL de $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$ à 125 mM en DMF et 4 μL de 1,10-phénantroline à 250 mM en DMF sont placés dans un flacon de 1,5 mL et 10 μL de la solution mère de [^{125}I]NaI ou de [^{211}At]NaAt est ajoutée. Le flacon est ensuite laissé à 25 °C pendant 30 min. Un échantillon est ensuite dilué dans une solution d'acétonitrile/eau 1/1 (0,05 % TFA) et est analysé par HPLC en phase inverse.

II.2.2.3. Exemples d'analyse HPLC de ^{125}I -radioiodation et de ^{211}At -astatation de l'acide 4-chlorobenzène boronique

Les produits de radiomarquages des précurseurs ont été identifiés par analyse HPLC en phase inverse de la référence froide 1-chloro-4-iodobenzène. Comme l'astate et l'iode ont une polarité similaire, la différence de temps de rétention entre le produit astaté et le produit iodé était faible. Les réactions de radioiodation et astatation ont été analysées sur deux systèmes HPLC avec la même configuration, ce qui explique la différence de temps de rétention entre les figures 53 et 54.

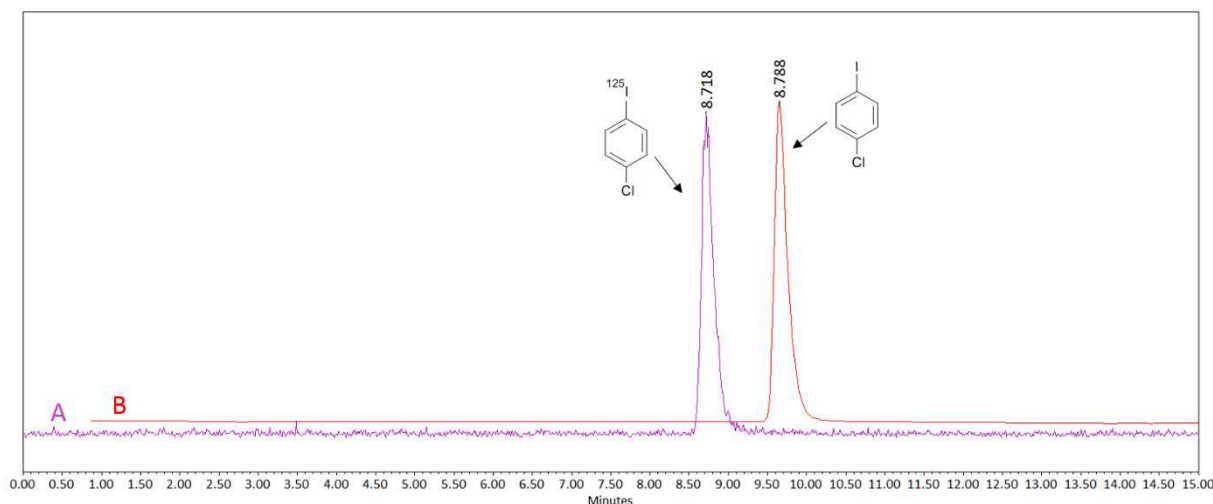


Figure 53. Exemple d'analyse HPLC d'un radiomarquage de **6** avec la référence UV du produit froid A) ^{125}I -radioiodation de **6** ; B) analyse UV (254 nm) de la référence froide pour la radioiodation.

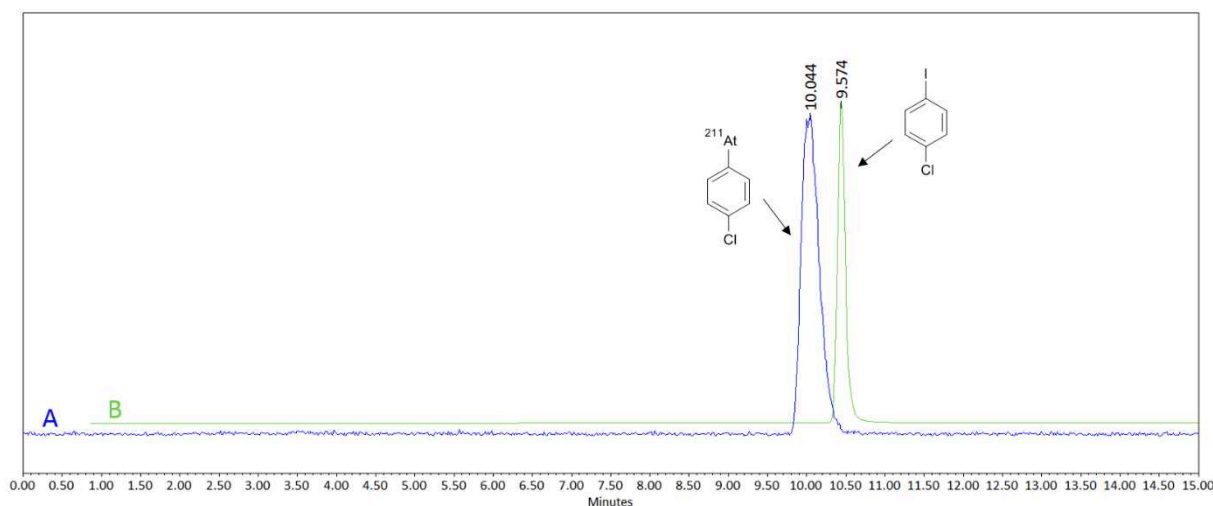


Figure 54. Exemple d'analyse HPLC d'un radiomarquage de **6** avec la référence UV du produit froid A) ^{211}At -astatation de **6** ; B) analyse UV (254 nm) de la référence iodée froide pour l'astatation.

II.2.3. Radiomarquage des sels de biaryliodonium **41** et **42** pour le marquage du **9E7.4** en deux étapes

II.2.3.1. Radiomarquage à l'iode-125 du triflate de 3-(succinimidylloxycarbonyl)phényl(2-thiényl)iodonium (**42**)

Le radiomarquage à l'iode du sel d'iodonium **42** a été fait suivant la méthode reportée par Guérard *et al*¹⁸⁶. Une solution mère de ^{125}I NaI est préparée par dilution de la solution commerciale dans le l'eau dé-ionisée. 190 μL de **42** en ACN (2,5 mM) et 10 μL de ^{125}I NaI sont ajoutés dans un flacon de 1,5 mL. Le flacon est scellé et mit à incuber 1 h à 100 °C. L'analyse HPLC d'un échantillon indique la formation du ^{125}I SIB avec un RRC de 88 %. Le brut réactionnel est ensuite déposé directement sur cartouche de silice Sep-Pak C18 Plus Long 820 mg (Waters). 45 mL d'un mélange ACN/ H_2O 20/80 sont passés, puis le ^{125}I SIB est récupéré par élution de 2 mL d'ACN. 10 mL d' H_2O sont ajoutés puis la

solution est déposée sur une cartouche de silice Sep-Pak C18 Plus Light 130 mg, puis le [^{125}I]SIB est récupéré par élution de 600 μL d'ACN. Après évaporation sous un léger flux d'azote, l'analyse HPLC indique que le [^{125}I]SIB final est obtenu avec une pureté radiochimique > 99 %.

II.2.3.2. Radiomarquage à l'astate-211 du triflate de 3-(succinimidylloxycarbonyl)phényl(4-méthoxyphényl)iodonium (**41**)

Le radiomarquage à l'astate du sel d'iodonium **41** a été fait suivant la méthode reportée par Guérard *et al*¹⁸⁶. Sur l'astate à sec est ajouté 10 μL d'ACN suivi de 10 μL d'une solution de DTT à 10 mg/mL. 180 μL de **41** en ACN (2,5 mM) sont ajoutés. Le flacon est scellé et mis à incuber 30 min à 60 °C. L'analyse HPLC d'un échantillon indique la formation du [^{211}At]SAB avec un RRC de 94 %, les 6 % restant étant de l' [^{211}At]astatoanisole. Le brut réactionnel est ensuite déposé directement sur cartouche de silice Sep-Pak C18 Plus Long 820 mg (Waters). 45 mL d'un mélange ACN/H₂O 20/80 sont passés, puis le [^{211}At]SAB est récupéré par élution de 2 mL d'ACN. 10 mL d'H₂O sont ajoutés puis la solution est déposée sur une cartouche de silice Sep-Pak C18 Plus Light 130 mg, puis le [^{211}At]SAB est récupéré par élution de 600 μL d'ACN. Après évaporation sous un léger flux d'azote, l'analyse HPLC indique que le [^{211}At]SAB final est obtenu avec une pureté radiochimique > 99 %.

II.3. Radiomarquage d'anticorps

II.3.1. Bioconjugaison de l'acide (3-(((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)phényl)boronique (**40**) sur les anticorps

A une solution d'anticorps (anti-CD22 ou anti-CD138) à 5 mg/mL en tampon borate 0,3 M (pH 8,6) est ajouté 50, 25 ou 10 équivalents de **40** dans le DMSO (25 μL). Le couplage est agité 100 min à température ambiante, puis l'acide arylboronique **40** non conjugué est retiré par ultracentrifugation avec un filtre de centrifugation 30 K (Merck) avec le tampon utilisé pour le radiomarquage.

II.3.2. Analyse LC-ESI-HRMS

Les anticorps sont conditionnés en PBS à une concentration de 200 $\mu\text{g/mL}$. Le dessalage et la séparation des anticorps a été réalisée sur un système H-Class UPLC (Waters Corporation, Milford) par injection de 10 μL de solution sur une colonne Acquity® BEH300 C4 (2,1 mm $\times$ 50 mm, 1,7 μm ; Waters) chauffée à 60 °C. La phase mobile est composée de 5 % d'acétonitrile en solvant A et 100 % d'acétonitrile en solvant B, chacune contenant 0,1 % d'acide formique. Le gradient d'élution du solvant B dans le solvant A est réalisé sur 12 min avec un flow constant de 400 $\mu\text{L/min}$ (de 0 à 8 min : le gradient passe de 5 % à 95 % de solvant B, de 8 à 10 min : le solvant B reste constant à 95 %, de 10 à 12 min : le solvant B passe de 95 % à 5 %). La détection des anticorps par spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) a été réalisée par un spectromètre de masse Synapt G2 HRMS Q-TOF équipé avec une interface

Z-Spray pour une ionisation par électrospray (ESI, Waters). Le mode de résolution a été appliqué dans un ratio masse sur charge (m/z) allant de 200 à 4000 avec une résolution de masse de 25 000 sur la largeur totale et la moitié du maximum dans le mode d'ionisation positif. Les paramètres d'ionisations étaient les suivants : la tension du capillaire était de 3 kV, la tension au cône de 30 V, le débit de gaz de désolvatation de 900 L/heure, la température de la source était à 120 °C, la température de désolvatation était à 450 °C, le gaz de désolvatation utilisé était le nitrogène. Les données ont été collectées dans le mode continuum à une vitesse de quatre spectres par secondes. Une solution d'enképhaline leucine à 2 µg/mL en acétonitrile/eau (50/50 v/v) a été infusée à un débit constant dans le canal de pulvérisation de verrouillage. Un spectre de 1 s a été obtenu toutes les 10 s et permettait la correction de la masse pendant l'expérimentation. La masse moléculaire expérimentale des molécules ont été déduites de leur différents états de charges obtenus par ESI en utilisant l'extension MaxEnt 1 du logiciel MassLynx® (version 4.1, Waters). Une analyse typique utilisée pour la détermination du nombre d'acide arylboronique par anticorps est donnée sur la figure 55.

Exemple d'une analyse LC-ESI-HRMS

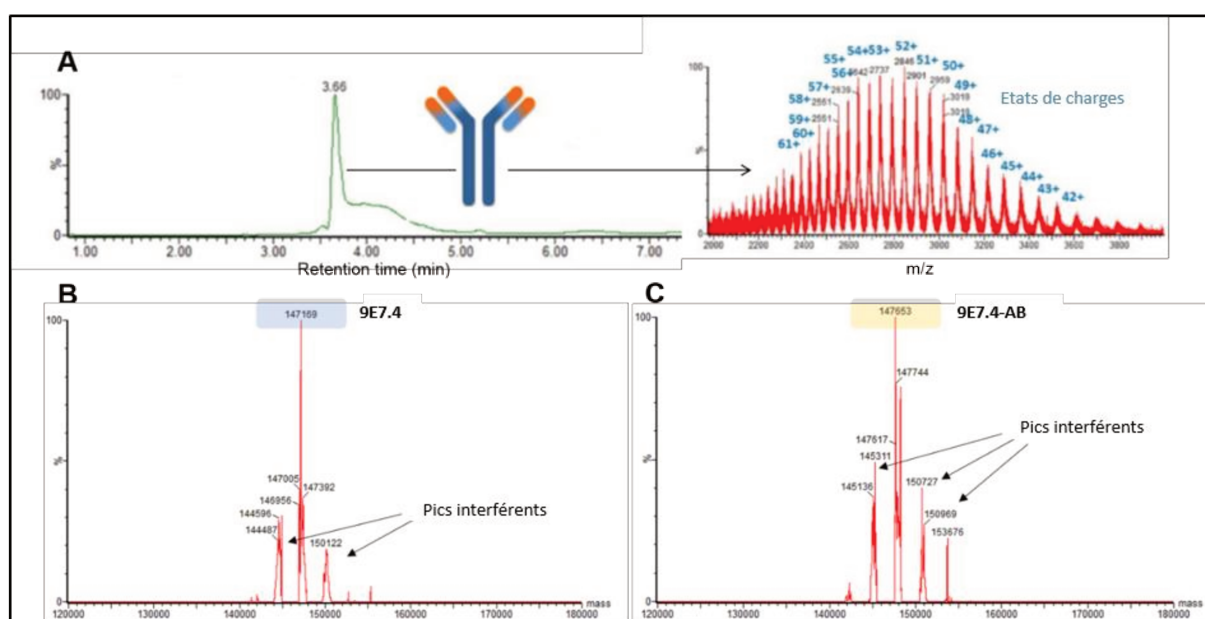


Figure 55. Analyse du 9E7.4 et du 9E7.4-AB par spectrométrie de masse. A) chromatogramme représentatif et spectre de masse associé du 9E7.4, B-C) poids moléculaires calculés du 9E7.4 et du 9E7.4-AB par déconvolution (logiciel MaxEnt1, Waters Corporation) du spectre de masse associé. Dans cet exemple, la différence de masse est de 484 g/mol, ce qui correspond à 3,3 acides arylboroniques par anticorps.

