

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : **2 921 838**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **07 58103**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : **A 61 K 49/18** (2006.01), B 82 B 1/00, A 61 K 9/51, 33/  
24, 47/02, G 01 N 33/553

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 05.10.07.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 10.04.09 Bulletin 09/15.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *GUERBET Société anonyme* — FR.

⑦2 Inventeur(s) : PORT MARC et ROUSSEAUX OLI-  
VIER.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET LAVOIX.

⑤4 **NOUVEAU PROCÉDE DE PREPARATION DE NANOPARTICULES RECOUVERTES D'UNE COUCHE  
STABILISATRICE GEM-BISPHOSPHONATE COUPLÉE A DES LIGANDS DE BIODISTRIBUTION  
HYDROPHILE.**

⑤7 L'invention concerne un nouveau procédé de prépara-  
tion de nanoparticules pour l'imagerie médicale comprenant  
un noyau métallique, une couche stabilisatrice organique à  
base de composés gem-bisphosphonate et au moins un li-  
gand de biodistribution hydrophile.

FR 2 921 838 - A1



NOUVEAU PROCÉDÉ DE PRÉPARATION DE NANOPARTICULES  
RECOUVERTES D'UNE COUCHE STABILISATRICE GEM-BISPHOSPHONATE  
COUPLÉE À DES LIGANDS DE BIODISTRIBUTION HYDROPHILE

5 L'invention concerne un nouveau procédé de préparation de nanoparticules pour l'imagerie médicale comprenant un noyau métallique, une couche stabilisatrice organique et au moins un ligand de ciblage d'un tissu pathologique.

On connaît des nanoparticules métalliques utilisées en imagerie de diagnostique, notamment en imagerie par résonance magnétique IRM, comportant  
10 un noyau métallique, recouvert d'une couche organique stabilisatrice couplée le cas échéant à des ligands de ciblage biologique.

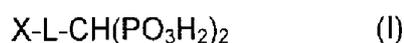
Parmi ces nanoparticules, on connaît notamment des nanoparticules métalliques couramment désignées USPIO qui sont de très petites particules d'oxyde de fer, dont notamment de magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), de maghémite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) et  
15 autres composés minéraux magnétiques d'éléments de transition, de taille inférieure à environ 100-150 nm.

Pour obtenir des solutions colloïdales de particules magnétiques, stables en milieu physiologique, il est nécessaire de conditionner la surface des particules magnétiques. Pour cela, on recouvre la particule d'une couche organique  
20 stabilisatrice constituée de macromolécules telles que des carbohydrates comme le dextran, ou de petites molécules organiques telles que des acides carboxyliques.

Afin d'obtenir des informations pertinentes pour le diagnostic par imagerie médicale, il est très avantageux de coupler ces dernières à des ligands de ciblage appropriés, de manière à ce que les particules se lient à et/ou soient reconnues par des cellules ou tissus cibles. Cette reconnaissance peut être avantageusement assurée à l'aide de ligands ayant un effet sur la biodistribution du produit, par exemple par un mécanisme de type phagocytose de la particule par des cellules du système immunitaire telles que les macrophages. Ces ligands sont par exemple des groupements hydrophiles tels que des groupements aminoalcool, ou des composés de type polyéthylène glycol (PEG).

Le document WO 2004/058275 décrit la synthèse de composés utilisant, comme couche de stabilisation/d'attache, une couche de type *gem*-bisphosphonate, et comme ligand, parmi les nombreux ligands possibles, des groupements hydrophiles à effet sur la biodistribution (ligands de biodistribution). Il est en particulier décrit des composés se présentant sous la forme d'un noyau N métallique recouverts d'éléments de ciblage de formule S-C, dans laquelle :

- S est un groupement *gem*-bisphosphonate greffé au noyau et de formule (I)



- C est un ligand hydrophile (couplée à la fonction X) de type aminoalcool et/ou de type PEG ;

avec :

- L représente un groupement organique reliant la fonction X à la fonction *gem*-bisphosphonate  $-\text{CH(PO}_3\text{H}_2)_2$  ;
- X représente une fonction chimique capable d'être couplée au ligand hydrophile C.

Pour la préparation de ces composés, le procédé antérieur (utilisé de manière générale pour les USPIO) comprend schématiquement les étapes suivantes :

- préparation du noyau métallique N des nanoparticules métalliques
- enrobage du noyau N avec la couche stabilisatrice *gem*-bisphosphonate de formule



- couplage de la particule obtenue avec le ou les groupes hydrophiles.

On cherche à améliorer ce procédé pour obtenir des composés dont la quantité de ligand greffée est parfaitement maîtrisée, afin d'optimiser et de contrôler avec reproductibilité le taux de greffage sur le noyau, d'éviter des étapes de purification et de simplifier la maîtrise pharmaceutique en minimisant les risques de contamination bactérienne ou pyrogène, et ainsi d'obtenir une fabrication du produit performante au niveau industriel.

Le demandeur a réussi à résoudre ce problème technique grâce à un procédé (désigné voie inverse) de préparation selon lequel on prépare des éléments constitués par un ou plusieurs ligands hydrophiles couplés chimiquement avec des groupements organiques de liaison *gem*-bisphosphonate, puis ces éléments [groupement de liaison-ligand] sont couplés aux nanoparticules métalliques. Les groupements organiques de liaison appartiendront ou formeront la couche stabilisatrice (ou d'attache).

A cet effet, l'invention concerne un procédé de préparation de nanoparticules métalliques comprenant un noyau métallique N recouvert d'une couche stabilisatrice organique couplée à au moins un ligand hydrophile à effet sur la stabilité/biodistribution des nanoparticules, le procédé comprenant les étapes de :

- a) préparation du noyau métallique N des nanoparticules métalliques ;
- b) préparation d'éléments de ciblage/stabilisation de formule S-C dans laquelle :
  - 15 - S est un groupe d'attache *gem*-bisphosphonate de formule  $X-L-CH(PO_3H_2)_2$  ;
  - C est un ligand de biodistribution hydrophile, avantageusement choisi parmi les aminoalcools ou les PEG ;
- c) greffage sur le noyau N d'au moins un élément de ciblage.

20

Par souci de simplicité, dans la demande, on utilisera pour l'expression éléments de ciblage/stabilisation, l'expression "éléments de ciblage".

Par l'expression "greffage sur le noyau N d'au moins un élément de ciblage", on entend que l'on greffe des ensembles de ciblage de même structure, ou plusieurs ensembles de ciblage dont les groupes S et/ou les groupes C n'ont pas la même formule.

L'avantage d'avoir des groupes S différents est notamment de pouvoir augmenter ou réduire la taille hydrodynamique de l'agent de contraste (en faisant varier la taille des groupes L), ce qui permet de contribuer à optimiser la biodistribution du produit en fonction de l'indication diagnostique concernée.

30

Selon des réalisations, les éléments de ciblage sont des aminoalcools.

Selon des réalisations, les éléments de ciblage sont des PEG.

Selon des réalisations, une partie des éléments de ciblage sont des aminoalcools, et une autre partie des éléments de ciblage sont des PEG. Les  
5 ligands peuvent être identiques ou différents entre les éléments de ciblage greffés.

Selon des réalisations, les nanoparticules métalliques obtenues après greffage auront ainsi, par exemple, 10 à 90% des éléments de ciblage avec un ligand hydrophile ayant un effet avantageux sur la biodistribution et/ou la stabilité  
10 différents), et le complément (90 à 10%) des éléments de ciblage avec un ligand différent.

Selon des réalisations, on greffe sur le noyau d'une part des éléments de ciblage S-C (porteurs de groupes hydrophiles), et d'autre part des groupes de stabilisation S non porteurs de ligands de biodistribution. On aura par exemple  
15 95% de groupes S-C et le complément (95 à 5%) de groupes S.

Le tableau en fin de description détaillée illustre différentes possibilités.

Ces taux correspondent au taux de couverture du noyau par les éléments S ou S-C (au niveau des sites de fixation possible, typiquement les sites protonés localisés à la surface de la nanoparticule). Ainsi, pour un taux de couverture de  
20 100%, la surface du noyau sera sensiblement totalement recouverte par des éléments S-C et/ou S (par exemple 80% de groupes S-C et 20% de groupes S). Ce taux de couverture est ainsi distinct du taux de greffage décrit ci-après.

Les nanoparticules métalliques ont un diamètre hydrodynamique de l'ordre de 10 à 100 nm, et notamment de 10 à 50 nm.

25 Chaque groupement S d'un ensemble de ciblage comprend au moins une partie de liaison au noyau, et au moins une fonction chimique X de couplage avec un ligand C, plus précisément de liaison covalente à une fonction réactive du ligand.

30 Les étapes a) et b) peuvent être réalisés dans n'importe quel ordre mais avant l'étape c).

L'ensemble des groupements S greffés sur le noyau N constitue la couche d'attache (stabilisatrice). Le taux de greffage (pourcentage en mol de composé S-C et/ou S par mol de fer ; le taux de greffage est déterminé à partir des dosages de phosphore) des éléments de ciblage S-C et/ou S sur le noyau N est typiquement compris entre 0,5 et 10%, notamment 1 à 5%, par exemple 1, 2, 3, 5, 10%, pour une taille cristalline du noyau de l'ordre de 7-8 nm.

Selon des réalisations, en plus des éléments de ciblage S-C, on greffe aussi des groupes ayant un effet sur la stabilité de la nanoparticule, par exemple des acides hydroxy mono carboxyliques, par exemple choisi parmi les suivants : acide gluconique, acide oxalique, acide mandélique, acide 4-hydroxy-3-méthoxy-mandélique, acide lactobionique, acide alpha-hydroxyhippurique, acide méthyl 2-hydroxybutyrique, acide glycolique, acide N-acétylneuraminique, acide phospho-énolpyruvique.

De manière ainsi très avantageuse, on peut parfaitement contrôler le taux de greffage des nanoparticules en composés porteurs de ligands, ce qui est très utile pour le coût, l'analyse et la caractérisation et le contrôle de l'efficacité physiologique du produit. La fabrication des éléments de ciblage S-C est par ailleurs totalement maîtrisée, en particulier leur pureté avant le greffage, ce qui est majeur pour la fabrication industrielle.

