



**HAL**  
open science

# Imagerie des récepteurs de neuropeptides pour le ciblage tumoral

Clément Morgat

► **To cite this version:**

Clément Morgat. Imagerie des récepteurs de neuropeptides pour le ciblage tumoral. Ingénierie biomédicale. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0308 . tel-01282064

**HAL Id: tel-01282064**

**<https://theses.hal.science/tel-01282064>**

Submitted on 3 Mar 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

SPÉCIALITÉ BIOIMAGERIE

Par Clément MORGAT

**Imagerie des récepteurs de neuropeptides pour le ciblage tumoral**

Sous la direction du Pr Elif HINDIE

Soutenu le 17 Décembre 2015

Membres du jury:

M. MULLER, Bernard,  
M. COURBON, Frédéric  
M. KRYZA, David  
M. GUILLET, Benjamin  
M SEVENET, Nicolas  
M. FERNANDEZ, Philippe  
M. MACGROGAN, Gaétan

PU, Université de Bordeaux  
PU-PH, Université de Toulouse  
MCU-PH, Université de Lyon  
PU-PH, Université de Marseille  
PU-PH, Institut Bergonié  
PU-PH, Université de Bordeaux  
PH, Institut Bergonié

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Invité  
Invité

# **Titre : Imagerie des récepteurs de neuropeptides pour le ciblage tumoral**

**Résumé :** Des récepteurs de neuropeptides peuvent être fortement exprimés à la surface des cellules tumorales offrant ainsi l'opportunité de les visualiser en imagerie par Tomographie d'Emission de Positons (TEP) grâce à des analogues radiomarqués au  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  ou au  $^{18}\text{F}$ , mais également de sélectionner des patients répondeurs à une radiothérapie métabolique à l'aide de ces mêmes analogues, radiomarqués au  $^{177}\text{Lu}$  ou  $^{90}\text{Y}$ . Un exemple phare a été le développement d'analogues radiomarqués de la somatostatine pour l'imagerie ( $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC) et le traitement ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE) des tumeurs neuro-endocrines (TNE). Cette voie diagnostique et thérapeutique s'est récemment amplifiée avec l'identification d'autres neuropeptides et leurs récepteurs (sur)exprimés par les cellules tumorales. Ce travail de Thèse s'est donc déroulé selon plusieurs thématiques dont la première a été la mise en place d'une plate-forme de radiomarquage au  $^{68}\text{Ga}$  (une des premières en France) pour introduire l'imagerie des récepteurs somatostatine dans les TNE à Bordeaux (essai clinique GALTEP utilisant le  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC) ou d'autres molécules innovantes ( $^{68}\text{Ga}$ -PSMA dans le cancer de la prostate). Afin d'envisager d'autres applications des récepteurs de la somatostatine nous avons recherché leur expression dans des lymphomes de Hodgkin. Enfin, nous nous sommes concentrés sur le développement de deux autres familles de neuropeptides; les récepteurs de la bombésine (GRP-R et NMB-R) et de la neurotensine (NTR<sub>1</sub>). Nous avons finement caractérisé l'expression du GRP-R dans le cancer du sein et développé une nouvelle classe de radiopeptides pour le ciblage des récepteurs de la bombésine. Enfin, nous avons étudié NTR<sub>1</sub> dans diverses tumeurs pour fournir le rationnel nécessaire au développement d'analogues de la neurotensine.

**Mots clés :**  $^{68}\text{Ga}$ , neuropeptide, cancer, imagerie moléculaire

---

## **Title : Neuropeptide receptors imaging for tumor targeting**

**Abstract :** Neuropeptide receptors can be highly expressed on the cell surface of tumor cells, paving the way to their visualization with Positron Emission Tomography (PET) using analogues radiolabeled with  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  or  $^{18}\text{F}$ , but also to select patients who can benefit from radiopharmaceutical therapy using similar analogues radiolabeled with  $^{177}\text{Lu}$  or  $^{90}\text{Y}$ . An example has been the development of somatostatin radio-analogues for imaging ( $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC) and therapy ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE) of neuroendocrine tumors (NET). This concept has gained insight since the discovery of other neuropeptides and their receptors (over)expressed on diverse tumors. This PhD has been conducted according to several axis, the first being the establishment of a  $^{68}\text{Ga}$ -radiolabeling platform (among the first in France) to introduce somatostatin receptor PET imaging of NET in Bordeaux (clinical trial GALTEP using  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC) but also other innovative molecules ( $^{68}\text{Ga}$ -PSMA for prostate cancer imaging). Furthermore, to consider other applications of somatostatin receptors we investigated their expression in Hodgkin's lymphomas. We then mainly aimed at investigating possibilities offered by two other families of neuropeptide receptors: bombesin receptors (GRP-R and NMB-R) and neurotensin receptors (NTR<sub>1</sub>). For the bombesin family, we have well characterized GRP-R expression in breast cancer and developed a novel class of radiopeptide for bombesin receptors targeting. Finally, we studied NTR<sub>1</sub> expression in various tumors (notably prostate cancer) to provide molecular basis necessary for the development of neurotensin analogues.