II.3.3. Radiomarquage à l'iode-125 de l'anti-CD22-AB

Une solution mère de [^{125}I]NaI est préparée par dilution de la solution commerciale dans le l'eau dé-ionisée. A une solution d'anti-CD22-AB en tampon tris 0,5 M à pH 6 à une concentration de 6 mg/mL (40 µL) est ajouté 2,5 µL de $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$ en tampon tris 0,5 M pH 6 / DMF (1:1) à 200 mM, 2,5

μL de 1,10-phénantroline en DMF à 200 mM et 5 μL de $\text{Na}[^{125}\text{I}]\text{I}$. Le marquage est agité 30 min à 25 °C. Le rendement de radiomarquage est mesuré par élution d'un échantillon sur ITLC-SG (éluant : MeOH). Le marquage est ensuite purifié sur PD-10 (éluant : PBS) pour obtenir l'anticorps radiomarqué avec une pureté radiochimique > 99 % déterminée par ITLC-SG.

II.3.4. Radiomarquage à l'astate-211 de l'anti-CD22-AB

Une solution de $\text{Na}[^{211}\text{At}]\text{At}$ est préparée en ajoutant 10 μL d'acétonitrile et le même volume de Na_2SO_3 à 0,125 mg/mL sur l'astate sec. A une solution d'anti-CD22-AB en tampon tris 0,5 M à pH 6 à une concentration de 4,5 mg/mL (40 μL) est ajouté 2,5 μL de $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$ en tampon tris 0,5 M pH 6 / DMF (1:1) à 50 mM, 2,5 μL de 1,10-phénantroline en DMF à 50 mM et 5 μL de $\text{Na}[^{211}\text{At}]\text{At}$. Le marquage est agité 30 min à température ambiante. Le rendement de radiomarquage est mesuré par élution d'un échantillon sur ITLC-SG (éluant : MeOH). Le marquage est ensuite purifié sur PD-10 (éluant : PBS) pour obtenir l'anticorps radiomarqué avec une pureté radiochimique > 99 % déterminée par ITLC-SG.

II.3.5. Radiomarquage à l'iode-125 du 9E7.4-AB

Une solution mère de $[\text{I}^{125}]\text{NaI}$ est préparée par dilution de la solution commerciale dans l'eau dé-ionisée. A une solution de 9E7.4-AB en tampon tris 0,5 M à pH 6 à une concentration de 4,5 mg/mL (80 μL) est ajouté 5 μL de $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$ en tampon tris 0,5 M pH 6 / DMF (1:1) à 100 mM, 5 μL de 1,10-phénantroline en DMF à 100 mM et 10 μL de $\text{Na}[^{125}\text{I}]\text{I}$. Le marquage est agité 30 min à température ambiante. Le rendement de radiomarquage est mesuré par élution d'un échantillon sur ITLC-SG (éluant : MeOH). Le marquage est ensuite purifié sur PD-10 (éluant : PBS) pour obtenir l'anticorps radiomarqué avec une pureté radiochimique > 99 % déterminée par ITLC-SG.

II.3.6. Radiomarquage à l'astate-211 du 9E7.4-AB

Une solution de $\text{Na}[^{211}\text{At}]\text{At}$ est préparée en ajoutant 20 μL de Na_2SO_3 à 0,0625 mg/mL sur l'astate sec. A une solution de 9E7.4-AB en tampon tris 0,5 M à pH 6 à une concentration de 2,57 mg/mL (70 μL) est ajouté 5 μL de $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$ en tampon tris 0,5 M pH 6 / DMF (1:1) à 50 mM, 5 μL de 1,10-phénantroline en DMF à 50 mM et 20 μL de $\text{Na}[^{211}\text{At}]\text{At}$. Le marquage est agité 30 min à température ambiante. Le rendement de radiomarquage est mesuré par élution d'un échantillon sur ITLC-SG (éluant : MeOH). Le marquage est ensuite purifié sur PD-10 ou sur Nap-5 (éluant : PBS) pour obtenir l'anticorps radiomarqué avec une pureté radiochimique > 99 % déterminée par ITLC-SG.

II.3.7. Radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 du 9E7.4 via la méthode en deux étapes

La conjugaison du [^{211}At]SAB ou du [^{125}I]SIB est réalisée comme précédemment décrit par *Guérard et al*¹⁸⁶. Le [^{211}At]SAB ou le [^{125}I]SIB (obtenus à partir du sel de biaryliodonium **41** ou **42**, respectivement) à sec dans un flacon à fond conique est dissous dans du DMSO (10 μL) et le 9E7.4 est ajouté (60 μL , 5 mg/mL en tampon borate 0,3 M, pH 8,6). Après 30 minutes d'incubation à 20 °C, le rendement de couplage est déterminé par élution d'un échantillon déposé sur ITLC-SG (MeOH en éluant) et par intégration de la plaque en utilisant un scanner Cyclone Phosphorimager (Perkin Elmer). Le rendement de conjugaison obtenu est de 71 % à l'iode-125 et de 46 % à l'astate-211. La purification est réalisée par gel filtration sur une colonne Sephadex G-25 chargée avec une résine (PD-10, GE healthcare) en utilisant du PBS comme éluant. L'anticorps radiomarqué est alors obtenu avec une pureté radiochimique de 99 % pour le radiomarquage à l'iode et 97 % pour le radiomarquage à l'astate (déterminé par ITLC-SG). L'immunoréactivité est préservée, avec 93 % obtenu à l'iode-125 et 81 % obtenu à l'astate-211. La procédure complète de radiomarquage comprenant la synthèse du [^{125}I]SIB ou du [^{211}At]SAB, puis le couplage à l'anticorps a conduit à un RRC de 23 % à l'iode-125 et 20 % à l'astate-211.

III. Immunoréactivités

Les fractions immunoréactives du [^{125}I]9E7.4-AB et du [^{211}At]9E7.4-AB ont été déterminées en utilisant des billes magnétiques (Pierce, Thermo Scientific) greffées avec un peptide de 40 amino acides produit par Genecust et reconnu par le 9E7.4, selon le protocole du fournisseur. 0,1 pmol de 9E7.4 radiomarké est mis à incuber 15 min à température ambiante avec 10 μL de billes magnétiques (10 mg/mL). Le surnageant contenant les anticorps non réactifs et les billes magnétiques sont récupérées séparément en utilisant un rack magnétique et la radioactivité de chaque fraction est mesurée au compteur gamma.

IV. Etudes *in vivo*

IV.1. Etudes de biodistributions

Des souris BALB/c femelles ont été achetées chez Janvier Labs et hébergées avec des conditions conventionnelles à l'animalerie de l'unité expérimentale thérapeutique (SFR François Bonamy, IRS-UN, Université de Nantes, numéro de licence : B-44-278). Les souris avaient 8 semaines au moment de l'expérience.

Des souris BALB/c ont été inoculées par voie sous-cutanée avec 2.10^5 cellules MOPC-315. Lorsque la taille des tumeurs était suffisante, les animaux ont été divisés en 4 groupes qui ont reçu différents radioimmunoconjugués. Le groupe A a été traité avec le [^{125}I]9E7.4-AB (37 kBq/souris, 20 μg dans 100 μL), le groupe B avec le [^{125}I]9E7.4 radiomarké *via* la méthode en deux étapes (37 kBq/souris, 20 μg dans 100 μL), le groupe C avec le [^{211}At]9E7.4-AB (1 MBq/souris, 20 μg dans 100 μL) et le groupe D avec le [^{211}At]9E7.4 radiomarké *via* la méthode en deux étapes (1 MBq/souris, 20 μg dans 100 μL). Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale par groupes de 3 à 6 animaux à 5 différents temps post-injection : 30 minutes, 1h30, 7 h, 14 h et 21 h. Les tissus sélectionnés (sang, peau, muscle, tumeur, fémur, rate, estomac, intestins, reins, foie, cœur, poumons, os plat et cerveau) ont été disséqués, pesés, et comptés sur un compteur-gamma calibré et normalisé. Pour chaque organe, le pourcentage de dose injecté par gramme (%DI/g) a été calculé. Le cou (thyroïde) n'a pas été pesé mais tout de même compté au compteur-gamma pour la détermination du pourcentage de dose injecté %DI. Aucun agent bloquant n'a été utilisé afin d'utiliser l'activité accumulée dans certains organes (thyroïde, estomac, rate, poumons, reins et foie) comme des indicateurs d'astate libre.

IV.2. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel GraphPad Prism (version 8.00) Les différences d'accumulation ont été testées pour estimer si elles étaient significatives en utilisant le test de comparaisons multiples de Sidak. Une valeur de p en dessous de 0,05 était considérée comme significative.

V. Automatisation

Le module de synthèse utilisé pour le radiomarquage automatisé du 9E7.4-AB est un Hot Box III, Scintomics GmbH et est contrôlé par le logiciel Scintomics Control Centre. L'astate-211 en chloroforme est introduit dans le flacon de réaction. Les réactifs de radiomarquage (9E7.4-AB, $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$, 1,10-phénantroline et Na_2SO_3) sont stockés dans des conteneurs scellés sur le module. La colonne utilisée pour la purification de l'anticorps est une Hi-Trap (Sephadex G25, GE Healthcare).

Méthode du radiomarquage à l'astate du 9E7.4-AB sur le module de synthèse :

L'astate en chloroforme est introduit dans le flacon de réaction. Le chloroforme est évaporé de manière automatisée par passage d'un flux d'azote. Le Na_2SO_3 à la concentration voulue est ensuite ajouté automatiquement *via* des valves à deux positions sur l'astate à sec grâce à un flux d'azote (50 mL/min). Après 30 s – 60 s de réaction, une solution contenant le 9E7.4-AB (2,4 mg/mL), le $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{pyr}_4$ (3,33 mM) et la 1,10-phénantroline (3,33 mM) en tampon tris 0,5 M pH 6/DMF 90/10 est ajouté automatiquement *via* des valves à deux positions grâce à un flux d'azote (80 mL/min). La réaction est laissée 30 minutes à 25 °C. Le marquage est ensuite introduit automatiquement sur la colonne Hi-Trap à l'aide du distributeur. L'anticorps est ensuite purifié automatiquement en ajoutant 5 mL de PBS à l'aide du distributeur. Une sonde est placée en sortie de colonne pour détecter la radioactivité.

Références bibliographiques

1. Kostarelos, K. Rational design and engineering of delivery systems for therapeutics: biomedical exercises in colloid and surface science. *Adv. Colloid Interface Sci.* **106**, 147–168 (2003).
2. Fani, M., Maecke, H. R. & Okarvi, S. M. Radiolabeled Peptides: Valuable Tools for the Detection and Treatment of Cancer. *Theranostics* **2**, 481–501 (2012).
3. Jager, P. L. *et al.* Radiolabeled Amino Acids: Basic Aspects and Clinical Applications in Oncology*. *J. Nucl. Med.* **42**, 432–445 (2001).
4. Aghevlian, S., Boyle, A. J. & Reilly, R. M. Radioimmunotherapy of cancer with high linear energy transfer (LET) radiation delivered by radionuclides emitting α -particles or Auger electrons. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **109**, 102–118 (2017).
5. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497 (1975).
6. Doevendans, E. & Schellekens, H. Immunogenicity of Innovative and Biosimilar Monoclonal Antibodies. *Antibodies (Basel)* **8**, (2019).
7. Paganelli, G. *et al.* Three-Step Monoclonal Antibody Tumor Targeting in Carcinoembryonic Antigen-positive Patients. *Cancer Res.* **51**, 5960–5966 (1991).
8. Altai, M., Membreno, R., Cook, B., Tolmachev, V. & Zeglis, B. M. Pretargeted Imaging and Therapy. *J. Nucl. Med.* **58**, 1553–1559 (2017).
9. Verhoeven, M., Seimbille, Y. & Dalm, S. U. Therapeutic Applications of Pretargeting. *Pharmaceutics* **11**, (2019).
10. Grana, C. *et al.* Pretargeted adjuvant radioimmunotherapy with Yttrium-90-biotin in malignant glioma patients: A pilot study. *Br. J. Cancer* **86**, 207–212 (2002).
11. Morandau, L. *et al.* Synthesis of New Bivalent Peptides for Applications in the Affinity Enhancement System. *Bioconjugate Chem.* **16**, 184–193 (2005).
12. Liu, G. *et al.* Tumor Pretargeting in Mice Using ^{99m}Tc-Labeled Morpholino, a DNA Analog. *J. Nucl. Med.* **43**, 384–391 (2002).