On décrit maintenant plus précisément le noyau N. Le noyau métallique des nanoparticules préparées est typiquement composé en tout ou partie d'hydroxyde de fer ; d'oxyde de fer hydraté ; d'oxydes de fer mixtes tels que des oxydes de fer mixtes de cobalt, de nickel, de manganèse, de béryllium, de magnésium, de calcium, de baryum, de strontium, de cuivre, de zinc ou de platine ; ou d'un mélange de ceux-ci. Le terme "ferrite" désigne les oxydes de fer de formule générale  $[x\text{Fe}_2\text{O}_3, y \text{MOz}]$ , où M désigne un métal magnétisable sous l'effet d'un champ magnétique tel que Fe, Co, Ru, Mg, Mn, le métal magnétisable pouvant être éventuellement radioactif. De façon préférentielle, les particules magnétiques des compositions de l'invention comprennent une ferrite, notamment la maghémite ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) et la magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), ou encore les ferrites mixtes de cobalt ( $\text{Fe}_2\text{CoO}_4$ ) ou de manganèse ( $\text{Fe}_2\text{MnO}_4$ ). Le noyau de la nanoparticule a été rendu acide pour faciliter le couplage des éléments S-C. Le procédé de préparation du noyau

acide (avec étape utilisant l'acide nitrique) est décrit en détail dans le document WO 2004058275 (US 2004253181, notamment les paragraphes 331 à 339, page 19). Il est rappelé que ce procédé avec étape d'acidification (à pH fortement acide – typiquement entre 1 et 3) avant la fixation des groupes S et/ou S-C, permet  
5 d'obtenir des particules particulièrement avantageuses dont la polydispersité est totalement maîtrisée et qui sont en solution colloïdale stable.

On décrit maintenant les groupes L. A titre préféré, le groupe de liaison L est un groupement divalent, de préférence choisi parmi :

- un groupe aliphatique ; alicyclique ; alicyclique-aliphatique ; aromatique ;  
10 aromatique-aliphatique, lesdits groupes aliphatiques, alicycliques et aromatiques pouvant être éventuellement substitués par un groupe méthyle, hydroxy, méthoxy, acétoxy, amido, ou un atome de chlore, d'iode ou de brome ;

- un groupement  $-L_1-NHCO-L_2$  où  $L_1$  et  $L_2$  sont soit identiques, soit différents  
15 et représentent un groupe aliphatique ; alicyclique ; aromatique ; alicyclique-aliphatique ou aromatique-aliphatique, lesdits groupes pouvant être éventuellement substitués par un groupe méthyle, hydroxy, méthoxy, acétoxy, amido ou un atome de chlore, d'iode ou de brome.

Un groupe aliphatique désigne ici une chaîne hydrocarbonée linéaire ou  
20 ramifiée comportant de préférence de 1 à 16 atomes de carbone, mieux encore de 1 à 6 atomes de carbone. Des exemples en sont notamment les radicaux méthyle, éthyle, propyle, isopropyle, butyle, tert-butyle, isobutyle, pentyle et hexyle.

Le terme "alicyclique" désigne une chaîne hydrocarbonée cyclique  
comportant de préférence de 3 à 8 atomes de carbone. A titre d'exemple, on citera  
25 notamment le cyclopropyle et le cyclohexyle.

Le terme "aromatique" représente un groupement hydrocarboné mono- ou polycyclique aromatique comprenant préférentiellement de 5 à 20 atomes de carbone, mieux encore de 6 à 18. Des exemples en sont notamment les radicaux phényles et 1- ou 2-naphtyles. Selon une variante particulière, un groupe  
30 "aromatique" au sens de l'invention peut intégrer un ou plusieurs hétéroatomes tels que le soufre, l'oxygène ou l'azote. Dans ce cas particulier, le groupe "aromatique" désigne un groupement hétéroaromatique mono- ou polycyclique.

Les groupes "aliphatique-alicyclique" et "aliphatique-aromatique" représentent des chaînes aliphatiques répondant à la définition susmentionnée, substituées par respectivement un groupement alicyclique ou aromatique tels que définis ci-dessus. A titre d'exemple de groupe aliphatique-aromatique, on peut  
5 notamment citer le benzyle.

Selon une variante préférée, L représente un groupe phénylène éventuellement substitué, les groupements X et *gem*-bisphosphonates pouvant être en position ortho, méta ou para.

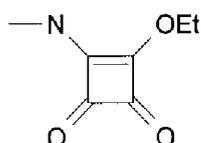
10 Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, L représente un groupe aliphatique substitué ou non, et plus préférentiellement un groupe  $-(CH_2)_p-$ , où p est un entier de 1 à 5.

Selon un autre mode préférentiel, L représente un groupe  $L_1-CONH-L_2$  et plus préférentiellement un groupe  $-(CH_2)_n-NHCO-(CH_2)_m-$  où n et m représentent  
15 un nombre entier de 0 à 5.

L'extrémité X du composé *gem*-bisphosphonate de formule (I) est choisie de telle sorte qu'elle soit susceptible de réagir et de former une liaison covalente avec une fonction présente sur le biovecteur. Pour plus d'informations concernant ces couplages, on pourra se référer notamment à l'ouvrage *Bioconjugate techniques*,  
20 Greg T. Hermanson, 1995, Publisher : Academic, San Diego, Calif.

A titre de groupes X préférés, on peut citer notamment :

- $-COOH$ ,
- $-NH_2$ ,  $-NCS$ ,  $-NH-NH_2$ ,  $-CHO$ , alkylpyrocarbonyle ( $-CO-O-CO-alk$ ), acylazidyle ( $-CO-N_3$ ), iminocarbonate ( $-O-C(NH)-NH_2$ ), vinylsulfuryle ( $-S-$   
25  $CH=CH_2$ ), pyridyldisulfuryle ( $-S-S-Py$ ), haloacétyle, maléimidyle, dichlorotriazinyle, halogène,
- le groupe de formule :

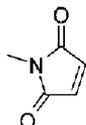


- les groupes  $-\text{COOH}$  et  $-\text{NH}_2$  étant particulièrement préférés.

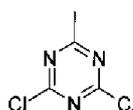
Le terme "alk" désigne au sens de la présente description un radical alkyle en  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , le terme "Py" désignant quant à lui un radical pyridyle.

Le radical maléimidyle désigne un radical cyclique de formule :

5



Le radical dichlorotriazinyle désigne un radical de formule :



Parmi les groupes halogènes, on peut citer notamment le chlore, le brome, le fluor et l'iode, le chlore et le brome étant particulièrement préférés.

10 Par "haloacétyl", au sens de la présente description, on entend un radical acétyl  $\text{CH}_3\text{-CO-}$ , dont l'un des atomes d'hydrogène est substitué par un atome d'halogène, celui-ci étant tel que défini précédemment.

De préférence, X représente un groupe  $-\text{COOH}$  ou  $-\text{NH}_2$  et L un groupe aliphatique substitué ou non, mieux encore un groupe  $-(\text{CH}_2)_p-$ , où p est un entier de 1 à 5.

15

On préfère tout particulièrement le composé de formule (Ia)

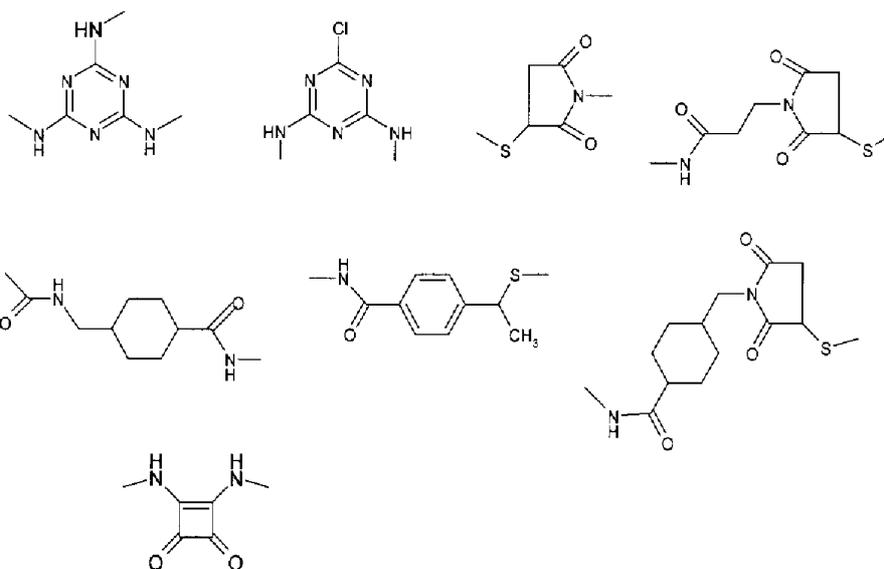


20 Selon un autre mode préférentiel, L représente un groupe  $\text{L}_1\text{-CONH-L}_2$  et plus préférentiellement un groupe  $-(\text{CH}_2)_n\text{-NHCO}-(\text{CH}_2)_m-$  où n et m représentent un nombre entier de 0 à 5 et X représente  $-\text{COOH}$  ou  $-\text{NH}_2$ .

Bien entendu, entre également dans le cadre de l'invention le couplage de la fonction X et du biovecteur de façon indirecte, c'est-à-dire via un réactif homobifonctionnel ou hétérobifonctionnel. A titre illustratif de réactif homo-  
25 bifonctionnel, le glutaraldéhyde peut convenir pour réaliser le couplage, par exemple, d'une fonction  $\text{X} = -\text{NH}_2$  avec une fonction  $-\text{NH}_2$  du biovecteur.

Selon une variante préférée de l'invention, les fonctions X forment une liaison covalente L<sub>3</sub> avec le biovecteur de type

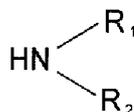
- CONH-, -COO-, -NHCO-, -OCO-, -NH-CS-NH-, -C-S-, -N-NH-CO-, -CO-NH-N-, -CH<sub>2</sub>-NH-, -N-CH<sub>2</sub>-, -N-CS-N-, -CO-CH<sub>2</sub>-S-, -N-CO-CH<sub>2</sub>-S-, -N-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, -CH=NH-NH-, -NH-NH=CH-, -CH=N-O-, -O-N=CH- ou répondant aux formules suivantes :



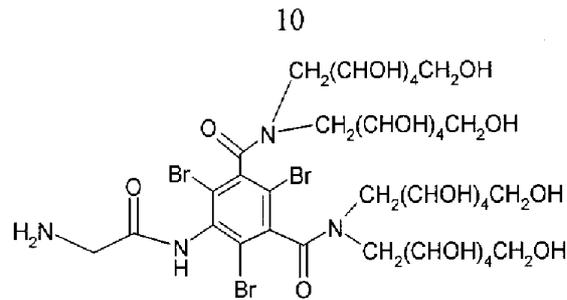
- Tout ou partie, et typiquement de l'ordre de 50 à 100%, notamment 50, 60, 70, 80, 80, 95% des fonctions X du composé *gem*-bisphosphonate sont couplées à un ligand de biodistribution.

On décrit maintenant plus précisément les ligands hydrophiles utilisés.

On cite en particulier des composés les aminoalcools de formule générale (II)



- dans laquelle R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> sont identiques ou différents et représentent une chaîne hydrocarbonée aliphatique comportant de 2 à 6 atomes de carbone, substituée de préférence par 6 à 10 groupements hydroxyles, ou bien par 4 à 8 groupements hydroxyles dans le cas où R<sub>1</sub> et/ou R<sub>2</sub> est interrompu, notamment pour lesquels R<sub>1</sub> représente un groupe -(CH<sub>2</sub>)-(CHOH)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>OH ou -(CH<sub>2</sub>)-CHOH-CH<sub>2</sub>OH et R<sub>2</sub> un groupe -CH<sub>2</sub>-(CHOH)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>OH, et en particulier le groupe



Parmi les polyéthylèneglycols, on préfère particulièrement les composés de formule (II) dans laquelle  $R_1$  et  $R_2$ , identiques ou différents, représentent H, un groupe alkyle ou une chaîne polyéthylèneglycol de formule  $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_k-\text{CH}_2\text{OR}_3$  dans laquelle  $k$  varie de 2 à 100 (par exemple 2, 4, 6, 10, 50), et  $R_3$  est choisi parmi H, alkyle ou  $-(\text{CO})\text{Alk}$ , le terme "alkyle" ou "alk" désignant un groupe aliphatique hydrocarboné, linéaire ou ramifié, ayant environ de 1 à 6 atomes de carbone dans la chaîne. Des exemples d'aminopolyéthylèneglycols sont notamment les composés O-(2-aminoéthyl)-O'-méthylpolyéthylèneglycol 1100, O-(2-aminoéthyl)-O'-méthylpolyéthylèneglycol 2000, O-(2-aminoéthyl)-O'-méthylpolyéthylèneglycol 750, les composés PEG 340, PEG 750, PEG 1500, PEG2000 par exemple.

Le demandeur a noté en particulier, pour les ligands aminoalcool et/ou PEG, que non seulement la synthèse est facilitée et avec un rendement amélioré, mais en plus que le produit final obtenu répond de manière très satisfaisante aux spécifications réglementaires et à l'utilisation diagnostique. La couverture de la quasi-totalité du noyau par ces groupements confère au produit une stabilité et une biodistribution particulièrement avantageuses pour ces ligands hydrophiles, notamment en améliorant la furtivité (le produit est alors avantageusement moins capté par le foie) et la captation macrophagique (le ciblage des macrophages est amélioré, avec un intérêt notamment pour le suivi des plaques d'athérome, des ganglions et autres zones d'inflammation).

L'invention concerne aussi l'utilisation des nanoparticules obtenues par le procédé du demandeur pour la préparation d'une composition diagnostique ou thérapeutique. Les nanoparticules sont en particulier utilisées comme agent de contraste de type composition de nanoparticules telles que décrites en détail dans le document WO 2004058275, pour l'imagerie IRM ou scanner RX.

Selon des réalisations, les particules sont véhiculées dans des systèmes de libération de principes actifs, tels que des systèmes d'encapsulation de type liposomes ou nanoparticules lipidiques solides qui peuvent également enfermer, en plus des nanoparticules utilisées comme agent de diagnostic, des principes  
5 actifs thérapeutiques.

L'invention a également pour objet les éléments de ciblage S-C tels que définis ci-dessus, utiles selon le procédé de l'invention.

10 L'invention est illustrée à l'aide des exemples détaillés suivants.

Dans ce qui suit, les abréviations M, M/L, M théorique, N et M/z, ES<sup>+</sup>, ES, kD et CCM ont les mêmes significations que dans le document WO 2004/058275 (US2004/253181) :

M ou M/L : concentration molaire (mole/litre).

15 M théorique : masse moléculaire théorique.

N : normalité.

M/z : masse sur charge déterminée par spectrométrie de masse.

ES<sup>+</sup> : électrospray mode positif.

ES<sup>-</sup> : électrospray mode négatif.

20 TFA : acide trifluoroacétique.

kD : unité de masse moléculaire (kiloDalton).

CCM : Chromatographie sur Couche Mince.

Z ave : diamètre hydrodynamique mesuré par PCS.

Poly  $\sigma$  : polydispersité mesurée par PCS.

25 La nomenclature chimique qui suit est issue du logiciel ACD/NAME (société Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada), selon les règles IUPAC.

Dosage du fer total :

30 Le fer est dosé par spectroscopie d'absorption atomique (Spectrophotomètre VARIAN AA10) après minéralisation par HCl concentré et dilution par rapport à une gamme étalon d'ions ferrique (0, 5, 10, 15 et 20 ppm).

Taille des particules :

- Diamètre hydrodynamique de la particule greffée (Z ave) = Taille PCS :

Déterminé par PCS (appareil Malvern 4700, laser 488 nm à 90°) sur un échantillon dilué à ~ 1 millimolaire avec de l'eau PPI filtrée sur 0.22 µm.

5 PCS = Photon Correlation Spectroscopy = Technique par Diffusion de Lumière Dynamique – Référence : R. Pecora dans *J. of Nano. Res.* (2000), 2, p. 123-131.

- Diamètre de la particule magnétique (p) (avant greffage) :

10 Déterminé par déconvolution des courbes d'aimantation (mesures effectuées sur un magnétomètre SQUID) à différentes températures (référence : R.W. Chantrell dans *IEEE Transactions on Magnetics* (1978), 14(5), p. 975-977).

Analyses structurales :

15 Par spectroscopie de masse (appareil MICROMASS VG Quattro II) avec une source Electrospray.

Exemple 1 :

20 Une solution de 36 g (0,181 mole) de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 20 ml de HCl à 37% dans 150 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  est introduite dans un mélange constitué de 3 litres d'eau et 143 ml (0,302 mole) de  $\text{FeCl}_3$  à 27%. 250 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 25 % sont introduits rapidement sous forte agitation. L'ensemble est agité 30 mn. Les jus sont éliminés par décantation magnétique. Le ferrofluide est lavé 3 fois de suite avec 2 litres d'eau. Le ferrofluide nitrique est mis en agitation 15 mn avec 200 ml de  $\text{HNO}_3$  [2M], le surnageant est éliminé par décantation magnétique. Le ferrofluide nitrique est porté à reflux avec 600 ml d'eau et 200 ml de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  [1M] pendant 30 mn. Le surnageant est éliminé par décantation magnétique. Le ferrofluide nitrique est mis en agitation 15 mn avec 200 ml de  $\text{HNO}_3$  [2M], le surnageant étant éliminé par décantation magnétique. Le ferrofluide nitrique est lavé 3 fois avec 3 litres d'acétone, puis est repris par 400 ml d'eau. La solution est évaporée sous vide 30 jusqu'à un volume final de 250 ml.

Concentration M/L	Z ave nm	Poly $\sigma$	Diamètre SQUID	Ms emu/cm <sup>3</sup>
4,85	40 nm	0,22	8,5 nm	275

Exemple 2 :

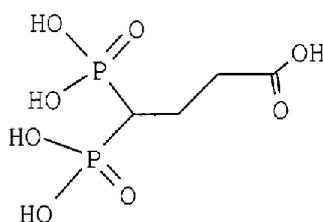
108 g (0,543 mole) de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  dans 450 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  est introduit dans une solution de 4 litres d'eau et 429ml (0,906 mole) de  $\text{FeCl}_3$  à 27%. 750 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 25 % sont introduits rapidement sous agitation (1200 tr/mn). L'ensemble est agité 30 mn. Les jus sont éliminés par décantation magnétique. Le ferrofluide est lavé 2 fois de suite avec 3 litres d'eau. Le ferrofluide nitrique est mis en agitation  $\frac{1}{4}$  H avec 3 litres de  $\text{HNO}_3$  [2M], le surnageant est éliminé par décantation magnétique. Le ferrofluide nitrique est porté à reflux avec 1300 ml d'eau et 700 ml de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  [1M] pendant 30 mn (600 tr/mn). Le surnageant est éliminé par décantation magnétique. Le ferrofluide nitrique est mis en agitation 15 n avec 3 litres de  $\text{HNO}_3$  [2M], le surnageant étant éliminé par décantation magnétique.

Le ferrofluide nitrique est lavé 3 fois avec 3 litres d'acétone, puis est repris par 600 ml d'eau. La solution est évaporée sous vide jusqu'à un volume final de 250 ml.

Rendement %	Concentration M/L	Z ave (nm)	Poly $\sigma$
81,8	4,45	31,3	0,21

200 ml de la solution précédente sont mis en agitation dans 2,4 litres de  $\text{HNO}_3$  pendant 4 heures. Le surnageant est éliminé par décantation magnétique. Le ferrofluide nitrique est lavé 2 fois avec 3 litres d'acétone, puis est repris par 400 l d'eau. La solution est évaporée sous vide jusqu'à un volume final de 250 ml.

Rendement %	Concentration M/L	Z ave (nm)	Poly $\sigma$
77	2,742	23,3	0,20

Exemple 3 :*Etape a : Diéthyl-1-[diéthoxyphosphoryl]vinylphosphonate*

- 5        13 g (0,433 mole) de paraformaldéhyde et 10 ml (0,097 mole) de diéthylamine sont dissous à chaud dans 250 ml de méthanol. 24 g (8,67 10<sup>-2</sup> mole) de diéthyl[diéthoxy-phosphoryl]méthylphosphonate sont ensuite additionnés. L'ensemble est porté à reflux pendant 24 heures. Le milieu réactionnel est concentré sous vide. Le concentrat est repris 2 fois par 250 ml de
- 10    toluène et est ensuite concentré sous vide. L'huile obtenue est dissoute dans 125 ml de toluène. 0,14 g d'acide para toluène sulfonique sont ajoutés. Le mélange est porté à reflux 24 heures avec un Dean-Stark puis est concentré à sec sous vide. Le produit est extrait avec 500 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> puis est lavé 2 fois avec 250 ml
- 15    d'eau. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> et concentrée sous vide. Le produit brut est purifié sur 625 g de gel de silice Merck Geduran® (40-63 µm). Elution : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /Acétone - 50/50 (CCM - SiO<sub>2</sub> : R<sub>f</sub> = 0,45)- 18,4 g sont isolés avec un rendement de 71%.