13. Rossin, R. *et al.* In Vivo Chemistry for Pretargeted Tumor Imaging in Live Mice. *Angew. Chem.* **122**, 3447–3450 (2010).
14. Ramos-Suzarte, M. *et al.* Diagnostic efficacy and safety of ^{99m}Tc-Labeled monoclonal antibody for c5 in patients with colorectal and anal carcinomas: Final report clinical trial phase I/II. *Cancer Biology & Therapy* **6**, 22–29 (2007).
15. Guo, X. *et al.* Development of ^{99m}Tc-conjugated JS001 antibody for in vivo mapping of PD-1 distribution in murine. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **29**, 2178–2181 (2019).
16. Takashima, H. *et al.* Molecular imaging using an anti-human tissue factor monoclonal antibody in an orthotopic glioma xenograft model. *Sci. Rep.* **7**, 12341 (2017).
17. Sugyo, A. *et al.* Anti-tissue factor antibody-mediated immuno-SPECT imaging of tissue factor expression in mouse models of pancreatic cancer. *Oncol. Rep.* **41**, 2371–2378 (2019).
18. Dou, X. *et al.* SPECT imaging of neuropilin receptor type-1 expression with ¹³¹I-labeled monoclonal antibody. *Int. J. Oncol.* **49**, 961–970 (2016).
19. Chen, L. *et al.* ¹³¹I-labeled monoclonal antibody targeting neuropilin receptor type-2 for tumor SPECT imaging. *Int. J. Oncol.* **50**, 649–659 (2017).
20. Fujiwara, K. *et al.* ¹¹¹In-labeled anti-cadherin17 antibody D2101 has potential as a noninvasive imaging probe for diagnosing gastric cancer and lymph-node metastasis. *Ann. Nucl. Med.* **34**, 13–23 (2020).
21. Dickson, J. C. Quantitative SPECT: a survey of current practice in the UK Nuclear Medicine Community. *Nucl. Med. Commun.* **40**, 986–994 (2019).
22. Bailly, C. *et al.* Immuno-PET for Clinical Theranostic Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 57 (2017).
23. Bodet-Milin, C. *et al.* Clinical Results in Medullary Thyroid Carcinoma Suggest High Potential of Pretargeted Immuno-PET for Tumor Imaging and Theranostic Approaches. *Front. Med.* **6**, (2019).
24. Bodet-Milin, C. *et al.* Immuno-PET Using Anticarcinoembryonic Antigen Bispecific Antibody and ⁶⁸Ga-Labeled Peptide in Metastatic Medullary Thyroid Carcinoma: Clinical Optimization of the Pretargeting Parameters in a First-in-Human Trial. *J. Nucl. Med.* **57**, 1505–1511 (2016).

25. Helal, M. & Dadachova, E. Radioimmunotherapy as a Novel Approach in HIV, Bacterial, and Fungal Infectious Diseases. *Cancer Biother. Radiopharm.* **33**, 330–335 (2018).
26. Dadachova, E. Future Vistas in Alpha Therapy of Infectious Diseases. *J. Med. Imaging. Radiat. Sci.* **50**, S49–S52 (2019).
27. Kraeber-Bodéré, F., Barbet, J. & Chatal, J.-F. Radioimmunotherapy: From Current Clinical Success to Future Industrial Breakthrough? *J. Nucl. Med.* **57**, 329–331 (2016).
28. Witzig, T. E. *et al.* Treatment With Ibritumomab Tiuxetan Radioimmunotherapy in Patients With Rituximab-Refractory Follicular Non-Hodgkin's Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **20**, 3262–3269 (2002).
29. Morschhauser, F. *et al.* Phase III Trial of Consolidation Therapy With Yttrium-90–Ibritumomab Tiuxetan Compared With No Additional Therapy After First Remission in Advanced Follicular Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5156–5164 (2008).
30. Morschhauser, F. *et al.* 90Yttrium-Ibritumomab Tiuxetan Consolidation of First Remission in Advanced-Stage Follicular Non-Hodgkin Lymphoma: Updated Results After a Median Follow-Up of 7.3 Years From the International, Randomized, Phase III First-Line Indolent Trial. *J. Clin. Oncol.* **31**, 1977–1983 (2013).
31. Zinzani, P. L. *et al.* Phase II Trial of Short-Course R-Chop Followed by 90Y-Ibritumomab Tiuxetan in Previously Untreated High-Risk Elderly Diffuse Large B-Cell Lymphoma Patients. *Clin. Cancer Res.* **16**, 3998–4004 (2010).
32. Smith, M. R. *et al.* Phase II Study of Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Immunochemotherapy Followed by Yttrium-90–Ibritumomab Tiuxetan in Untreated Mantle-Cell Lymphoma: Eastern Cooperative Oncology Group Study E1499. *J. Clin. Oncol.* **30**, 3119–3126 (2012).
33. Morschhauser, F. *et al.* High Rates of Durable Responses With Anti-CD22 Fractionated Radioimmunotherapy: Results of a Multicenter, Phase I/II Study in Non-Hodgkin's Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3709–3716 (2010).

34. DeNardo, G. L. *et al.* Rationales, evidence, and design considerations for fractionated radioimmunotherapy. *Cancer* **94**, 1332–1348 (2002).
35. Illidge, T. M. *et al.* Fractionated 90Y-Ibritumomab Tiuxetan Radioimmunotherapy As an Initial Therapy of Follicular Lymphoma: An International Phase II Study in Patients Requiring Treatment According to GELF/BNLI Criteria. *J. Clin. Oncol.* **32**, 212–218 (2013).
36. Tagawa, S. T. *et al.* Phase II study of Lutetium-177-labeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5182–5191 (2013).
37. Batra, J. S. *et al.* Fractionated dose radiolabeled antiprostate specific membrane antigen (PSMA) radioimmunotherapy (177Lu-J591) with or without docetaxel for metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). *J. Clin. Oncol.* **33**, 194–194 (2015).
38. Tagawa, S. T. *et al.* Phase 1/2 study of fractionated dose lutetium-177–labeled anti–prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 (177Lu-J591) for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer* **125**, 2561–2569 (2019).
39. Niaz, M. J. *et al.* Pilot Study of Hyperfractionated Dosing of Lutetium-177–Labeled Antiprostate-Specific Membrane Antigen Monoclonal Antibody J591 (177Lu-J591) for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *The Oncologist* **25**, 1–6 (2020).
40. Bartholomä, M. D. Radioimmunotherapy of solid tumors: Approaches on the verge of clinical application. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **61**, 715–726 (2018).
41. Chatal, J.-F. *et al.* Survival Improvement in Patients With Medullary Thyroid Carcinoma Who Undergo Pretargeted Anti–Carcinoembryonic-Antigen Radioimmunotherapy: A Collaborative Study With the French Endocrine Tumor Group. *J. Clin. Oncol.* **24**, 1705–1711 (2006).
42. Salaun, P.-Y. *et al.* Phase II Trial of Anticarcinoembryonic Antigen Pretargeted Radioimmunotherapy in Progressive Metastatic Medullary Thyroid Carcinoma: Biomarker Response and Survival Improvement. *J. Nucl. Med.* **53**, 1185–1192 (2012).

43. Kraeber-Bodéré, F. *et al.* Tumor Immunotargeting Using Innovative Radionuclides. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 3932–3954 (2015).
44. Corson, D. R., MacKenzie, K. R. & Segrè, E. Possible Production of Radioactive Isotopes of Element 85. *Phys. Rev.* **57**, 459–459 (1940).
45. Palm, S., Humm, J. L., Rundqvist, R. & Jacobsson, L. Microdosimetry of astatine-211 single-cell irradiation: Role of daughter polonium-211 diffusion. *Med. Phys.* **31**, 218–225 (2004).
46. Turkington, T. G. *et al.* Measuring astatine-211 distributions with SPECT. *Phys. Med. Biol.* **38**, 1121–1130 (1993).
47. Nakanishi, K. *et al.* Development of high-resolution YAP(Ce) x-ray camera for the imaging of astatine-211(At-211) in small animals. *Med. Phys.* **n/a**,.
48. Kambali, I. Calculated astatine-211 production yields for radioimmunotherapy. *J. Phys.: Conf. Ser.* **1116**, 032013 (2018).
49. Henriksen, G., Messelt, S., Olsen, E. & Larsen, R. H. Optimisation of cyclotron production parameters for the $^{209}\text{Bi}(\alpha, 2n) ^{211}\text{At}$ reaction related to biomedical use of ^{211}At . *Appl. Radiat. Isot.* **54**, 839–844 (2001).
50. Hermanne, A. *et al.* Experimental study of the cross-sections of α -particle induced reactions on ^{209}Bi . *Appl. Radiat. Isot.* **63**, 1–9 (2005).
51. Zalutsky, M. R., Zhao, X.-G., Alston, K. L. & Bigner, D. High-Level Production of α -Particle-Emitting ^{211}At and Preparation of ^{211}At -Labeled Antibodies for Clinical Use. *J. Nucl. Med.* **42**, 1508–1515 (2001).
52. Lindegren, S., Bäck, T. & Jensen, H. J. Dry-distillation of astatine-211 from irradiated bismuth targets: a time-saving procedure with high recovery yields. *Appl. Radiat. Isot.* **55**, 157–160 (2001).
53. Alliot, C., Chérel, M., Barbet, J., Sauvage, T. & Montavon, G. Extraction of astatine-211 in diisopropylether (DIPE). *Radiochim. Acta* **97**, 161–165 (2009).
54. Yordanov, A. T. *et al.* Wet harvesting of no-carrier-added ^{211}At from an irradiated ^{209}Bi target for radiopharmaceutical applications. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **262**, 593–599 (2005).

55. Ekberg, C., Jensen, H., Mezyk, S. P., Mincher, B. J. & Skarnemark, G. Extraction of ^{211}At from nitric acid solutions into various organic solvents for use as an α -source for radiation chemistry studies. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **314**, 235–239 (2017).
56. Nayak, D. & Lahiri, S. Extraction separation of No-carrier-added astatine from bismuth target. *Radiochim. Acta* **91**, 159–162 (2003).
57. Burns, J. D. *et al.* Astatine partitioning between nitric acid and conventional solvents: indication of covalency in ketone complexation of AtO^+ . *Chem. Commun.* **56**, 9004–9007 (2020).
58. O'Hara, M. *et al.* Development of an autonomous solvent extraction system to isolate astatine-211 from dissolved cyclotron bombarded bismuth targets. *Sci. Rep.* **9**, 20318 (2019).
59. Li, Y. *et al.* Investigation of a tellurium-packed column for isolation of astatine-211 from irradiated bismuth targets and demonstration of a semi-automated system. *Sci. Rep.* **9**, 1–7 (2019).
60. Woen, D. H. *et al.* A Solid-State Support for Separating Astatine-211 from Bismuth. *Inorg. Chem.* **59**, 6137–6146 (2020).
61. Meyer, G.-J. & Lambrecht, R. M. Excitation function for the $^{209}\text{Bi}(^7\text{Li}, ^5\text{n})^{211}\text{Rn}$ nuclear reaction. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **31**, 351–355 (1980).
62. Vinodkumar, A. M. *et al.* Fusion of Li^9 with Pb^{208} . *Phys. Rev. C* **80**, 054609 (2009).
63. Maeda, E., Yokoyama, A., Taniguchi, T., Washiyama, K. & Nishinaka, I. Extraction of astatine isotopes for development of radiopharmaceuticals using a ^{211}Rn – ^{211}At generator. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **303**, 1465–1468 (2015).
64. Crawford, J. R. *et al.* Development of a preclinical $^{211}\text{Rn}/^{211}\text{At}$ generator system for targeted alpha therapy research with ^{211}At . *Nucl. Med. Biol.* **48**, 31–35 (2017).
65. Fleig, T. & Sadlej, A. J. Electric dipole polarizabilities of the halogen atoms in $2\text{P}_{1/2}$ and $2\text{P}_{3/2}$ states: Scalar relativistic and two-component configuration-interaction calculations. *Phys. Rev. A* **65**, 032506 (2002).