SM : M/z = 301,4 (ES+)

20    *Etape b: Diéthyl 2-[2.2-bis(diéthoxyphosphoryl)éthyl]malonate*

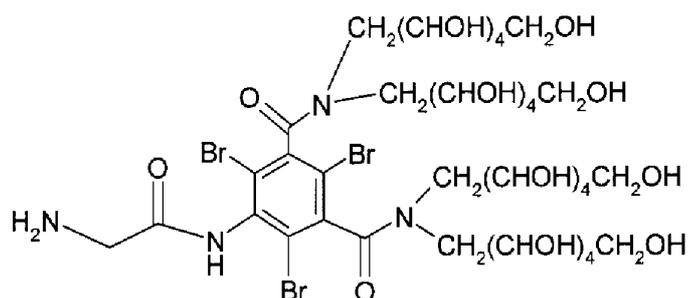
- 1,6 g (0,01 mole) de diéthyle malonate, 0,07 g (0,001 mole) d'éthylate de sodium et 3 g (0,01 mole) de diéthyl[diéthoxy-phosphoryl]vinyl-phosphonate sont agités 15 mn dans 15 ml d'éthanol. 5 ml d'une solution saturé de NH<sub>4</sub>Cl sont ajoutés à la solution éthanolique. L'ensemble est concentré sous vide. Le résidu
- 25    est extrait avec 30 ml d'acétate d'éthyle et lavé deux fois avec 5 ml d'eau. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis est évaporée à sec. L'huile obtenue est purifiée sur 200 g de silice Merck Geduran® -3,8 g sont isolés avec un rendement de 82 %.

SM : M/z 460,9 (ES+)

*Etape c : Acide 4,4-diphosphonobutanoïque*

7 g ( $15,7 \cdot 10^{-2}$  mole) de diéthyl2-[2.2-bis (diéthylphosphoryl) éthyl] malonate sont portés à reflux pendant 8 heures dans 350 ml d'HCl [5N]. L'huile brune obtenue est purifiée sur 60 g de gel de silice 60 silanisée (0,063-0,200 mm) avec une élution eau. 3,6 g sont isolés avec un rendement de 92 %.

SM: M/z 249 (ES+)

Exemple 4 :

10

Le composé (ligand hydrophile aminoalcool) peut être préparé selon le mode opératoire décrit dans le brevet EP 0 922 700 A1.

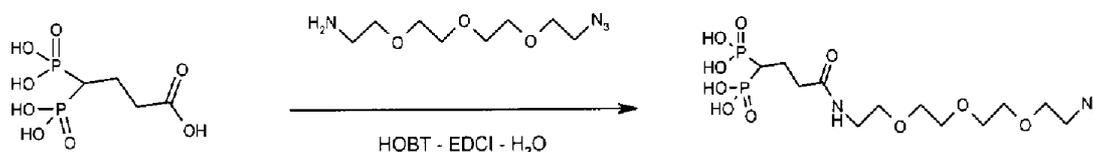
Exemple 5 :

600 mg du composé préparé à l'exemple 3 étape c ( $2,42 \cdot 10^{-3}$  M) et 3.2 g de composé préparé à l'exemple 4 ( $4,85 \cdot 10^{-3}$  M) sont dissous dans 20 ml de H<sub>2</sub>O. Le pH est ajusté à 6.2 avec NaOH 0.1 N. 600 mg d'EDCI ( $3,13 \cdot 10^{-3}$  M), 65 mg de HOBT ( $4,8 \cdot 10^{-4}$  M) sont ajoutés et l'ensemble est agité à température ambiante pendant 24 heures. Le milieu réactionnel est versé sur 400 ml d' IPA et agité 24 heures. Le précipité est filtré puis lavé dans de l'éther éthylique et séché sous vide.

20

Le brut est dissous dans le minimum d'eau en ajustant le pH à 9 puis est déposé sur 150 ml de résine Amberlite Na (forme H<sup>+</sup>) une nuit. Le produit est élué avec de l'eau. Les bonnes fractions sont concentrées sous vide. SM, ES- : 1385.6

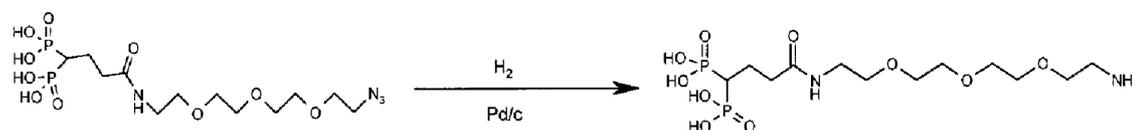
25

**Exemple 6 :****Etape a**

- 5 Dans un tricol de 500ml, équipé d'une électrode et d'une agitation magnétique, le gembiphosphonate (exemple 3 étape c, 30g) est dissous dans H<sub>2</sub>O (250ml). Le pH est ramené à 5,7 par NaOH et l'amine (11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine, Fluka®, 21.8g) est ajoutée en une seule fois : l'HOBT (1,72g) puis l'EDCI (21,16g) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité pendant
- 10 24 heures à température ambiante. Le milieu est évaporé jusqu'à un volume final d'environ 150ml. Le pH est ramené à 8 par NaOH. Passage de la solution sur 70ml (30 fois la théorie) de résine Amberlite 252 Na (H<sup>+</sup>-1.8 meq/ml) afin d'éliminer l'amino peg en excès. Elution par H<sub>2</sub>O (V<sub>recupéré</sub> = 300ml).

Evaporation jusqu'à un volume final d'environ 150ml.

- 15 Passage de la solution sur 140ml (2 fois la théorie) de résine IRA 67 (OH<sup>-</sup>-1.6meq/ml) afin d'éliminer les Cl<sup>-</sup> en excès. Elution par H<sub>2</sub>O (V<sub>recupéré</sub> = 260ml). Evaporation jusqu'à un volume final d'environ 100ml. Passage de la solution sur 900g de silice silanisée. Elution par 2l d'H<sub>2</sub>O puis par 2l d'un mélange H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH (50/50).
- 20 m = 28.46g, Rdt = 75%, LC/MS : en ES<sup>+</sup> à m/z = 449.12.

**Etape b**

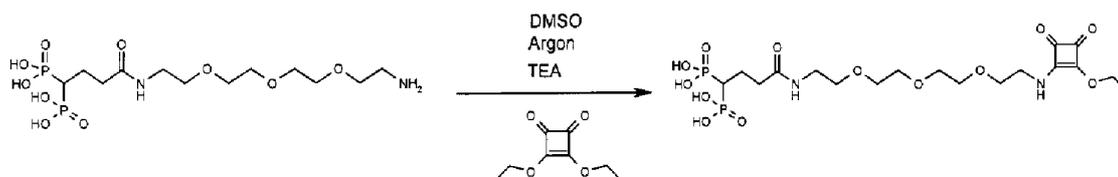
- 25 Dans le réacteur autoclave de 1L, est introduit l'azide obtenu à l'étape a (28,26g) préalablement solubilisé dans EtOH (350ml). Le milieu est acidifié par une solution d'HCl et quatre spatules de Pd/C sont introduites dans la solution. Le milieu réactionnel est agité pendant 4 heures à température ambiante sous 4 bars d'hydrogène. Le milieu réactionnel est filtré sur clarcel et la solution est évaporée

à sec jusqu'à l'obtention d'une huile jaune paille (31,21g). Le produit est purifié par passage de la solution sur 200ml de résine IRA 67 (OH<sup>-</sup>-1.6meq/ml) afin d'éliminer les Cl<sup>-</sup> en excès. Elution par H<sub>2</sub>O.

$m = 12.25\text{g}$ , Rdt = 46% (huile), LC/MS : en ES<sup>+</sup> à  $m/z = 423.12$ .

5

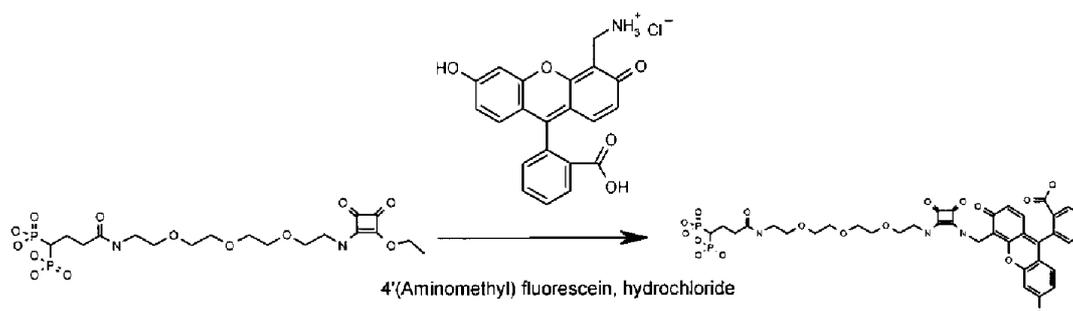
### Etape c



Dans un tricol de 250 ml, équipé d'une agitation magnétique, l'intermédiaire précédemment préparé (12 g) est dissous dans le DMSO (200 ml). La Triéthylamine (6696  $\mu\text{l}$ ) puis le diéthylsquarate (4205  $\mu\text{l}$ ) sont ajoutés. Le milieu est agité pendant 72 heures à température ambiante. La solution est concentrée à sec à la pompe à palettes jusqu'à l'obtention d'une huile jaune qui est purifiée sur silice silanisée (Elution par 2000ml d'H<sub>2</sub>O puis par 2000ml [H<sub>2</sub>O /CH<sub>3</sub>OH] (80/20) puis par 2000 ml d'un mélange H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH (50/50) et par 1000ml de CH<sub>3</sub>OH.

$m = 7.2\text{g}$ , Rdt = 46.4% (huile)- LC/MS : en ES<sup>+</sup> à  $m/z = 547.25$ .