66. Champion, J. Assessment of an effective quasirelativistic methodology designed to study astatine chemistry in aqueous solution - Physical Chemistry Chemical Physics (RSC Publishing). *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 14984–14992 (2011).
67. Sergentu, D.-C., David, G., Montavon, G., Maurice, R. & Galland, N. Scrutinizing “Invisible” astatine: A challenge for modern density functionals. *J. Comput. Chem.* **37**, 1345–1354 (2016).
68. Shao, Z. *et al.* Stable structures and superconductivity of an At–H system at high pressure. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 24783–24789 (2018).
69. Hermann, A., Hoffmann, R. & Ashcroft, N. W. Condensed Astatine: Monatomic and Metallic. *Phys. Rev. Lett.* **111**, 116404 (2013).
70. Bersuker, I. B. Pseudo-Jahn–Teller Effect—A Two-State Paradigm in Formation, Deformation, and Transformation of Molecular Systems and Solids. *Chem. Rev.* **113**, 1351–1390 (2013).
71. Schwerdtfeger, P. Second-Order Jahn–Teller Distortions in Group 17 Fluorides EF₃ (E = Cl, Br, I, and At). Large Relativistic Bond Angle Changes in AtF₃. *J. Phys. Chem.* **100**, 2968–2973 (1996).
72. Sergentu, D.-C., Amaouch, M., Pilmé, J., Galland, N. & Maurice, R. Electronic structures and geometries of the XF₃ (X = Cl, Br, I, At) fluorides: *J. Chem. Phys.* **143**, 114306 (2015).
73. Amaouch, M. *et al.* The bonding picture in hypervalent XF₃ (X = Cl, Br, I, At) fluorides revisited with quantum chemical topology. *J. Comput. Chem.* **38**, 2753–2762 (2017).
74. Autschbach, J. Perspective: Relativistic effects. *J. Chem. Phys.* **136**, 150902 (2012).
75. Pilmé, J., Renault, E., Ayed, T., Montavon, G. & Galland, N. Introducing the ELF Topological Analysis in the Field of Quasirelativistic Quantum Calculations. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 2985–2990 (2012).
76. Peterson, K. A., Figgen, D., Goll, E., Stoll, H. & Dolg, M. Systematically convergent basis sets with relativistic pseudopotentials. II. Small-core pseudopotentials and correlation consistent basis sets for the post-d group 16–18 elements. *J. Chem. Phys.* **119**, 11113–11123 (2003).
77. Roos, B. O., Lindh, R., Malmqvist, P.-Å., Veryazov, V. & Widmark, P.-O. Main Group Atoms and Dimers Studied with a New Relativistic ANO Basis Set. *J. Phys. Chem. A* **108**, 2851–2858 (2004).

78. Mitin, A. V. & van Wüllen, C. Two-component relativistic density-functional calculations of the dimers of the halogens from bromine through element 117 using effective core potential and all-electron methods. *J. Chem. Phys.* **124**, 064305 (2006).
79. Chang, Z., Li, J. & Dong, C. Ionization Potentials, Electron Affinities, Resonance Excitation Energies, Oscillator Strengths, And Ionic Radii of Element Uus ($Z = 117$) and Astatine. *J. Phys. Chem. A* **114**, 13388–13394 (2010).
80. Zeng, T. (曾韬), Fedorov, D. G. & Klobukowski, M. Multireference study of spin-orbit coupling in the hydrides of the 6p-block elements using the model core potential method. *J. Chem. Phys.* **132**, 074102 (2010).
81. Li, J., Zhao, Z., Andersson, M., Zhang, X. & Chen, C. Theoretical study for the electron affinities of negative ions with the MCDHF method. *J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys.* **45**, 165004 (2012).
82. Laury, M. L. & Wilson, A. K. Examining the heavy p-block with a pseudopotential-based composite method: Atomic and molecular applications of rp-ccCA. *J. Chem. Phys.* **137**, 214111 (2012).
83. Borschevsky, A., Pašteka, L. F., Pershina, V., Eliav, E. & Kaldor, U. Ionization potentials and electron affinities of the superheavy elements 115--117 and their sixth-row homologues Bi, Po, and At. *Phys. Rev. A* **91**, 020501 (2015).
84. Si, R. & Fischer, C. F. Electron affinities of At and its homologous elements Cl, Br, and I. *Phys. Rev. A* **98**, 052504 (2018).
85. Leimbach, D. *et al.* The electron affinity of astatine. *Nat. Commun.* **11**, 3824 (2020).
86. Pilmé, J. *et al.* QTAIM Analysis in the Context of Quasirelativistic Quantum Calculations. *J. Chem. Theory Comput.* **10**, 4830–4841 (2014).
87. Maurice, R. *et al.* Effective bond orders from two-step spin–orbit coupling approaches: The I₂, At₂, IO⁺, and AtO⁺ case studies. *J. Chem. Phys.* **142**, 094305 (2015).
88. Pech, C. G., Haase, P. A. B., Galland, N., Borschevsky, A. & Maurice, R. Relevance of effective bond orders in heterodiatomic molecules and role of the spin-orbit coupling in the $\mathrm{At}X$ ($X = \mathrm{At} \text{--} \mathrm{F}$) series. *Phys. Rev. A* **100**, 032518 (2019).

89. Desiraju, G. R. *et al.* Definition of the halogen bond (IUPAC Recommendations 2013). *Pure Appl. Chem.* **85**, 1711–1713 (2013).
90. Graton, J. *et al.* Spin–orbit coupling as a probe to decipher halogen bonding. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 29616–29624 (2018).
91. Clark, T., Hennemann, M., Murray, J. S. & Politzer, P. Halogen bonding: the σ -hole. *J. Mol. Model.* **13**, 291–296 (2007).
92. Politzer, P., Lane, P., Concha, M. C., Ma, Y. & Murray, J. S. An overview of halogen bonding. *J. Mol. Model.* **13**, 305–311 (2007).
93. Sarr, S., Graton, J., Montavon, G., Pilmé, J. & Galland, N. On the Interplay between Charge-Shift Bonding and Halogen Bonding. *ChemPhysChem* **21**, 240–250 (2020).
94. Rossi, E. *et al.* Spin–orbit coupling is the key to unraveling intriguing features of the halogen bond involving astatine. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **22**, 1897–1910 (2020).
95. Guo, N. *et al.* Experimental and computational evidence of halogen bonds involving astatine. *Nat. Chem.* **10**, 428–434 (2018).
96. Liu, L. *et al.* Towards a Stronger Halogen Bond Involving Astatine: Unexpected Adduct with Bu₃PO Stabilized by Hydrogen Bonding. *Chem. Eur. J.* **26**, 3713–3717 (2020).
97. Galland, N., Montavon, G., Questel, J.-Y. L. & Graton, J. Quantum calculations of At-mediated halogen bonds: on the influence of relativistic effects. *New J. Chem.* **42**, 10510–10517 (2018).
98. Li, S. *et al.* Halogen and hydrogen bonding in halogenabenzene/NH₃ complexes compared using next-generation QTAIM. *Molecules* **24**, (2019).
99. Sergentu, D.-C. *et al.* Advances on the Determination of the Astatine Pourbaix Diagram: Predomination of AtO(OH)₂[–] over At[–] in Basic Conditions. *Chem. Eur. J.* **22**, 2964–2971 (2016).
100. Champion, J. Thèse de doctorat : Exploration du caractère métallique de l’astate en solution aqueuse. (Université de Nantes, 2009).
101. Appelman, E. H. The Oxidation States of Astatine in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 805–807 (1961).

102. Visser, G. W. M. & Diemer, E. L. Inorganic Astatine Chemistry: Formation of Complexes of Astatine. *Radiochim. Acta* **33**, 145–152 (1983).
103. Guo, N. *et al.* Evidence for the Heaviest Expected Halide Species in Aqueous Solution, At⁻, by Electromobility Measurements. *Inorg. Chem.* **57**, 4926–4933 (2018).
104. Guo, N. *et al.* The Heaviest Possible Ternary Trihalogen Species, IAtBr⁻, Evidenced in Aqueous Solution: An Experimental Performance Driven by Computations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 15369–15372 (2016).
105. Pearson, R. G. Hard and Soft Acids and Bases. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3533–3539 (1963).
106. Ayed, T., Seydou, M., Réal, F., Montavon, G. & Galland, N. How Does the Solvation Unveil AtO⁺ Reactivity? *J. Phys. Chem. B* **117**, 5206–5211 (2013).
107. Sergentu, D.-C., Réal, F., Montavon, G., Galland, N. & Maurice, R. Unraveling the hydration-induced ground-state change of AtO⁺ by relativistic and multiconfigurational wave-function-based methods. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 32703–32712 (2016).
108. Link, E. M., Michalowski, A. S. & Rösch, F. 211At-methylene blue for targeted radiotherapy of disseminated melanoma: microscopic analysis of tumour versus normal tissue damage. *Eur. J. Cancer* **32**, 1986–1994 (1996).
109. Hamilton, J. G. & Soley, M. H. A Comparison of the Metabolism of Iodine and of Element 85 (Eka-Iodine). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **26**, 483–489 (1940).
110. Brown, I. Astatine-211: Its possible applications in cancer therapy. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. A* **37**, 789–798 (1986).
111. Spetz, J., Rudqvist, N. & Forssell-Aronsson, E. Biodistribution and Dosimetry of Free 211At, 125I– and 131I– in Rats. *Cancer Biother. Radiopharm.* **28**, 657–664 (2013).
112. Larsen, R. H., Slade, S. & Zalutsky, M. R. Blocking [211At]Astatide Accumulation in Normal Tissues: Preliminary Evaluation of Seven Potential Compounds. *Nucl. Med. Biol.* **25**, 351–357 (1998).

113. Claesson, A. K., Stenerlöv, B., Jacobsson, L. & Elmroth, K. Relative Biological Effectiveness of the α -Particle Emitter ^{211}At for Double-Strand Break Induction in Human Fibroblasts. *Radiat. Res.* **167**, 312–318 (2007).
114. Larsen, R. H., Akabani, G., Welsh, P. & Zalutsky, M. R. The Cytotoxicity and Microdosimetry of Astatine-211-Labeled Chimeric Monoclonal Antibodies in Human Glioma and Melanoma Cells In Vitro. *Radiat. Res.* **149**, 155–162 (1998).
115. Aurlen, E., Kvinnsland, Y., Larsen, R. H. & Bruland, Ø. S. Radiation doses to non-Hodgkin's lymphoma cells and normal bone marrow exposed in vitro. Comparison of an α -emitting radioimmunoconjugate and external γ -irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **78**, 133–142 (2002).
116. Almqvist, Y. *et al.* In Vitro Characterization of ^{211}At -Labeled Antibody A33—a Potential Therapeutic Agent Against Metastatic Colorectal Carcinoma. *Cancer Biother. Radiopharm.* **20**, 514–523 (2005).
117. Akabani, G., Carlin, S., Welsh, P. & Zalutsky, M. R. In vitro cytotoxicity of ^{211}At -labeled trastuzumab in human breast cancer cell lines: effect of specific activity and HER2 receptor heterogeneity on survival fraction. *Nucl. Med. Biol.* **33**, 333–347 (2006).
118. Dziawer, Ł. *et al.* Trastuzumab-Modified Gold Nanoparticles Labeled with ^{211}At as a Prospective Tool for Local Treatment of HER2-Positive Breast Cancer. *Nanomaterials (Basel)* **9**, (2019).
119. Petrich, T. *et al.* In vitro experimental ^{211}At -anti-CD33 antibody therapy of leukaemia cells overcomes cellular resistance seen in vivo against gemtuzumab ozogamicin. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **37**, 851–861 (2010).
120. Watabe, T. *et al.* Enhancement of ^{211}At Uptake via the Sodium Iodide Symporter by the Addition of Ascorbic Acid in Targeted α -Therapy of Thyroid Cancer. *J. Nucl. Med.* **60**, 1301–1307 (2019).
121. Liu, Y. *et al.* Preclinical Evaluation of Radiation-Induced Toxicity in Targeted Alpha Therapy Using [^{211}At] NaAt in Mice: A Revisit. *Transl. Oncol.* **13**, 100757 (2020).

122. Brown, I., Carpenter, R. N. & Mitchell, J. S. Biodistribution of 6-[211At]astato-2-methyl-1,4-naphthoquinol bis(diphosphate salt) and 211At⁻ in mice with a transplanted rectal adenocarcinoma. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **35**, 843–847 (1984).
123. Cheng, J. *et al.* Radioimmunotherapy With Astatine-211 Using Chimeric Monoclonal Antibody U36 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *The Laryngoscope* **117**, 1013–1018 (2007).
124. Green, D. J. *et al.* Astatine-211 conjugated to an anti-CD20 monoclonal antibody eradicates disseminated B-cell lymphoma in a mouse model. *Blood* **125**, 2111–2119 (2015).
125. Elgqvist, J. *et al.* Administered activity and metastatic cure probability during radioimmunotherapy of ovarian cancer in nude mice with 211At-MX35 F(ab')₂. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys* **66**, 1228–1237 (2006).
126. Elgqvist, J. *et al.* α-Radioimmunotherapy of Intraperitoneally Growing OVCAR-3 Tumors of Variable Dimensions: Outcome Related to Measured Tumor Size and Mean Absorbed Dose. *J. Nucl. Med.* **47**, 1342–1350 (2006).
127. Elgqvist, J. *et al.* Fractionated radioimmunotherapy of intraperitoneally growing ovarian cancer in nude mice with 211At-MX35 F(ab')₂: therapeutic efficacy and myelotoxicity. *Nucl. Med. Biol.* **33**, 1065–1072 (2006).
128. Robinson, M. K. *et al.* Effective Treatment of Established Human Breast Tumor Xenografts in Immunodeficient Mice with a Single Dose of the α-Emitting Radioisotope Astatine-211 Conjugated to Anti-HER2/neu Diabodies. *Clin. Cancer Res.* **14**, 875–882 (2008).
129. Liu, W. *et al.* One-step labelling of a novel small-molecule peptide with astatine-211: preliminary evaluation in vitro and in vivo. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **316**, 451–456 (2018).
130. Zhao, B. *et al.* Evaluation of astatine-211-labeled octreotide as a potential radiotherapeutic agent for NSCLC treatment. *Bioorg. Med. Chem.* **26**, 1086–1091 (2018).
131. Choi, J., Vaidyanathan, G., Koumarianou, E., Kang, C. M. & Zalutsky, M. R. Astatine-211 labeled anti-HER2 5F7 single domain antibody fragment conjugates: radiolabeling and preliminary evaluation. *Nucl. Med. Biol.* **56**, 10–20 (2018).

132. Bäck, T. A. *et al.* Targeted alpha therapy with astatine-211-labeled anti-PSCA A11 minibody shows antitumor efficacy in prostate cancer xenografts and bone microtumors. *EJNMMI Res.* **10**, 10 (2020).
133. Andersson, H. *et al.* Comparison of the therapeutic efficacy of ²¹¹At- and ¹³¹I-labelled monoclonal antibody MOv18 in nude mice with intraperitoneal growth of human ovarian cancer. *Anticancer Res.* **21**, 409–412 (2001).
134. Li, H. K. *et al.* α -particle therapy for synovial sarcoma in the mouse using an astatine-211-labeled antibody against frizzled homolog 10. *Cancer Sci.* **109**, 2302–2309 (2018).
135. Palm, S. *et al.* Therapeutic Efficacy of Astatine-211–Labeled Trastuzumab on Radioresistant SKOV-3 Tumors in Nude Mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys* **69**, 572–579 (2007).
136. Li, H. K., Morokoshi, Y., Nagatsu, K., Kamada, T. & Hasegawa, S. Locoregional therapy with α -emitting trastuzumab against peritoneal metastasis of human epidermal growth factor receptor 2-positive gastric cancer in mice. *Cancer Sci.* **108**, 1648–1656 (2017).
137. Elgqvist, J. *et al.* Repeated Intraperitoneal α -Radioimmunotherapy of Ovarian Cancer in Mice. *J. Oncol.* **2010**, (2010).
138. Bäck, T. *et al.* Cure of Human Ovarian Carcinoma Solid Xenografts by Fractionated α -Radioimmunotherapy with ²¹¹At-MX35-F(ab')₂: Influence of Absorbed Tumor Dose and Effect on Long-Term Survival. *J. Nucl. Med.* **58**, 598–604 (2017).
139. Palm, S. *et al.* Biokinetic Modeling and Dosimetry for Optimizing Intraperitoneal Radioimmunotherapy of Ovarian Cancer Microtumors. *J. Nucl. Med.* **57**, 594–600 (2016).
140. Palm, S. *et al.* Model of Intraperitoneal Targeted α -Particle Therapy Shows That Posttherapy Cold-Antibody Boost Enhances Microtumor Radiation Dose and Treatable Tumor Sizes. *J. Nucl. Med.* **59**, 646–651 (2018).
141. Zhang, M. *et al.* Effective therapy of murine models of human leukemia and lymphoma with radiolabeled anti-CD30 antibody, HeFi-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 8444–8448 (2007).

142. Zhang, Z. *et al.* Effective treatment of a murine model of adult T-cell leukemia using 211At-7G7/B6 and its combination with unmodified anti-Tac (daclizumab) directed toward CD25. *Blood* **108**, 1007–1012 (2006).
143. Zalutsky, M. R. *et al.* Clinical Experience with α -Particle-Emitting 211At: Treatment of Recurrent Brain Tumor Patients with 211At-Labeled Chimeric Antitenascin Monoclonal Antibody 81C6. *J. Nucl. Med.* **49**, 30–38 (2008).
144. Zalutsky, M. R. *et al.* Radioimmunotherapy of neoplastic meningitis in rats using an alpha-particle-emitting immunoconjugate. *Cancer Res.* **54**, 4719–4725 (1994).
145. Zalutsky, M. R., Stabin, M. G., Larsen, R. H. & Bigner, D. D. Tissue distribution and radiation dosimetry of astatine-211-labeled chimeric 81C6, an α -particle-emitting immunoconjugate. *Nucl. Med. Biol.* **24**, 255–261 (1997).
146. Andersson, H. *et al.* Intraperitoneal α -Particle Radioimmunotherapy of Ovarian Cancer Patients: Pharmacokinetics and Dosimetry of 211At-MX35 F(ab')₂—A Phase I Study. *J. Nucl. Med.* **50**, 1153–1160 (2009).
147. Cederkrantz, E. *et al.* Absorbed Doses and Risk Estimates of 211At-MX35 F(ab')₂ in Intraperitoneal Therapy of Ovarian Cancer Patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys* **93**, 569–576 (2015).
148. Hallqvist, A. *et al.* Intraperitoneal alpha-emitting radio immunotherapy with Astatine-211 in relapsed ovarian cancer; long-term follow-up with individual absorbed dose estimations. *J. Nucl. Med.* **60**, 1073–1079 (2019).
149. 211At-BC8-B10 Before Donor Stem Cell Transplant in Treating Patients With High-Risk Acute Myeloid Leukemia, Acute Lymphoblastic Leukemia, Myelodysplastic Syndrome, or Mixed-Phenotype Acute Leukemia. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03128034>.
150. Coenen, H. H., Moerlein, S. M. & StCklin, G. No-Carrier-Added Radiohalogenation Methods with Heavy Halogens. *Radiochim. Acta* **34**, 47–68 (1983).

151. Samson, G. & Aten, A. H. W. Synthesis and Properties of N-Alkylastatides. *Radiochim. Acta* **12**, 55–56 (1969).
152. Gesheva, M., Kolachovsky, A. & Norseyev, Yu. The determination of the boiling point of some isoalkyl astatides by use of a glass column gas chromatograph. *J. Chromatogr. A* **60**, 414–417 (1971).
153. Visser, G. W. M., Diemer, E. L. & Kaspersen, F. M. The preparation and stability of astatotyrosine and astatiodotyrosine. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **30**, 749–752 (1979).
154. Norseyev, Yu., Nhan, D., Khalkin, V., Huan, N. & Vasaros, L. The preparation of astatine labelled tyrosine using an electrophilic reaction. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **94**, 185–190 (1985).
155. Norseyev, Yu. V. Synthesis of astatine-tagged methylene blue, a compound for fighting micrometastases and individual cells of melanoma. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **237**, 155–158 (1998).
156. Hughes, W. L. & Klinenberg, J. Astatine (^{211}At) Incorporation into Aromatic Nuclei via Diazonium Compounds. *Report BNL 367 S-27*, 42–43 (1955).
157. Visser, G. & Diemer, E. The reaction of astatine with aromatic diazonium compounds. *Radiochem. Radioanal. Lett.* **51**, 135 (1982).
158. Meyer, G. J., Roessler, K. & Stoecklin, G. Reaction of aromatic diazonium salts with carrier-free radioiodine and astatine. Evidence for complex formation. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 3121–3123 (1979).
159. Meyer, G.-J., Rössler, K. & Stöcklin, G. Reactivity and Selectivity of the Astatine Interhalogen Compounds AtCl and AtBr Towards Simple Aromatic Substrates. *Radiochim. Acta* **24**, 81–86 (1977).
160. Meyer, G.-J., Rössler, K. & Stöcklin, G. Preparation and high pressure liquid chromatography of 5-astatouracil. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **12**, 449–458 (1976).
161. Wunderlich, G., Fischer, S., Dreyer, R. & Franke, W.-G. A simple method for labelling proteins with ^{211}At via diazotized aromatic diamine. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **117**, 197–203 (1987).

162. Bo-Li, L. *et al.* Halogen exchanges using crown ethers: Synthesis and preliminary biodistribution of 6-[211At]-Astatomethyl-19-norcholest-5(10)-en-3 β -o. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **36**, 561–563 (1985).
163. Brown, I., Carpenter, R. N., Link, E. & Mitchell, J. S. Potential diagnostic and therapeutic agents for malignant melanoma: Synthesis of heavy radiohalogenated derivatives of methylene blue by electrophilic and nucleophilic methods. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **107**, 337–351 (1986).
164. Mertens, J. J. R., Vanryckeghem, W. & Carlsen, L. CU(I) Supported Isotopic Exchange of Arylbound Iodide, New Future for Fast High Yield Labelling | SpringerLink. *P.H. Cox (Ed.), Progress in Radiopharmacy, Nijhoff M Publisher, Dordrecht* **10**, 101–109 (1986).
165. Sheppard, T. D. Metal-catalysed halogen exchange reactions of aryl halides. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 1043 (2009).
166. Evano, G., Nitelet, A., Thilmany, P. & Dewez, D. F. Metal-Mediated Halogen Exchange in Aryl and Vinyl Halides: A Review. *Frontiers in Chemistry* **6**, (2018).
167. Meyer, G. J. *et al.* Synthesis and analysis of 2-[211At]-l-phenylalanine and 4-[211At]-l-phenylalanine and their uptake in human glioma cell cultures in-vitro. *Appl. Radiat. Isot.* **68**, 1060–1065 (2010).
168. Guérard, F., Gestin, J.-F. & Brechbiel, M. W. Production of [211At]-Astatinated Radiopharmaceuticals and Applications in Targeted α -Particle Therapy. *Cancer Biother. Radiopharm.* **28**, 1–20 (2013).
169. Visser, G. W. M., Diemer, E. L. & Kaspersen, F. M. The preparation of aromatic astatine compounds through aromatic mercury compounds part II: Astatination of pyrimidines and steroids. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **18**, 799–807 (1981).
170. Brown, I. 6-211At-Astato-2-methyl-1,4-naphthoquinol bis (disodium phosphate): A novel α -emitting potential anti-tumour drug. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **33**, 75–76 (1982).
171. Milius, R. A. *et al.* Organoastatine chemistry. Astatination via electrophilic destannylation. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. A* **37**, 799–802 (1986).

172. Zalutsky, M. R., Garg, P. K., Friedman, H. S. & Bigner, D. D. Labeling monoclonal antibodies and F(ab')₂ fragments with the alpha-particle-emitting nuclide astatine-211: preservation of immunoreactivity and in vivo localizing capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 7149–7153 (1989).
173. Aneheim, E., Foreman, M. R. StJ., Jensen, H. & Lindegren, S. N-[2-(maleimido)ethyl]-3-(trimethylstannyl)benzamide, a molecule for radiohalogenation of proteins and peptides. *Appl. Radiat. Isot.* **96**, 1–5 (2015).
174. Watanabe, S. *et al.* A convenient and reproducible method for the synthesis of astatinated 4-[211At]astato-L-phenylalanine via electrophilic desilylation. *Org. Biomol. Chem.* **17**, 165–171 (2018).
175. Garg, P. K., John, C. S. & Zalutsky, M. R. Preparation and preliminary evaluation of 4-[211At]astato-N-piperidinoethyl benzamide. *Nucl. Med. Biol.* **22**, 467–473 (1995).
176. Foulon, C., Schoultz, B. & Zalutsky, M. R. Preparation and biological evaluation of an astatine-211 labeled biotin conjugate: Biotinyl-3-[211At]astatoanilide - ScienceDirect. *Nucl. Med. Biol.* **24**, 135–143 (1997).
177. Vaidyanathan, G. *et al.* A kit method for the high level synthesis of [211At]MABG. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 3430–3436 (2007).
178. Rajerison, H. *et al.* Ionic liquid supported organotin reagents to prepare molecular imaging and therapy agents. *Org. Biomol. Chem.* **14**, 2121–2126 (2016).
179. Beringer, F. M., Geering, E. J., Kuntz, I. & Mausner, M. Diaryliodonium Salts. IV. Ion Pairs and Copper Catalysis in the Reactions of Diphenyliodonium Ions with Halide Ions and Hydroxylic Solvents. *J. Phys. Chem.* **60**, 141–150 (1956).
180. Beringer, F. M. & Mausner, M. Diaryliodonium Salts. VIII. Decomposition of Substituted Diphenyliodonium Halides in Inert Solvents^{1,2}. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 4535–4536 (1958).

181. Pike, V. W. & Aigbirhio, F. I. Reactions of cyclotron-produced [^{18}F]fluoride with diaryliodonium salts—a novel single-step route to no-carrier-added [^{18}F]fluoroarenes. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **0**, 2215–2216 (1995).
182. Carroll, M. A., Nairne, J. & Woodcraft, J. L. Diaryliodonium salts: a solution to 3- [^{18}F]fluoropyridine. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **50**, 452–454 (2007).
183. Telu, S., Chun, J.-H., Siméon, F. G., Lu, S. & Pike, V. W. Syntheses of mGluR5 PET radioligands through the radiofluorination of diaryliodonium tosylates. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 6629–6638 (2011).
184. Moon, B. S. *et al.* Facile aromatic radiofluorination of [^{18}F]flumazenil from diaryliodonium salts with evaluation of their stability and selectivity. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 8346–8355 (2011).
185. Guérard, F., Lee, Y.-S., Baidoo, K., Gestin, J.-F. & Brechbiel, M. W. Unexpected Behavior of the Heaviest Halogen Astatine in the Nucleophilic Substitution of Aryliodonium Salts. *Chem. Eur. J.* **22**, 12332–12339 (2016).
186. Guérard, F. *et al.* Bifunctional aryliodonium salts for highly efficient radioiodination and astatination of antibodies. *Bioorg. Med. Chem.* **25**, 5975–5980 (2017).
187. Navarro, L. *et al.* Prosthetic groups for radioiodination and astatination of peptides and proteins: A comparative study of five potential bioorthogonal labeling strategies. *Bioorg. Med. Chem.* **27**, 167–174 (2019).
188. Chun, J.-H., Lu, S., Lee, Y.-S. & Pike, V. W. Fast and High-Yield Microreactor Syntheses of ortho-Substituted [^{18}F]Fluoroarenes from Reactions of [^{18}F]Fluoride Ion with Diaryliodonium Salts. *J. Org. Chem.* **75**, 3332–3338 (2010).
189. Lancer, K. M. & Wiegand, G. H. The ortho effect in the pyrolysis of iodonium halides. A case for a sterically controlled nucleophilic aromatic (S_{N}) substitution reaction. *J. Org. Chem.* **41**, 3360–3364 (1976).
190. Wilson, T. C., Cailly, T. & Gouverneur, V. Boron reagents for divergent radiochemistry. *Chem. Soc. Rev.* **47**, 6990–7005 (2018).