### Exemple 7 :

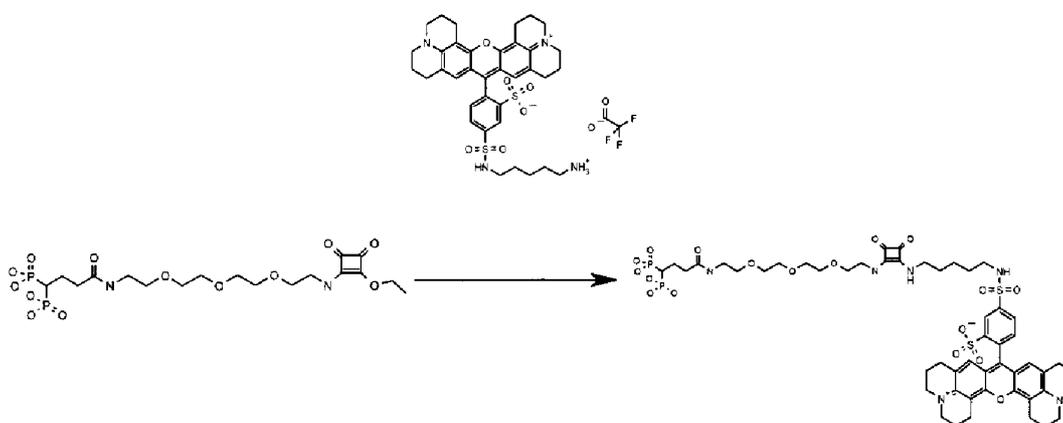


Dans un pilulier, équipé d'une électrode et d'une agitation magnétique, l'intermédiaire précédemment préparé (exemple 6 étape c) (0,137g ;  $2,5 \cdot 10^{-4}$  mole) est dissous dans H<sub>2</sub>O (2ml). Le pH de la solution est ajusté à 7.5 par une solution saturée de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Le colorant (0,05g ;  $1,26 \cdot 10^{-4}$  mole), préalablement dissous dans du DMSO (1ml), est ajouté dans le milieu. Le pH de la solution est égal à 6,5. Le pH de la solution est ramené à 8 par une solution saturée de

25

égal à 6,5. Le pH de la solution est ramené à 8 par une solution saturée de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . La solution est agitée pendant 48H à température ambiante. Le pH de la solution est ramené à 7 par une solution d'acide chlorhydrique 1N. La solution est évaporée à sec à la pompe à palettes. L'huile obtenue est dissoute dans  $\text{H}_2\text{O}$  (10ml) et purifiée par chromatographie sur une cartouche de silice RP18 (25-40 $\mu\text{m}$ ) de 90g. 95 mg de produit sont isolés avec un rendement de 95%. LC/MS : en ES- m/z = 860.19

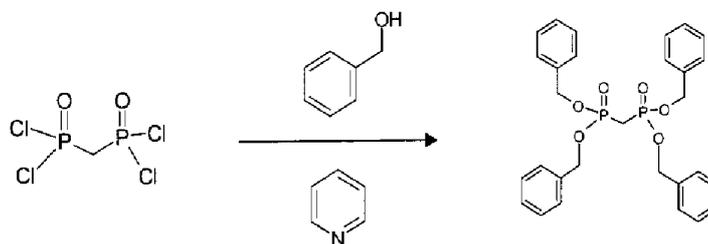
### Exemple 8:



10

Dans un pilulier, équipé d'une électrode et d'une agitation magnétique, le composé préparé exemple 6 étape c (0.137 g,  $2.5 \cdot 10^{-4}$  mole) est dissous dans  $\text{H}_2\text{O}$  (2ml). Le pH de la solution est ajusté à 7.5 par une solution saturée de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Le colorant (0,102 g,  $1.26 \cdot 10^{-4}$  mole), préalablement dissous dans du DMSO (1 ml), est ajouté dans le milieu. Le pH de la solution est égal à 5.5. Le pH de la solution est ramené à 8 par une solution saturée de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . La solution est agitée pendant 48 h à température ambiante. Le pH de la solution est ramené à 7 par une solution d'acide chlorhydrique 1N. La solution est évaporée à sec à la pompe à palettes. L'huile obtenue est dissoute dans  $\text{H}_2\text{O}$  (10ml) et purifiée par chromatographie sur une cartouche de silice RP18 (25-40 $\mu\text{m}$ ) de 90 g. 100 mg de produit sont isolés avec un rendement de 66%.

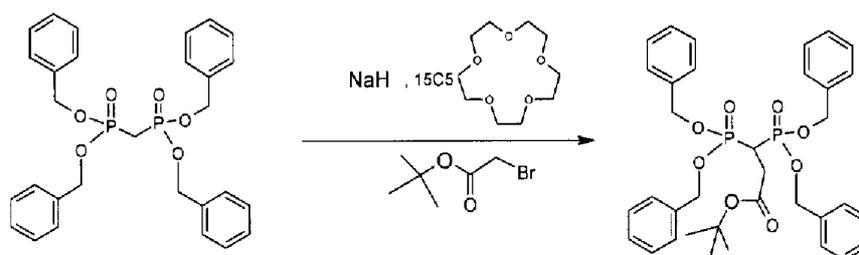
20

Exemple 9 :*Etape a*

30g de Méthylènebis (phosphonic dichloride) sont mis en agitation dans  
 5 180ml de toluène préalablement séché sur tamis. La température est maintenue à  
 0°C. Une solution de 60 ml d'alcool benzylique et de 37,5 ml de pyridine est  
 ajoutée goutte à goutte à l'aide d'un pousse seringue en 4 heures, la température  
 ne devant pas dépasser les 0°C. Le milieu est agité 4 heures à TA. L'insoluble est  
 éliminé par filtration, rincé plusieurs fois au toluène. La phase organique est lavée  
 10 3 fois avec 150ml de soude 2N, 250ml d'eau, séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrée.  
 Le mélange est purifié sur silice ( Eluant : Heptane/ Acétate d'éthyle : 30/70).

CCM [ SiO<sub>2</sub> - Hept / AcOEt : 3 / 7 - R<sub>f</sub> = 0.3 ] -Rendement : 60%

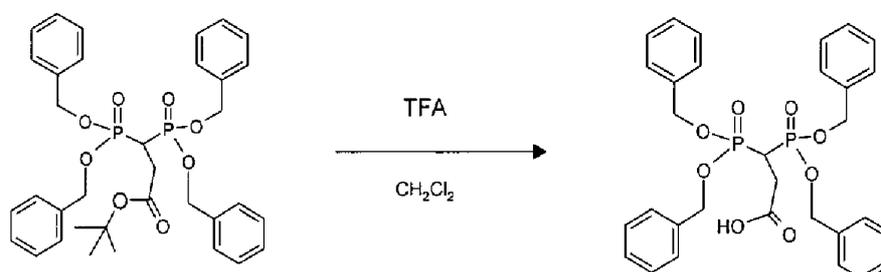
➤ LC/MS en ES+ 537.21

15 *Etape b*

Le composé préparé à l'étape a et le 15C5 sont mis en agitation dans 240 ml  
 de THF fraîchement distillé. 1,15 g de NaH à 60% sont ajoutés petit à petit dans le  
 milieu. L'agitation est maintenue une ½ heure. Le t-butyl bromoacétate mis dans  
 20 25 ml de THF est ajouté goutte à goutte au bain de glace. L'ensemble est agité 3  
 heures à TA. Le milieu réactionnel est concentré sous vide, repris par une solution  
 saturée de NH<sub>4</sub>Cl et extrait par 2\*200ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La phase organique est  
 séchée sur MgSO<sub>4</sub> et purifiée. (Cartouche Si60 ; 201 nm ; débit= 20ml/min-  
 Gradient : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / Acétone) -Rendement : 65%.

25 ➤ LC/MS en ES+ = 650.65, BP-tBu: (M+1) = 595.26

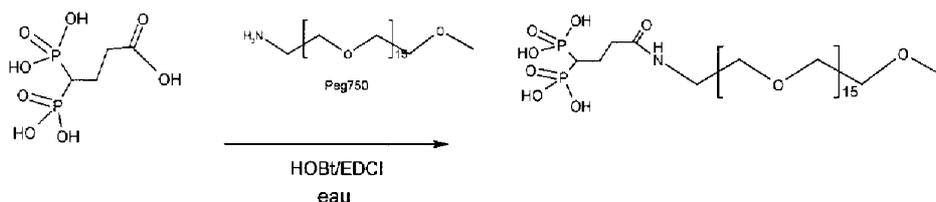
## Etape c



- 5 3,4g du composé issu de l'étape **b** sont mis en solution dans 35 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La solution est maintenue au bain de glace et 3,4 ml de TFA sont ajoutés goutte à goutte. L'ensemble est agité 4 heures à  $0^\circ\text{C}$  puis 20 heures à TA. Le milieu réactionnel est évaporé sous vide à  $20^\circ\text{C}$ . Le produit est repris avec 20ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et lavé à l'eau puis purifié
- 10 (Cartouche RP 18 ; détection à 201 nm ; débit = 20 ml/min- Gradient :Eau-TFA pH=2.77/ $\text{CH}_3\text{CN}$ ) - Rendement : 51%  
 ➤ LC/MS en ES+ = 595.28

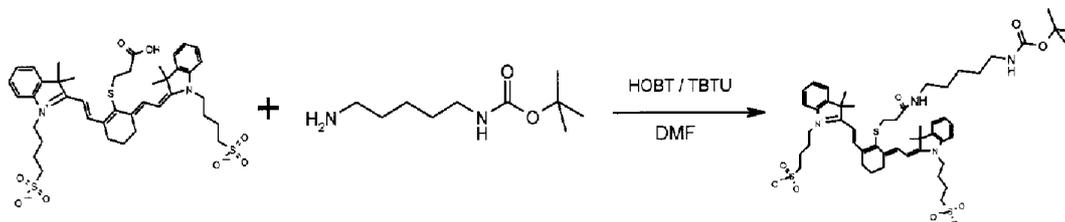
Exemple 10 :

15



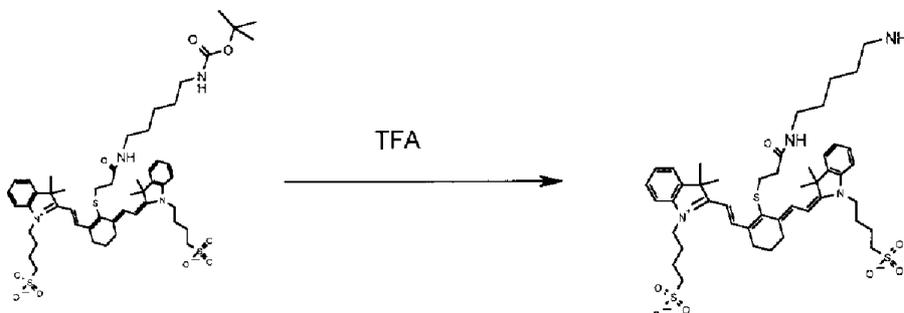
- 1g du composé obtenu à l'étape **c** de l'exemple **3** ( $4,03 \cdot 10^{-3}$  mole) et 3.26 g de Peg750 ( $4,43 \cdot 10^{-3}$  mole) sont dissous dans 55 ml d'eau. Le pH est ajusté à 6,2. 272 mg d'HoBt. ( $2,01 \cdot 10^{-3}$  mole) sont ajoutés et le milieu réactionnel est agité
- 20 5 minutes. 1,148 g d'EDCI ( $6 \cdot 10^{-3}$  mole) sont ensuite ajoutés et l'agitation maintenue 24h. Purification sur résine Amberlite 252Na avec fixation du produit à pH 9,2. 3 g sont obtenus soit un rendement de 59%.