191. Furuya, T. & Ritter, T. Fluorination of Boronic Acids Mediated by Silver(I) Triflate. *Org. Lett.* **11**, 2860–2863 (2009).
192. Lee, E. *et al.* A Fluoride-Derived Electrophilic Late-Stage Fluorination Reagent for PET Imaging. *Science* **334**, 639–642 (2011).
193. Ye, Y. & Sanford, M. S. Mild Copper-Mediated Fluorination of Aryl Stannanes and Aryl Trifluoroborates. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 4648–4651 (2013).
194. Fier, P. S., Luo, J. & Hartwig, J. F. Copper-Mediated Fluorination of Arylboronate Esters. Identification of a Copper(III) Fluoride Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 2552–2559 (2013).
195. Kabalka, G. W. & Gooch, E. E. New method for radioiodinating organic compounds via organoborane reactions. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **19**, 1011–1011 (1981).
196. Kabalka, G. W. & Yao, M.-L. No-carrier-added radiohalogenations utilizing organoboranes: The synthesis of iodine-123 labeled curcumin. *J. Organomet. Chem.* **694**, 1638–1641 (2009).
197. Qiao, J. X. & Lam, P. Y. S. Copper-Promoted Carbon-Heteroatom Bond Cross-Coupling with Boronic Acids and Derivatives. *Synthesis* **2011**, 829–856 (2011).
198. Collman, J. P. & Zhong, M. An Efficient Diamine-Copper Complex-Catalyzed Coupling of Arylboronic Acids with Imidazoles. *Org. Lett.* **2**, 1233–1236 (2000).
199. Tromp, M. *et al.* Multitechnique Approach to Reveal the Mechanism of Copper(II)-Catalyzed Arylation Reactions. *Organometallics* **29**, 3085–3097 (2010).
200. King, A. E., Ryland, B. L., Brunold, T. C. & Stahl, S. S. Kinetic and Spectroscopic Studies of Aerobic Copper(II)-Catalyzed Methoxylation of Arylboronic Esters and Insights into Aryl Transmetalation to Copper(II). *Organometallics* **31**, 7948–7957 (2012).
201. Casitas, A., Canta, M., Solà, M., Costas, M. & Ribas, X. Nucleophilic Aryl Fluorination and Aryl Halide Exchange Mediated by a CuI/CuIII Catalytic Cycle. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 19386–19392 (2011).
202. Yao, B. *et al.* Cu(ClO₄)₂-Mediated Arene C–H Bond Halogenations of Azacalixaromatics Using Alkali Metal Halides as Halogen Sources. *J. Org. Chem.* **77**, 3336–3340 (2012).

203. Ye, Y., Schimler, S. D., Hanley, P. S. & Sanford, M. S. Cu(OTf)₂-Mediated Fluorination of Aryltrifluoroborates with Potassium Fluoride. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 16292–16295 (2013).
204. Taylor, N. J. *et al.* Derisking the Cu-Mediated ¹⁸F-Fluorination of Heterocyclic Positron Emission Tomography Radioligands. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 8267–8276 (2017).
205. Tredwell, M. *et al.* A General Copper-Mediated Nucleophilic ¹⁸F Fluorination of Arenes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 7751–7755 (2014).
206. Mossine, A. V. *et al.* Synthesis of [¹⁸F]Arenes via the Copper-Mediated [¹⁸F]Fluorination of Boronic Acids. *Org. Lett.* **17**, 5780–5783 (2015).
207. Wilson, T. C. *et al.* Radiosynthesis of SPECT tracers via a copper mediated ¹²³I iodination of (hetero)aryl boron reagents. *Chem. Commun.* **52**, 13277–13280 (2016).
208. Partridge, B. M. & Hartwig, J. F. Sterically Controlled Iodination of Arenes via Iridium-Catalyzed C–H Borylation. *Org. Lett.* **15**, 140–143 (2013).
209. Zhang, P. *et al.* A Highly Efficient Copper-Mediated Radioiodination Approach Using Aryl Boronic Acids. *Chem. Eur. J.* **22**, 16783–16786 (2016).
210. Reilly, S. W., Makvandi, M., Xu, K. & Mach, R. H. Rapid Cu-Catalyzed [²¹¹At]Astatination and [¹²⁵I]Iodination of Boronic Esters at Room Temperature. *Org. Lett.* **20**, 1752–1755 (2018).
211. Aaij, C., Tschroots, W. R. J. M., Lindner, L. & Feltkamp, T. E. W. The preparation of astatine labelled proteins. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **26**, 25–30 (1975).
212. Vaughan, A. T. M. & Fremlin, J. H. The preparation of astatine labelled proteins using an electrophilic reaction. *Int. J. Nucl. Med. Biol.* **5**, 229–230 (1978).
213. Vaughan, A. T. M. & Fremlin, J. H. The preparation of astatotyrosine. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **28**, 595–598 (1977).
214. Visser, G. W. M., Diemer, E. L. & Kaspersen, F. M. The nature of the astatine-protein bond. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **32**, 905–912 (1981).
215. Zalutsky, M. R. & Narula, A. S. Astatination of proteins using an N-succinimidyl tri-n-butylstannyl benzoate intermediate. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. A* **39**, 227–232 (1988).

216. Garg, P. K., Harrison, C. L. & Zalutsky, M. R. Comparative Tissue Distribution in Mice of the α -Emitter 211At and 131I as Labels of a Monoclonal Antibody and F(ab')₂ Fragment. *Cancer Res.* **50**, 3514–3520 (1990).
217. Wilbur, D. S. *et al.* Preparation and evaluation of para-[211At]astatobenzoyl labeled anti-renal cell carcinoma antibody A6H F(ab')₂. In vivo distribution comparison with para-[125I]iodobenzoyl labeled A6H F(ab')₂. *Nucl. Med. Biol.* **20**, 917–927 (1993).
218. Lindegren, S. *et al.* High-efficiency astatination of antibodies using N-iodosuccinimide as the oxidising agent in labelling of N-succinimidyl 3-(trimethylstannyl)benzoate. *Nucl. Med. Biol.* **28**, 33–39 (2001).
219. Ayed, T. *et al.* 211At-labeled agents for alpha-immunotherapy: On the in vivo stability of astatine-agent bonds. *Eur. J. Med. Chem.* **116**, 156–164 (2016).
220. Orlova, A. *et al.* Targeting against epidermal growth factor receptors. Cellular processing of astatinated EGF after binding to cultured carcinoma cells. *Anticancer Res.* **24**, 4035–4042 (2004).
221. Teze, D. *et al.* Targeted radionuclide therapy with astatine-211: Oxidative dehalogenation of astatobenzoate conjugates. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).
222. Aoki, M. *et al.* Preliminary Evaluation of Astatine-211-Labeled Bombesin Derivatives for Targeted Alpha Therapy. *Chem. Pharm. Bull.* **68**, 538–545 (2020).
223. Hadley, S. W., Wilbur, D. S., Gray, M. A. & Atcher, R. W. Astatine-211 labeling of an antimelanoma antibody and its Fab fragment using N-succinimidyl p-[211At]astatobenzoate: comparisons in vivo with the p-[125I]iodobenzoyl conjugate. *Bioconjugate Chem.* **2**, 171–179 (1991).
224. Yordanov, A. T. *et al.* Preparation and in vivo evaluation of linkers for 211At labeling of humanized anti-Tac. *Nucl. Med. Biol.* **28**, 845–856 (2001).
225. Reist, C. J., Foulon, C. F., Alston, K., Bigner, D. D. & Zalutsky, M. R. Astatine-211 labeling of internalizing anti-EGFRvIII monoclonal antibody using N-succinimidyl 5-[211At]astato-3-pyridinecarboxylate. *Nucl. Med. Biol.* **26**, 405–411 (1999).

226. Talanov, V. S. *et al.* Preparation and in vivo evaluation of novel linkers for ²¹¹At labeling of proteins. *Nucl. Med. Biol.* **31**, 1061–1071 (2004).
227. Talanov, V. S. *et al.* Preparation and in vivo evaluation of a novel stabilized linker for ²¹¹At labeling of protein. *Nucl. Med. Biol.* **33**, 469–480 (2006).
228. Garg, P. K., Garg, S. & Zalutsky, M. R. N-Succinimidyl 4-methyl-3-(tri-n-butylstannyl)benzoate: Synthesis and potential utility for the radioiodination of monoclonal antibodies. *Nucl. Med. Biol.* **20**, 379–387 (1993).
229. Schwarz, U. P. *et al.* Preparation of ²¹¹At-Labeled Humanized Anti-Tac Using ²¹¹At Produced in Disposable Internal and External Bismuth Targets. *Nucl. Med. Biol.* **25**, 89–93 (1998).
230. Vaidyanathan, G., Affleck, D. J., Bigner, D. D. & Zalutsky, M. R. N-succinimidyl 3-[²¹¹At]astato-4-guanidinomethylbenzoate: an acylation agent for labeling internalizing antibodies with α -particle emitting ²¹¹At. *Nucl. Med. Biol.* **30**, 351–359 (2003).
231. Dekempeneer, Y. *et al.* Labeling of Anti-HER2 Nanobodies with Astatine-211: Optimization and the Effect of Different Coupling Reagents on Their in Vivo Behavior. *Mol. Pharmaceutics* **16**, 3524–3533 (2019).
232. Barth, R. F., Coderre, J. A., Vicente, M. G. H. & Blue, T. E. Boron Neutron Capture Therapy of Cancer: Current Status and Future Prospects. *Clin. Cancer Res.* **11**, 3987–4002 (2005).
233. Wilbur, D. S., Hamlin, D. K. & Srivastava, R. R. Symposium abstract (continue in part IV). *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **35**, 199–200 (1994).
234. Sjöström, A. *et al.* Direct astatination of a tumour-binding protein, human epidermal growth factor, using nido-carborane as a prosthetic group. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **256**, 191–197 (2003).
235. Orlova, A. *et al.* Closo-dodecaborate (2-) anion as a potential prosthetic group for attachment of astatine to proteins. Aspects of the labelling chemistry with chloramine-T. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **43**, 251–260 (2000).

236. Wilbur, D. S., Chyan, M.-K., Hamlin, D. K. & Perry, M. A. Reagents for Astatination of Biomolecules. 3. Comparison of closo-Decaborate(2-) and closo-Dodecaborate(2-) Moieties as Reactive Groups for Labeling with Astatine-211. *Bioconjugate Chem.* **20**, 591–602 (2009).
237. Wilbur, D. S. *et al.* Reagents for Astatination of Biomolecules: Comparison of the in Vivo Distribution and Stability of Some Radioiodinated/Astatinated Benzamidyl and nido-Carboranyl Compounds. *Bioconjugate Chem.* **15**, 203–223 (2004).
238. Wilbur, D. S. *et al.* Reagents for Astatination of Biomolecules. 2. Conjugation of Anionic Boron Cage Pendant Groups to a Protein Provides a Method for Direct Labeling that is Stable to in Vivo Deastatination. *Bioconjugate Chem.* **18**, 1226–1240 (2007).
239. Wilbur, D. S. *et al.* Reagents for Astatination of Biomolecules. 4. Comparison of Maleimido-closo-Decaborate(2-) and meta-[211At]Astatobenzoate Conjugates for Labeling anti-CD45 Antibodies with [211At]Astatine. *Bioconjugate Chem.* **20**, 1983–1991 (2009).
240. Wilbur, D. S., Chyan, M.-K., Hamlin, D. K. & Perry, M. A. Preparation and In Vivo Evaluation of Radioiodinated closo-Decaborate(2-) Derivatives to Identify Structural Components That Provide Low Retention in Tissues. *Nucl. Med. Biol.* **37**, 167 (2010).
241. Fujiki, K. *et al.* 211At-labeled immunoconjugate via a one-pot three-component double click strategy: practical access to α -emission cancer radiotherapeutics. *Chem. Sci.* **10**, 1936–1944 (2019).
242. Pruszyński, M., Bilewicz, A., Wąs, B. & Petelenz, B. Formation and stability of astatide-mercury complexes. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **268**, 91–94 (2006).
243. Pruszyński, M., Bilewicz, A. & Zalutsky, M. R. Preparation of Rh[16aneS4-diol]211At and Ir[16aneS4-diol]211At Complexes as Potential Precursors for Astatine Radiopharmaceuticals. Part I: Synthesis. *Bioconjugate Chem.* **19**, 958–965 (2008).
244. Venkatesh, M. *et al.* An Rh-105 complex of tetrathiacyclohexadecane diol with potential for formulating bifunctional chelates. *Nucl. Med. Biol.* **23**, 33–40 (1996).

245. Pruszyński, M., Łyczko, M., Bilewicz, A. & Zalutsky, M. R. Stability and in vivo behavior of Rh[16aneS4-diol]211At complex: A potential precursor for astatine radiopharmaceuticals. *Nucl. Med. Biol.* **42**, 439–445 (2015).
246. Łyczko, M. *et al.* 211At labeled substance P (5–11) as potential radiopharmaceutical for glioma treatment. *Nucl. Med. Biol.* **53**, 1–8 (2017).
247. Rajerison, H. *et al.* Radioiodinated and astatinated NHC rhodium complexes: Synthesis. *Nucl. Med. Biol.* **41**, e23–e29 (2014).
248. Appelman, E. H. Solvent extraction studies of interhalogen compounds of astatine. *J. Phys. Chem.* **65**, 325–331 (1961).
249. Fischer, S., Dreyer, R. & Albrecht, S. Pseudohalogen compounds of astatine: Synthesis and characterization of At(I/-tricyanomethanide-and At(I/-azide-compounds. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **117**, 275–283 (1987).
250. Champion, J. *et al.* Determination of stability constants between complexing agents and At(I) and At(III) species present at ultra-trace concentrations. *Inorg. Chim. Acta* **362**, 2654–2661 (2009).
251. Dreyer, R., Dreyer, I., Fischer, S., Hartmann, H. & Rösch, F. Synthesis and characterization of cationic astatine compounds with sulphur-containing ligands stable in aqueous solutions. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **96**, 333–341 (1985).
252. Ludwig, R., Fischer, S., Dreyer, R., Jacobi, R. & Beger, J. Complex formation equilibria between astatine(I) and sulphur-containing chelating ligands. *Polyhedron* **10**, 11–17 (1991).
253. Fischer, S., Dreyer, R., Hussein, H., Weber, M. & Hartmann, H. Synthesis and first characterization of cationic At(I/-compounds with selenium-containing neutral ligands. *J. Radioanal. Nucl. Chem. Lett.* **119**, 181–191 (1987).
254. Ludwig, R., Dreyer, R. & Fischer, S. First Investigations of Complex Formation of At (I) with Phosphorous Organic Compounds. *Radiochim. Acta* **47**, 129–130 (1989).
255. Schumann, D., Milesz, S., Jovchev, M., So, B. C. & Khalkin, V. Nitrilotriacetate Complex of Univalent Astatine. *Radiochim. Acta* **56**, 173–176 (1992).

256. Milesz, S., Norseev, Yu. V., Szücs, Z. & Vasáros, L. Characterization of DTPA complexes and conjugated antibodies of astatine. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **137**, 365–372 (1989).
257. Milesz, S., Jovchev, M., Schumann, D., Khalkin, V. A. & Milanov, M. The EDTA complexes of astatine. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **127**, 193–198 (1988).
258. Wilbur, D. S., Chyan, M.-K. & Hamlin, D. An initial investigation of radiolabeling with higher oxidation states of astatine-211. Evaluation of chelation with DOTA and NOTA. *J. Nucl. Med.* **51**, 1454–1454 (2010).
259. Ning, L., Jiannan, J., Shangwu, M., Hengliu, C. & Yanping, Y. Preparation and preliminary evaluation of astatine-211 labeled IgG via DTPA anhydride. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **227**, 187–190 (1998).
260. Yordanov, A. T. *et al.* Synthesis and biodistribution study of a new ²¹¹At-calix[4]arene complex. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **43**, 1219–1225 (2000).
261. Lahiri, S., Roy, K. & Sen, S. Complexation study on no-carrier-added astatine with insulin: A candidate radiopharmaceutical. *Appl. Radiat. Isot.* **66**, 1901–1904 (2008).
262. Pozzi, O. R. & Zalutsky, M. R. Radiopharmaceutical Chemistry of Targeted Radiotherapeutics, Part 1: Effects of Solvent on the Degradation of Radiohalogenation Precursors by ²¹¹At α -Particles. *J. Nucl. Med.* **46**, 700–706 (2005).
263. Pozzi, O. R. & Zalutsky, M. R. Radiopharmaceutical Chemistry of Targeted Radiotherapeutics, Part 2: Radiolytic Effects of ²¹¹At α -Particles Influence N-Succinimidyl 3-²¹¹At-Astatobenzoate Synthesis. *J. Nucl. Med.* **46**, 1393–1400 (2005).
264. Pozzi, O. R. & Zalutsky, M. R. Radiopharmaceutical Chemistry of Targeted Radiotherapeutics, Part 3: α -Particle-Induced Radiolytic Effects on the Chemical Behavior of ²¹¹At. *J. Nucl. Med.* **48**, 1190–1196 (2007).
265. Lindegren, S. *et al.* Direct Procedure for the Production of ²¹¹At-Labeled Antibodies with an ϵ -Lysyl-3-(Trimethylstannyl)Benzamide Immunoconjugate. *J. Nucl. Med.* **49**, 1537–1545 (2008).

266. Aneheim, E. *et al.* Shelf-Life of ϵ -Lysyl-3-(Trimethylstannyl)Benzamide Immunoconjugates, Precursors for ^{211}At Labeling of Antibodies. *Cancer Biother. Radiopharm.* **30**, 41–45 (2015).
267. Aneheim, E., Jensen, H., Albertsson, P. & Lindegren, S. Astatine-211 labeling: a study towards automatic production of astatinated antibodies. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **303**, 979–983 (2015).
268. Aneheim, E. *et al.* Automated astatination of biomolecules – a stepping stone towards multicenter clinical trials. *Sci. Rep.* **5**, 1–11 (2015).
269. Walte, A. *et al.* Preparation and evaluation of ^{211}At labelled antineoplastic antibodies. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **10**, 277s–285s (2007).
270. Bourgeois, M. *et al.* Feasibility of the radioastatination of a monoclonal antibody with astatine-211 purified by wet extraction. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **51**, 379–383 (2008).
271. Chun, J.-H., Morse, C. L., Chin, F. T. & Pike, V. W. No-carrier-added ^{18}F fluoroarenes from the radiofluorination of diaryl sulfoxides. *Chem. Commun.* **49**, 2151–2153 (2013).
272. Mu, L. *et al.* ^{18}F -Radiolabeling of Aromatic Compounds Using Triarylsulfonium Salts. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 889–892 (2012).
273. Bongarzone, S. *et al.* Development of ^{18}F FAMTO: A novel fluorine-18 labelled positron emission tomography (PET) radiotracer for imaging CYP11B1 and CYP11B2 enzymes in adrenal glands. *Nucl. Med. Biol.* **68–69**, 14–21 (2019).
274. Rotstein, B. H. *et al.* Mechanistic studies and radiofluorination of structurally diverse pharmaceuticals with spirocyclic iodonium(III) ylides. *Chem. Sci.* **7**, 4407–4417 (2016).
275. Cardinale, J., Ermert, J., Humpert, S. & Coenen, H. H. Iodonium ylides for one-step, no-carrier-added radiofluorination of electron rich arenes, exemplified with 4-([^{18}F]fluorophenoxy)-phenylmethyl)piperidine NET and SERT ligands. *RSC Adv.* **4**, 17293–17299 (2014).
276. Rotstein, B. H., Stephenson, N. A., Vasdev, N. & Liang, S. H. Spirocyclic hypervalent iodine(III)-mediated radiofluorination of non-activated and hindered aromatics. *Nat. Commun.* **5**, ncomms5365 (2014).

277. Stephenson, N. A. *et al.* Iodonium Ylide–Mediated Radiofluorination of ¹⁸F-FPEB and Validation for Human Use. *J. Nucl. Med.* **56**, 489–492 (2015).
278. Varlow, C. *et al.* Revisiting the Radiosynthesis of [¹⁸F]FPEB and Preliminary PET Imaging in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Molecules* **25**, 982 (2020).
279. Ryzhakov, D. Mémoire de master : Synthèse et évaluation de précurseurs pour la substitution nucléophile aromatique par des radioisotopes de l’iode et de l’astate. (2016).
280. Barbosa, E. G. *et al.* A diaryl sulfide, sulfoxide, and sulfone bearing structural similarities to combretastatin A-4. *Eur. J. Med. Chem.* **44**, 2685–2688 (2009).
281. Sander, K. *et al.* Sulfonium Salts as Leaving Groups for Aromatic Labelling of Drug-like Small Molecules with Fluorine-18. *Sci. Rep.* **5**, 9941 (2015).
282. Cacheux, F. Thèse de doctorat : Synthèse de nouveaux ligands pour l’imagerie de la neuroinflammation par tomographie par émission de positons. (2017).
283. Preshlock, S. *et al.* Enhanced copper-mediated ¹⁸F-fluorination of aryl boronic esters provides eight radiotracers for PET applications. *Chem. Commun.* **52**, 8361–8364 (2016).
284. Zischler, J., Kolks, N., Modemann, D., Neumaier, B. & Zlatopolskiy, B. D. Alcohol-Enhanced Cu-Mediated Radiofluorination. *Chem. Eur. J.* **23**, 3251–3256 (2017).
285. Zhou, D., Chu, W., Voller, T. & Katzenellenbogen, J. A. Copper-mediated nucleophilic radiobromination of aryl boron precursors: Convenient preparation of a radiobrominated PARP-1 inhibitor. *Tetrahedron Lett.* **59**, 1963–1967 (2018).
286. Aneheim, E. *et al.* Toward elucidating the radiochemistry of astatine - Behavior in chloroform.
287. Wang, X. & Studer, A. Iodine(III) Reagents in Radical Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **50**, 1712–1724 (2017).
288. Hayasi, Y., Okada, T. & Kawanisi, M. Cyclic Diacylcarbene Generated from Iodonium Ylides and Diazodiketones. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **43**, 2506–2511 (1970).
289. Ichiishi, N. *et al.* Copper-Catalyzed [¹⁸F]Fluorination of (Mesityl)(aryl)iodonium Salts. *Org. Lett.* **16**, 3224–3227 (2014).

290. Yang, Y.-D. *et al.* Trifluoromethanesulfonyl Hypervalent Iodonium Ylide for Copper-Catalyzed Trifluoromethylthiolation of Enamines, Indoles, and β -Keto Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 8782–8785 (2013).
291. Navarro, L. Thèse de doctorat : Applications de la chimie bio-orthogonale au radiomarquage de vecteurs immunologiques à l'iode et à l'astate pour l'oncologie nucléaire. (Université de Nantes, 2018).
292. Nkepan, G. N., Hedrick, A. F., Awasthi, V. & Gali, H. Facile synthesis of para-[¹⁸F]fluorohippurate via iodonium ylide-mediated radiofluorination for PET renography. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **26**, 479–483 (2016).
293. Haskali, M. B. *et al.* An Investigation of (Diacetoxyiodo)arenes as Precursors for Preparing No-Carrier-Added [¹⁸F]Fluoroarenes from Cyclotron-Produced [¹⁸F]Fluoride Ion. *J. Org. Chem.* **81**, 297–302 (2015).
294. Zhdankin, V. V. & Protasiewicz, J. D. Development of new hypervalent iodine reagents with improved properties and reactivity by redirecting secondary bonds at iodine center. *Coord. Chem. Rev.* **275**, 54–62 (2014).
295. Webster, S. *et al.* Rapid Iododeboronation with and without Gold Catalysis: Application to Radiolabelling of Arenes. *Chem. Eur. J.* **24**, 937–943 (2018).
296. Aneheim, E. *et al.* Synthesis and Evaluation of Astatinated N-[2-(Maleimido)ethyl]-3-(trimethylstannyl)benzamide Immunoconjugates. *Bioconjugate Chem.* **27**, 688–697 (2016).
297. Dam, M. V., Wuenschell, G. E. & Arnold, F. H. Metal affinity precipitation of proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **11**, 492–502 (1989).
298. Glover, Z. K., Basa, L., Moore, B., Laurence, J. S. & Sreedhara, A. Metal ion interactions with mAbs: Part 1. *MAbs* **7**, 901–911 (2015).
299. Ramos Silva, M., Paixão, J. A., Matos Beja, A. & Alte da Veiga, L. Conformational flexibility of tricine as a chelating agent in catena-poly[[tricinato)copper(II)]- μ -chloro]. *Acta Crystallogr. C* **57**, 9–11 (2001).