LC/MS: Mode ES- série de pics centrée sur BP à 964.35.

Exemple 11 :*Etape a*

- 5 150 mg de colorant (  $1,88 \cdot 10^{-4}$  mole, ) sont dissous dans 15 ml de DMF. Sont successivement ajoutés : 60mg d'HoBt ( $4,44 \cdot 10^{-4}$  mole), 51 mg de TBTU ( $1,58 \cdot 10^{-4}$  mole), 84mg de diamine protégée ter-Butyl ( $4,15 \cdot 10^{-4}$  mole) et 0.165 ml de DIPEA ( $9.4 \cdot 10^{-4}$  mole). Le milieu réactionnel est agité une nuit à température ambiante. Purification par chromatoflash en phase inverse. 103,4 mg de produit
- 10 sont isolés avec un rendement de 55%.

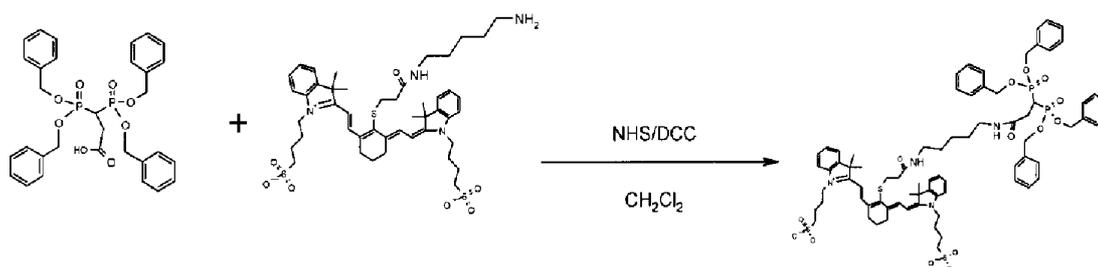
LC/MS : Mode ES+ BP à 980.89

*Etape b*

- 15 103 mg du composé préparé à l'étape a ( $1.05 \cdot 10^{-4}$  mole) sont mis en agitation dans 3 ml de TFA/TIS/Eau ( proportion 90/2.5/2.5) pendant 30 minutes. Purification par chromatographie Flash phase inverse, 40 mg de produit sont obtenus soit un rendement de 43%.

LC/MS : Mode Es+ BP à 879.39 z=1.

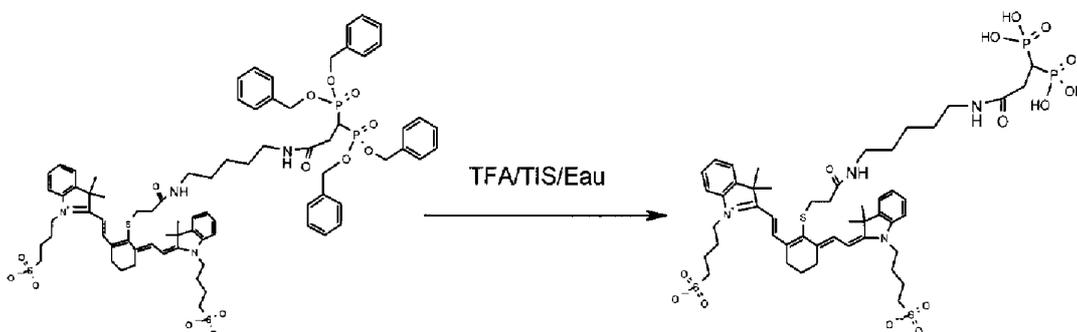
## Etape c



26 mg du composé obtenu à l'étape c de l'exemple 9 ( $4.37 \cdot 10^{-5}$  mole), 18 mg de DCC ( $8.72 \cdot 10^{-5}$  mole) et 8 mg de NHS ( $6.95 \cdot 10^{-5}$  mole) sont agités 3 heures à température ambiante dans 5 ml de dichlorométhane. La DCU est filtrée. 40 mg ( $4.54 \cdot 10^{-5}$  mole) du colorant obtenu à l'étape b et quelques gouttes de TEA sont alors ajoutés. L'agitation est maintenue 3 heures. Purification sur chromatographie flash phase inverse. 12 mg sont isolés avec un rendement de 20%.

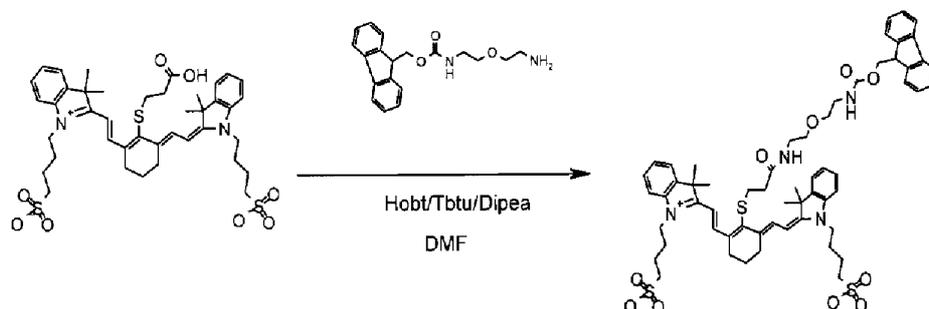
10 LC/MS : Mode ES+ BP à 1457.33

## Etape d

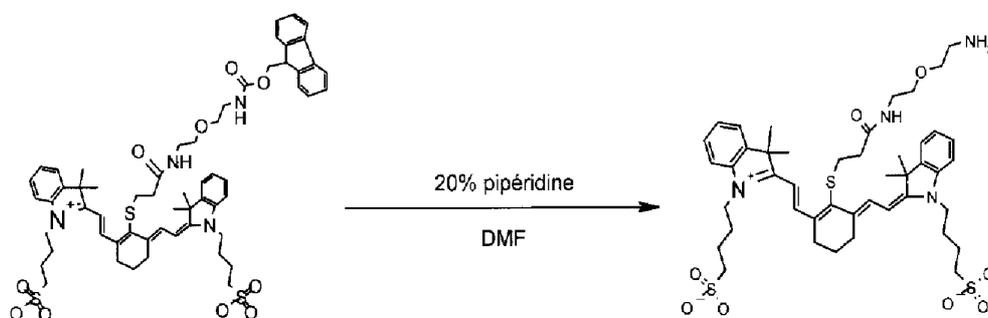


15 150 mg du composé préparé à l'étape précédente ( $1.029 \cdot 10^{-4}$  mole) sont agités dans 4 ml de TFATIS/Eau (proportions 95/2,5/2.5). L'agitation est maintenue 3 heures à température ambiante. Purification par chromatographie flash phase inverse. 50 mg obtenus soit un rendement de 45%.

LC/MS : Mode ES- BP à 1094.53 (z=1)

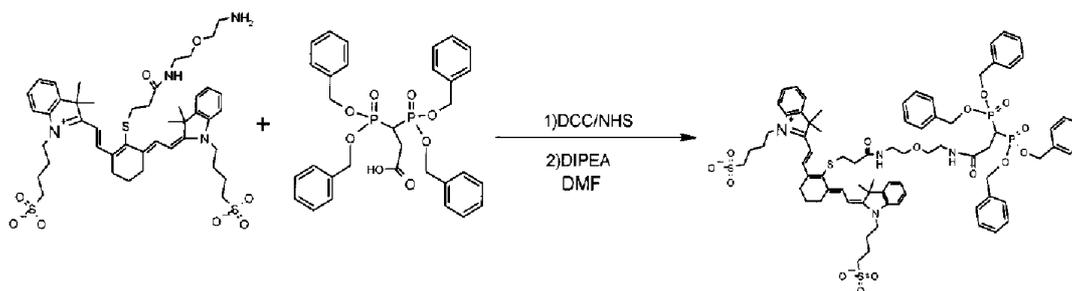
**Exemple 12 :****Etape a**

- 200 mg de colorant ( $2,51 \cdot 10^{-4}$  mole) sont solubilisés dans 20 ml de DMF.
- 5 Sont successivement ajoutés : 80 mg d'HoBt ( $5,92 \cdot 10^{-4}$  mole), 68 mg de TBTU ( $2,11 \cdot 10^{-4}$  mole), 0,220 ml de DIPEA ( $1,255 \cdot 10^{-3}$  mole) et 108 mg de Fmoc-aminoethoxyethylamine ( $3,30 \cdot 10^{-4}$  mole). Le milieu réactionnel est agité une nuit à température ambiante. Purification sur Flash Eau/CH<sub>3</sub>CN. 178 mg de produit sont isolés avec un rendement de 65%
- 10 LC/MS : Mode Es+ BP à 1103.43 (z=1)

**Etape b**

- 15 80 mg du composé préparé à l'étape précédente ( $9,0 \cdot 10^{-5}$  mole) sont mis en solution dans 6 ml de DMF contenant de la pipéridine 20%. L'agitation est maintenue 1heure à température ambiante. Purification par chromatographie flash phase inverse. 50 mg de produit sont obtenus soit un rendement de 40%.
- LC/MS : Mode Es- BP à 880.09 (z=1)

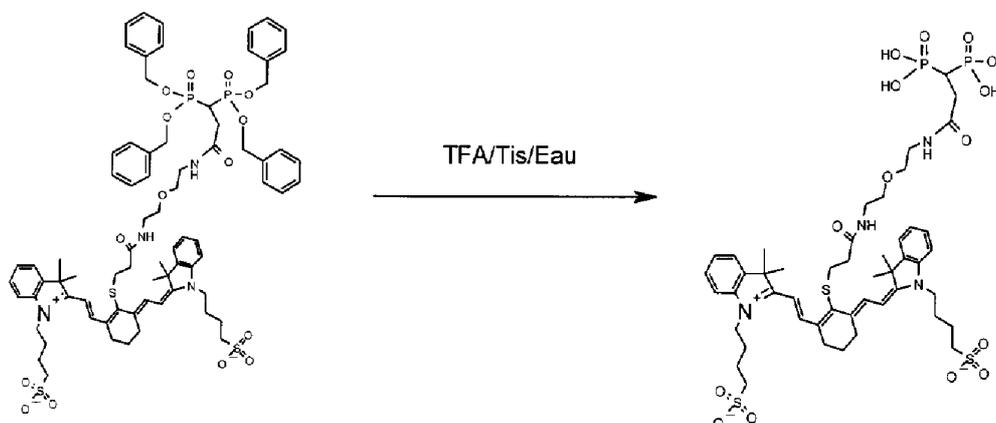
## Etape c



20 mg de pince benzylée obtenue à l'étape c de l'exemple 9 ( $3,36 \cdot 10^{-5}$  mole), 14 mg de DCC ( $6,78 \cdot 10^{-5}$  mole) et 6 mg d'NHS ( $5,21 \cdot 10^{-5}$  mole) sont dissous dans le DMF et agités pendant 3 heures à température ambiante. La DCU est éliminée. 30 mg ( $3,4 \cdot 10^{-5}$  mole) de colorant obtenu à l'étape b et  $17 \mu\text{l}$  de DIPEA ( $1,02 \cdot 10^{-4}$  mole) sont dissous dans 1 ml de DMF ; l'ester activé est alors ajouté goutte à goutte. L'agitation est maintenue 3 heures à température ambiante. Purification par chromatoflash en phase inverse. 30 mg sont obtenus soit un rendement de 36%.

LC/MS : Mode Es+ BP à 1458.90 (z=1)

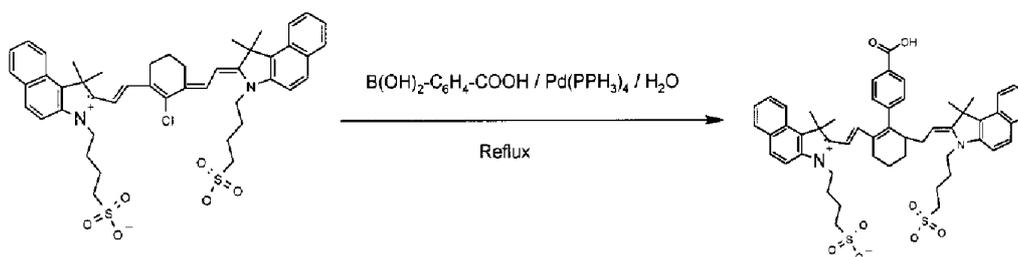
## Etape d



15

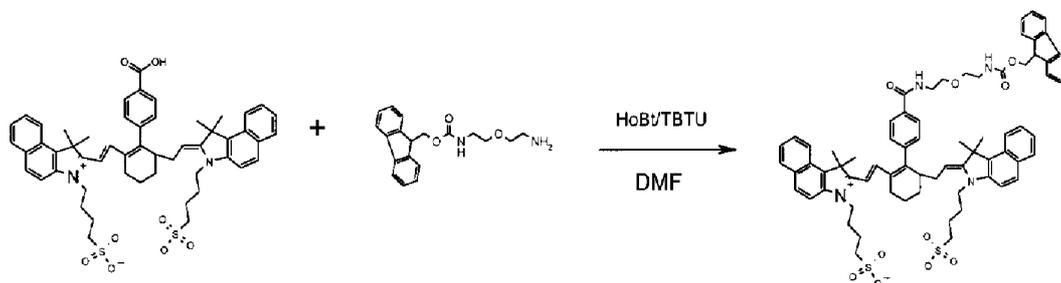
30 mg du composé préparé à l'étape c ( $2,03 \cdot 10^{-5}$  mole) sont dissous dans 3 ml de TFA/TIS/Eau (proportions 95/2,5/2,5) pendant 3h50 à température ambiante. Purification par chromatoflash, 6 mg obtenus soit un rendement de 35%.

20 LC/MS : Mode Es+ BP à 1098.21 (z=1) et 550.3 (z = 2).

**Exemple 13 :****Etape a**

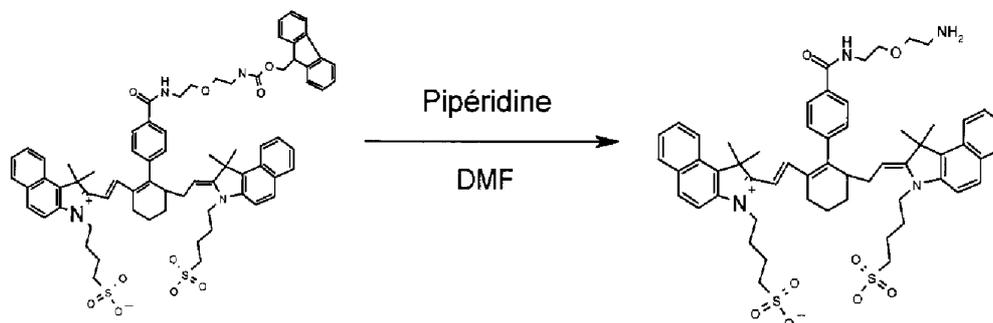
50 mg d'IR820 (Aldrich ®,  $5,88 \cdot 10^{-5}$  mole) et 14.65 mg ( $8,82 \cdot 10^{-5}$  mole) de  
 5 Phenylboronic acid sont chauffés à reflux en présence de 10,7 mg ( $9,24 \cdot 10^{-6}$   
 mole) de tetrakis(triphenylphosphine)palladium et de 40,7 mg de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  ( $2,9 \cdot 10^{-4}$   
 mole) pendant 24 h à  $110^\circ\text{C}$ . En fin de manipulation, le palladium est filtré.  
 Purification par chromatoflash en phase inverse, 33 mg obtenus soit un rendement  
 de 62%.

10 **LC/MS** : Mode  $\text{Es}^+$  BP à 913.27 ( $z=1$ ).

**Etape b**

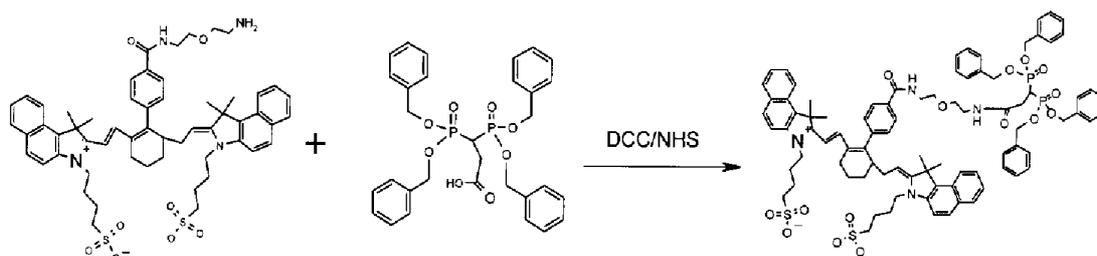
18 mg du composé préparé à l'étape a ( $1,96 \cdot 10^{-5}$  mole), 7 mg d'HoBt  
 15 ( $4,31 \cdot 10^{-5}$  mole), 7 mg de TBTU ( $4,70 \cdot 10^{-5}$  mole) 10 mg de Fmoc-  
 aminoethoxyéthylamine ( $2,15 \cdot 10^{-6}$  mole) et  $11 \mu\text{l}$  de DIPEA ( $9,8 \cdot 10^{-5}$  mole) sont  
 mis en agitation une nuit à température ambiante. Le milieu réactionnel est trituré  
 dans l'éther diéthylique (20 mg) et filtré. 13 mg de produit sont ainsi isolés avec un  
 rendement de 55%.

## Etape c



13 mg du composé obtenu à l'étape b ( $1.06 \cdot 10^{-5}$  mole) sont mis en agitation dans le DMF et pipéridine 20%. L'agitation est maintenue 30 minutes à température ambiante. Précipitation dans 20 ml d'éther éthylique et agitation 1 heure à température ambiante. 4.3 mg sont obtenus soit un rendement de 40%.

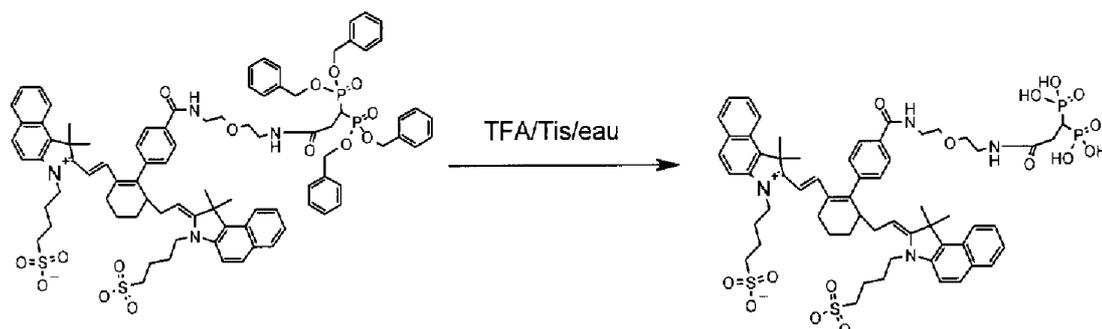
## Etape d



10

20 mg du composé obtenu à l'étape c de l'exemple 9 ( $3.36 \cdot 10^{-5}$  mole), 14 mg de DCC ( $6.78 \cdot 10^{-5}$  mole) et 6 mg d'NHS ( $5.21 \cdot 10^{-5}$  mole) sont dissous pendant 3 heures à température ambiante. La DCU est éliminée. 35 mg ( $3.4 \cdot 10^{-5}$  mole) de colorant obtenu à l'étape c et 17  $\mu$ l de DIPEA ( $1.02 \cdot 10^{-4}$  mole) sont dissous dans 1 ml de DMF ; l'ester activé est alors ajouté goutte à goutte. L'agitation est maintenue 3 heures à température ambiante. Précipitation dans 50 ml d'éther éthylique. 20 mg sont obtenus soit un rendement de 37%.

15

*Etape e*

20 mg du composé préparé à l'étape **d** ( $1.25 \cdot 10^{-5}$  mole) sont mis en agitation dans 3 ml de TFA/TIS/Eau ( 95/2.5/2.5) pendant 3h et à température ambiante. Purification par chromatoflash en phase inverse. 4 mg sont isolés soit un rendement de 26%.