300. Zayed, M. E. & Ammar, R. A. Some transition metal ions complexes of tricine (Tn) and amino acids: pH-titration, synthesis and antimicrobial activity. *J. Saudi Chem. Soc.* **18**, 774–782 (2014).
301. Nagaj, J. *et al.* Revised Coordination Model and Stability Constants of Cu(II) Complexes of Tris Buffer. *Inorg. Chem.* **52**, 13927–13933 (2013).
302. Alvarez-Dorta, D. *et al.* Electrochemically Promoted Tyrosine-Click-Chemistry for Protein Labeling. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 17120–17126 (2018).
303. Bodet-Milin, C. *et al.* Radioimmunotherapy of B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Front. Oncol.* **3**, (2013).
304. Zhou, D., Chen, L., Li, J. & Wu, F. Transition metal catalyzed sulfite auto-oxidation systems for oxidative decontamination in waters: A state-of-the-art minireview. *Chem. Eng. J.* **346**, 726–738 (2018).
305. Fichou, N. *et al.* Single-Dose Anti-CD138 Radioimmunotherapy: Bismuth-213 is More Efficient than Lutetium-177 for Treatment of Multiple Myeloma in a Preclinical Model. *Front. Med.* **2**, 76 (2015).
306. Navarro, A.-S. *et al.* TE1PA as Innovating Chelator for ⁶⁴Cu Immuno-TEP Imaging: A Comparative in Vivo Study with DOTA/NOTA by Conjugation on 9E7.4 mAb in a Syngeneic Multiple Myeloma Model. *Bioconjugate Chem.* **30**, (2019).
307. Gouard, S. *et al.* Targeted-Alpha-Therapy Combining Astatine-211 and anti-CD138 Antibody in a Preclinical Syngeneic Mouse Model of Multiple Myeloma Minimal Residual Disease. *Cancers* **12**, 2721 (2020).
308. Cox, P. A. *et al.* Base-Catalyzed Aryl-B(OH)₂ Protodeboronation Revisited: From Concerted Proton Transfer to Liberation of a Transient Aryl Anion. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 13156–13165 (2017).
309. Liu, C., Li, X., Wu, Y. & Qiu, J. Copper-catalyzed protodeboronation of arylboronic acids in aqueous media. *RSC Adv.* **4**, 54307–54311 (2014).
310. Nishinaka, I., Hashimoto, K. & Suzuki, H. Thin layer chromatography for astatine and iodine in solutions prepared by dry distillation. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **318**, 897–905 (2018).

311. Larsen, R. H. & Bruland, Ø. S. Radiolysis of radioimmunoconjugates. Reduction in antigen-binding ability by α -particle radiation. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **36**, 1009–1018 (1995).
312. Liu, S., Ellars, C. E. & Edwards, D. S. Ascorbic Acid: Useful as a Buffer Agent and Radiolytic Stabilizer for Metalloradiopharmaceuticals. *Bioconjugate Chem.* **14**, 1052–1056 (2003).
313. Rosenblat, T. L. *et al.* Sequential Cytarabine and α -Particle Immunotherapy with Bismuth-213–Lintuzumab (HuM195) for Acute Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res.* **16**, 5303–5311 (2010).
314. Autenrieth, M. E. *et al.* Treatment of carcinoma in situ of the urinary bladder with an alpha-emitter immunoconjugate targeting the epidermal growth factor receptor: a pilot study. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **45**, 1364–1371 (2018).
315. Clinical Trial of Ac225-PSMA Radioligand Therapy of Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04225910>.
316. Jurcic, J. *Postremission Therapy With Actinium-225 (225Ac)-Lintuzumab (Actimab-A®) in Patients With Acute Myeloid Leukemia*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03705858> (2019).
317. Orano Med LLC. *Phase I Trial of Intraperitoneal ²¹²Pb-TCMC-Trastuzumab for HER-2 Expressing Malignancy*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01384253> (2016).
318. Bayer. *An Open-label, First-in-human, Multi-center Study to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Anti-tumor Activity of a Thorium-227 Labeled Antibody-chelator Conjugate, BAY2287411 Injection, in Patients With Solid Tumors Known to Express Mesothelin*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03507452> (2020).
319. Lindegren, S. *et al.* Realizing Clinical Trials with Astatine-211: The Chemistry Infrastructure. *Cancer Biother. Radiopharm.* **35**, 425–436 (2020).
320. Wilbur, D. S. *et al.* Development of a Stable Radioiodinating Reagent to Label Monoclonal Antibodies for Radiotherapy of Cancer. *J. Nucl. Med.* **30**, 216–226 (1989).
321. Jadvar, H., Chen, X., Cai, W. & Mahmood, U. Radiotheranostics in Cancer Diagnosis and Management. *Radiology* **286**, 388–400 (2018).

322. Weineisen, M. *et al.* ^{68}Ga - and ^{177}Lu -Labeled PSMA I&T: Optimization of a PSMA-Targeted Theranostic Concept and First Proof-of-Concept Human Studies. *J. Nucl. Med.* **56**, 1169–1176 (2015).
323. Lee, B. C. *et al.* Synthesis and biological evaluation of RGD peptides with the $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$ chelated iminodiacetate core: highly enhanced uptake and excretion kinetics of theranostics against tumor angiogenesis. *RSC Adv.* **3**, 782–792 (2012).
324. Crawford, J. R. *et al.* Evaluation of ^{209}At as a theranostic isotope for ^{209}At -radiopharmaceutical development using high-energy SPECT. *Phys. Med. Biol.* **63**, 045025 (2018).
325. Ogawa, K. *et al.* Radiotheranostics Coupled between an At-211-Labeled RGD Peptide and the Corresponding Radioiodine-Labeled RGD Peptide. *ACS Omega* **4**, 4584–4591 (2019).
326. Boutureira, O. & Bernardes, G. J. L. Advances in Chemical Protein Modification. *Chem. Rev.* **115**, 2174–2195 (2015).
327. Schlick, T. L., Ding, Z., Kovacs, E. W. & Francis, M. B. Dual-Surface Modification of the Tobacco Mosaic Virus. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 3718–3723 (2005).
328. Gavriluk, J., Ban, H., Nagano, M., Hakamata, W. & Barbas, C. F. Formylbenzene Diazonium Hexafluorophosphate Reagent for Tyrosine-Selective Modification of Proteins and the Introduction of a Bioorthogonal Aldehyde. *Bioconjugate Chem.* **23**, 2321–2328 (2012).
329. Zhang, Y., Park, K.-Y., Suazo, K. F. & Distefano, M. D. Recent progress in enzymatic protein labelling techniques and their applications. *Chem. Soc. Rev.* **47**, 9106–9136 (2018).
330. Theile, C. S. *et al.* Site-specific N-terminal labeling of proteins using sortase-mediated reactions. *Nat. Protoc.* **8**, 1800–1807 (2013).
331. Guimaraes, C. P. *et al.* Site-specific C-terminal and internal loop labeling of proteins using sortase-mediated reactions. *Nat. Protoc.* **8**, 1787–1799 (2013).

Communications Scientifiques

➤ Publications

Laurent Navarro, **Marion Berdal**, Michel Chérel, Frédéric Pecorari, Jean-François Gestin, François Guérard, Prosthetic groups for radioiodination and astatination of peptides and proteins: a comparative study of five potential biorthogonal labelling strategies, *Bioorg. Med. Chem.*, 27, 167-174 (2019)

Marion Berdal, Sébastien Gouard, Romain Eychenne, Séverine Marionneau-Lambot, Mikaël Croyal, Alain Faivre-Chauvet, Joëlle Gaschet, Jean-François Gestin, François Guérard, Investigation on the reactivity of nucleophilic radiohalogens with arylboronic acids in water: access to an efficient single-step method for the radioiodination and the astatination of antibodies, *Chem. Sci.* (2020) doi:10.1039/D0SC05191H.

➤ Brevet

Europe n°19305563.9 05/02/2020, **Marion Berdal**, Alain Faivre-Chauvet, Jean-François Gestin, François Guérard, Direct nucleophilic radioiodination and astatination of proteins via pre-conjugated arylboronic acids

➤ Communications orales et posters

Marion Berdal, Laurent Navarro, Sébastien Gouard, Séverine Marionneau-Lambot, Mikaël Croyal, Cyrille Alliot, Joëlle Gaschet, Michel Chérel, Alain Faivre Chauvet, Jean-François Gestin, François Guérard, *Improved [²¹¹At]astatination and [¹²⁵I]iodination of antibodies using arylboronic acids*, European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals (ESRR), Vérone, Italie, 26 – 29 Novembre 2020 (Présentation orale)

Marion Berdal, Laurent Navarro, Sébastien Gouard, Séverine Marionneau-Lambot, Mikaël Croyal, Cyrille Alliot, Joëlle Gaschet, Michel Chérel, Alain Faivre Chauvet, Jean-François Gestin, François Guérard *Direct method for astatination and radioiodination of monoclonal antibodies using arylboronic acids*, Cafachem, évènement virtuel, 26 – 28 Août 2020 (Présentation orale)

Marion Berdal, Laurent Navarro, Cyrille Alliot, Michel Chérel, Alain Faivre Chauvet, Jean-François Gestin, François Guérard, *Simplified access to astatinated and radioiodinated antibodies by direct*

nucleophilic substitution of preconfugated arylboronic acids, Nuclear Technologies of Health Symposium (NTHS), Nantes, France, 13 – 14 Février 2020 (Présentation orale)

Marion Berdal, Laurent Navarro, Cyrille Alliot, Mikaël Croyal, Michel Chérel, Alain Faivre Chauvet, Jean-François Gestin, François Guérard, *A universal method for the radioiodination and astatination of antibodies: easy access to I/At based theranostic tools*, Imaging of diagnostic and therapeutic biomarkers in Oncology Workshop, Le Bono, France, 25 – 28 Octobre 2019 (Présentation orale et poster)

Marion Berdal, Laurent Navarro, Cyrille Alliot, Michel Chérel, Alain Faivre Chauvet, Jean-François Gestin, François Guérard, *Direct nucleophilic radioiodination and astatination of antibodies via pre-conjugated arylboronic acids*, international Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (ISRS), Beijing, Chine, 23 – 31 Mai 2019 (Présentation Poster)

Annexe

➤ Droit et permission des images utilisées

Kentaro Fujiwara *et al*²⁰ : Article en libre accès sous les termes de la licence Creative Commons CC BY

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet?title=111In-labeled%20anti-cadherin17%20antibody%20D2101%20has%20potential%20as%20a%20noninvasive%20imaging%20probe%20for%20diagnosing%20gastric%20cancer%20and%20lymph-node%20metastasis&author=Kentaro%20Fujiwara%20et%20al&contentID=10.1007%2Fs12149-019-01408-y&publication=0914-7187&publicationDate=2019-10-12&publisherName=SpringerNature&orderBeanReset=true&oa=CC%20BY>

Titre : Exploration de nouvelles voies de radiomarquage avec l'astate-211 sous forme nucléophile : application à la préparation de radioimmunoconjugués pour la thérapie alpha vectorisée des cancers

Mots clés : astate-211, iode-125, anticorps, acides arylboroniques, radiomarquage

Résumé : L'astate-211 est un radionucléide prometteur pour la thérapie alpha vectorisée des cancers. Cependant, les méthodes actuelles de radiomarquage d'anticorps avec ce radiohalogène présentent de nombreuses limites telles que des rendements non-optimaux ou l'utilisation de précurseurs toxiques, ce qui complique son transfert en clinique. Afin de proposer des alternatives plus viables, l'exploration de nouvelles classes de précurseurs permettant le radiomarquage avec l'astate-211 et l'iode-125 sous forme nucléophile a été menée. Dans un premier temps, la synthèse de composés modèles pour chacune de ces classes et leur comparaison en termes d'efficacité a été réalisée afin d'identifier les plus adaptées pour le radiomarquage avec ces deux radionucléides.

Dans une deuxième partie, la faisabilité d'un radiomarquage d'anticorps à l'astate-211 et à l'iode-125 en une seule étape, utilisant les acides arylboroniques, a été investiguée. Dans un premier temps, l'étude de réactivité sur un composé modèle simple a été effectuée afin d'identifier des conditions efficaces en milieu aqueux et à basse température avant de transférer cette approche à un anticorps anti-CD138 d'intérêt pour le ciblage du myélome multiple. Le nouveau procédé ainsi développé surpasse les autres méthodes rapportées dans la littérature et a été validé par des études précliniques de biodistributions. Cette nouvelle méthode de radiomarquage devrait faciliter le passage de l'astate-211 en clinique et permettre le développement d'outils théranostiques basés sur la paire astate/iode.

Title: Exploration of new radiolabelling pathways with nucleophilic astatine-211: application to the preparation of radioimmunoconjugates for targeted alpha therapy of cancers

Keywords: astatine-211, iodine-125, antibody, arylboronic acids, radiolabelling

Abstract: Astatine-211 is a promising radionuclide for targeted alpha therapy of cancers. However, current approaches to bind this radiohalogen to an antibody exhibit limitations such as suboptimal radiochemical yields or the use of toxic precursors, which complicates its clinical transfer. In order to find better alternatives, we explored new classes of precursors, which allow the radiolabelling with astatine-211 and iodine-125 in their nucleophilic form. First, the synthesis of model compounds for each class and the comparison of their efficiency were performed to identify the most promising ones for the radiolabelling with both radionuclides.

In a second part, the feasibility of the one-step radiolabelling of antibodies with astatine-211 and iodine-125 using arylboronic acids has been investigated. First, the study on a model compound was conducted in order to identify efficient conditions in aqueous medium and at low temperature before transferring this approach to an anti-CD138 antibody of interest for targeting multiple myeloma. The new process developed outperforms others methods reported in the literature and has been validated in preclinical biodistribution studies. This new radiolabelling method will ease the clinical transfer of astatine-211 as well as the development of theranostic tools based on the astatine/iodine pair.