Exemple 14 :

60  $\mu$ moles du composé obtenu à l'exemple **5** en solution dans 10 ml d'eau sont ajoutés goutte à goutte à une solution de 1 ml de l'exemple **2** (ferrofluide acide) à 2,75 M/L dilué dans 100 ml d'eau. L'ensemble est agité pendant 20 minutes à température ambiante et le pH est ajusté à 7,2. La solution obtenue est ultrafiltrée sur une membrane ayant un seuil de coupure de 30 kD. 300 ml de filtrat sont éliminés pour obtenir une solution finale de 10 ml.

$$[\text{Fe}] = 0,260 \text{ M/L} \quad \text{Taille PCS} = 28 \text{ nm}$$

Exemple 15 :

3 ml du composé décrit à l'exemple **2** ( $[\text{Fe}] = 1.336 \text{ mol/l}$ ) sont dilués dans 100 ml d'eau. A cette solution sont ajoutés successivement et avec un délais de 15 minutes entre chaque ajout, une solution de 46 mg du composé décrit à l'exemple **5** dans 2ml d'eau, une solution de 3,85 mg du composé décrit à l'exemple **7** dans 2 ml d'eau et finalement une solution de 46 mg du composé de l'exemple **5** dans 2 ml d'eau. La solution est agitée 15 minutes à température ambiante et le pH est ajusté à 7.4 avec une solution de NaOH. Le milieu est ultrafiltré sur une membrane de 30KD et le volume de la solution est ramené à 20 ml pour une concentration en fer de 0.191 mol/l. PCS : 26.8.

Exemple 16 :

Selon le protocole de l'exemple 16, différentes combinaisons binaires ou ternaires de composés biphosphonates dans des proportions variables sont fixées sur les particules d'oxyde de fer décrites à l'exemple 1 ou 2 tel que résumé dans le tableau suivant :

N°	particules	Biphosphonate 1 (% mol)	Biphosphonate 2 (% mol)	Biphosphonate 3 (% mol)	Taille PCS nm
1	Exemple 1	Exemple 5 (40)	Exemple 3 (60)	-	42
2	Exemple 2	Exemple 5 (60)	Exemple 3 (30)	Exemple 7 (10)	28
3	Exemple 2	Exemple 5 (95)	Exemple 7 (5)	-	27
4	Exemple 2	Exemple 5 (90)	Exemple 8 (10)	-	26
5	Exemple 2	Exemple 5 (95)	Exemple 11 (5)	-	28
6	Exemple 2	Exemple 10 (20)	Exemple 3 (80)	-	29
7	Exemple 2	Exemple 10 (95)	Exemple 12 (5)	-	28
8	Exemple 2	Exemple 10 (80)	Exemple 3 (15)	Exemple 12 (5)	27
9	Exemple 2	Exemple 10 (98)	Exemple 13 (2)	-	28
10	Exemple 2	Exemple 10 (100)	-	-	27
11	Exemple 2	Exemple 5 (100)	-	-	26
12	Exemple 2	Exemple 5 (96)	Exemple 12 (2)	Exemple 7 (2)	27
13	Exemple 2	Exemple 5 (50)	Exemple 10 (50)	-	28

Les chiffres entre parenthèses indiquent le taux de couverture, par exemple pour le N°1 : la couverture est composée à 40% du composé de l'exemple 5 (ligand aminoalcool) et à 60% du composé de l'exemple 3 (composé biphosphonate non relié à un ligand).

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation de nanoparticules métalliques comprenant un noyau métallique N recouvert d'une couche stabilisatrice organique couplée à au moins ligand hydrophile à effet sur la stabilité/biodistribution des nanoparticules, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

- 5 a) préparation du noyau métallique N des nanoparticules métalliques ;
- b) préparation d'éléments de ciblage de formule S – C dans laquelle ;
- S est un groupe d'attache *gem*-bisphosphonate de formule X-L-CH(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)<sub>2</sub> ;
  - C est un ligand de biodistribution hydrophile, avantageusement
- 10 choisi parmi les aminoalcools ou les PEG ;

c) greffage sur le noyau N des éléments de ciblage S-C;

avec :

- L représente un groupement organique reliant la fonction X à la fonction *gem*-bisphosphonate –CH(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)<sub>2</sub> ;

- 15 • X représente une fonction chimique capable d'être couplée au ligand hydrophile C.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le noyau métallique est choisi parmi les suivants : hydroxyde de fer, oxyde de fer hydraté, ferrite, oxyde de fer mixte.

- 20 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le ligand hydrophile de biodistribution est un groupe aminoalcool.

4. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le ligand hydrophile de biodistribution est un groupe polyéthylène glycol.

- 25 5. Procédé selon la revendication 1 à 4, caractérisé en ce qu'une partie des ligands sont des groupes aminoalcool, et une autre partie sont des groupes polyéthylène glycol.

6. Procédé selon la revendication 1 à 5, caractérisé en ce que l'on

greffe sur le noyau d'une part des éléments de ciblage S-C, et d'autre part des groupes de stabilisation S non porteurs de ligands de biodistribution.

7. Procédé selon la revendication 1 à 6, caractérisé en ce que le taux de greffage des éléments de ciblage sur le noyau est de 1 à 10%,  
5 avantageusement 1, 2, 3, 5, 10 %.

8. Élément de ciblage de formule S-C dans laquelle :

- S est un groupe d'attache *gem*-bisphosphonate de formule X-L-CH(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>;

avec :

10 • L représente un groupement organique reliant la fonction X à la fonction *gem*-bisphosphonate -CH(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)<sub>2</sub> ;

• X représente une fonction chimique capable d'être couplée au ligand hydrophile C.

- C est un ligand de biodistribution hydrophile.

15 9. Élément de ciblage de formule S-C selon la revendication 8 dans laquelle C est choisi parmi les aminoalcools ou les PEG.



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 702587  
FR 0758103

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
D,X	WO 2004/058275 A (GUERBET SA [FR]) 15 juillet 2004 (2004-07-15) * page 7, ligne 14 - ligne 24 * * page 8, ligne 16 - ligne 28 * * page 9, ligne 9-11 * * page 11, ligne 1 - ligne 25 * * page 16, ligne 30 - page 17, ligne 24 * * page 44, ligne 17 - ligne 33 * * page 50, ligne 29 - ligne 32 * * exemples *	1-3,6,7	A61K49/18 B82B1/00 A61K9/51 A61K33/24 A61K47/02 G01N33/553
X	----- WANG, LING ET AL: "A Biocompatible Method of Decorporation: Bisphosphonate-Modified Magnetite Nanoparticles to Remove Uranyl Ions from Blood" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY , 128(41), 13358-13359 CODEN: JACSAT; ISSN: 0002-7863, 2006, XP002475442 * schéma 1 *	1,2,7	
X	----- US 2003/229280 A1 (GREB WOLFGANG [DE] ET AL) 11 décembre 2003 (2003-12-11) * alinéas [0019], [0037], [0044], [0046] * * exemples *	1,2,6,7	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A61K
A	----- US 5 916 539 A (PILGRIMM HERBERT [DE]) 29 juin 1999 (1999-06-29) * exemples *	1-7	
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		9 avril 2008	Villard, Anne-Laure
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0758103 FA 702587**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 09-04-2008

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2004058275 A	15-07-2004	AU 2003299388 A1	22-07-2004
		BR 0316886 A	25-10-2005
		CA 2510531 A1	15-07-2004
		CN 1744920 A	08-03-2006
		EP 1572246 A2	14-09-2005
		FR 2848850 A1	25-06-2004
		JP 2006513198 T	20-04-2006
		US 2004253181 A1	16-12-2004
-----			
US 2003229280 A1	11-12-2003	AU 2003204175 A1	11-12-2003
		CA 2428555 A1	22-11-2003
		WO 03097074 A1	27-11-2003
		DE 10222481 A1	04-12-2003
		EP 1378239 A1	07-01-2004
		JP 2004249071 A	09-09-2004
-----			
US 5916539 A	29-06-1999	AT 156706 T	15-08-1997
		WO 9421240 A2	29-09-1994
		DE 59403734 D1	18-09-1997
		EP 0689430 A1	03-01-1996
		JP 8508721 T	17-09-1996
-----			

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION  
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 702587  
FR 0758103

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

## 1. revendications: 1-7

Procédé de préparation de nanoparticules métalliques tel que défini dans la revendication 1.

---

## 2. revendications: 8,9

Élément de ciblage de formule S-C tel que défini dans la revendication 8.

---

La première invention a été recherchée.

La présente demande ne satisfait pas aux dispositions de l'article L.612-4 du CPI car elle concerne une pluralité d'inventions qui ne sont pas liées entre elles en formant un seul concept inventif général.

Les raisons pour lesquelles la présente demande porte sur les deux inventions mentionnées ci-dessus non liées entre elles de telle sorte qu'elles ne formeraient qu'un seul concept inventif général, sont les suivantes:

Le problème à résoudre par la présente demande est l'obtention de nanoparticules métalliques dont le noyau est recouvert d'une couche de ligands ayant un effet sur la stabilité et la biodistribution desdites nanoparticules, pour une utilisation en IRM.

Comme solutions à ce problème, sont proposés (i) un procédé de préparation de nanoparticules métalliques impliquant le greffage sur le noyau métallique d'un élément de ciblage de formule S-C dans laquelle le gem-bisphosphonate S de formule  $X-L-CH(P(O_3H_2)_2)_2$  est lié via la fonction chimique X à un ligand hydrophile C, et (ii) la molécule S-C.

Le lien technique entre ces deux solutions est la molécule S-C.

Cependant, les molécules S-C telles que décrites dans la présente demande ont déjà été utilisées pour recouvrir le noyau de nanoparticules métalliques destinées à l'IRM et pour résoudre le problème mentionné plus haut.

W02004/058275 (D1) décrit en effet des nanoparticules destinées à l'IRM dont le noyau est recouvert d'une couche stabilisatrice de ligands hydrophiles de formule S-C dans laquelle S correspond à  $X-L-CH(P(O_3H_2)_2)_2$  comme dans la revendication 1 de la présente demande, et C est un aminoalcool ou un PEG (cf. page 7, lignes 14-24; page 11, lignes 1-25; page 16, ligne 30 - page 17, ligne 24; page 88, ligne 83 - page 89, ligne 6). Le composé PEG-NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH-(P(O<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub> est en particulier un des éléments de ciblage de formule S-C utilisé pour recouvrir le noyau de nanoparticules métalliques de D1 (cf. exemples 30 et 31).

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION  
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 702587  
FR 0758103

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

De ce fait, le lien technique mentionné ci-dessus n'est pas nouveau et ne peut plus servir d'élément technique particulier reliant les deux inventions identifiées plus haut. Aucun autre élément technique n'ayant pu être trouvé, qui puisse servir d'élément technique particulier reliant les deux inventions identifiées plus haut, la présente demande ne satisfait pas aux exigences d'unité d'invention.