**Keywords:**  $^{68}\text{Ga}$ , neuropeptide, cancer, molecular imaging

---

### **Unité de recherche**

[Institut des Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, INCIA, UMR-CNRS 5287, 146 rue Léo Saignat, 33000 Bordeaux

# Remerciements

---

Elif Hindié

*Professeur à l'Université de Bordeaux*

*Médecin dans le service de médecine nucléaire de l'Hôpital Haut-Lévêque, CHU de Bordeaux*

Je te remercie d'avoir dirigé mes travaux de Thèse  
Reçois mes remerciements les plus sincères pour ta gentillesse

## **Au Président du jury**

Bernard Müller

*Professeur à l'Université de Bordeaux*

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider le jury de ma thèse  
Veuillez recevoir l'expression de ma sincère reconnaissance

## **Aux membres du jury**

Frédéric Courbon

*Professeur à l'Université de Toulouse*

*Médecin nucléaire à l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse - Oncopôle*

David Kryza

*Maitre de Conférences des Universités à l'Université de Lyon*

*Radiopharmacien aux Hospices Civils de Lyon*

Benjamin Guillet

*Professeur à l'Université Aix-Marseille*

*Radiopharmacien à l'Hôpital de la Timone – AP-HM*

Nicolas Sévenet

*Professeur à L'université de Bordeaux*

*Pharmacien dans le service d'oncogénétique de l'Institut Bergonié*

Philippe Fernandez

*Professeur à l'Université de Bordeaux*

*Médecin dans le service de Médecine Nucléaire de l'Hôpital Pellegrin – CHU de Bordeaux*

Gaétan Macgrogan

*Médecin anatomopathologiste à l'Institut Bergonié*

Je vous remercie de me faire l'honneur de juger cette Thèse.

Veillez recevoir l'expression de ma sincère reconnaissance

---

Par ailleurs, je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont permis l'aboutissement de ce projet.

Je souhaite exprimer ma sincère gratitude aux Prs Michèle ALLARD et Philippe FERNANDEZ qui sont à l'initiative de ce projet, qui m'encadrent tout au long de ma formation hospitalo-universitaire.

L'équipe des radiochimistes, avec Jürgen SCHULZ Ingénieur de Recherche au CNRS et Delphine VIMONT Ingénieur d'Etude pour leur encadrement actif et leur précieuse participation tout au long de ce travail.

L'équipe du laboratoire « Institut des Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine » INCIA UMR-CNRS 5287 pour leur encadrement, leurs conseils et leur aide technique.

L'équipe de l'unité TEP recherche de l'Hôpital Xavier Arnoz du Centre Hospitalo-Universitaire de Bordeaux pour m'avoir accueilli dans la bonne humeur.

Mes collègues radiopharmaciens du CHU de Bordeaux qui m'ont laissé le temps nécessaire à l'aboutissement de ce projet.

Enfin, les plus importants, ma chérie, ma famille et mes copains. Merci pour votre patience et vos encouragements.

<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE</b>	<b>11</b>
<hr/>	
<b>PREMIERE PARTIE - CONTEXTE SCIENTIFIQUE</b>	<b>13</b>
<hr/>	
<b>CHAPITRE 1 - NEUROPEPTIDES ET CANCER</b>	<b>15</b>
1. LES SYSTEMES DE REPECTEURS DE NEUROPEPTIDES	15
2. TUMEURS NEUROENDOCRINES	16
3. CANCER DE LA PROSTATE	17
4. CANCER DU SEIN	19
<b>CHAPITRE 2 - IMAGERIE ET NEUROPEPTIDES</b>	<b>22</b>
1. ANALOGUES RADIOMARQUES DE LA SOMATOSTATINE	23
2. ANTAGONISTES RADIOMARQUES DU GRP-R	24
3. ANALOGUES RADIOMARQUES DE LA NEUROTENSINE	25
4. ANALOGUES RADIOMARQUES DU NEUROPEPTIDE-Y	26
5. CONCLUSION	27
<b>CHAPITRE 3 - THERAPIE ET NEUROPEPTIDES</b>	<b>28</b>
<i>Article 1</i>	
<i>Article 2</i>	
<b>DEUXIEME PARTIE - MISE AU POINT D'UNE PLATE-FORME DE RADIOMARQUAGE AU <sup>68</sup>GA:</b>	
<b>VALIDATION METHODOLOGIQUE ET CLINIQUE</b>	<b>53</b>
<hr/>	
<b>CHAPITRE 1</b>	
<b>VALIDATION METHODOLOGIQUE DE LA PLATE-FORME DE RADIOMARQUAGE AU <sup>68</sup>GA</b>	<b>55</b>
<i>Article 3</i>	
<b>CHAPITRE 2</b>	
<b>PROJET DE RECHERCHE CLINIQUE GALTEP</b>	<b>71</b>
<i>ARTICLE 4</i>	
<b>CHAPITRE 3</b>	
<b>EXPLORATION D'AUTRES TUMEURS EN VUE D'ELARGIR LE CHAMP D'APPLICATION DES ANALOGUES RADIOMARQUES DE LA SOMATOSTATINE</b>	<b>95</b>
<b>TROISIEME PARTIE - UNE AUTRE FAMILLE DE NEUROPEPTIDE INNOVANTE: LA BOMBESINE ET SES REPECTEURS GRP-R ET NMB-R</b>	<b>99</b>
<hr/>	
<b>CHAPITRE 1</b>	
<b>RECHERCHE DU GRP-R DANS DES PHENOTYPES BIEN CARACTERISES DE CANCER DU SEIN</b>	<b>101</b>
<b>CHAPITRE 2</b>	
<b>PROPOSITION D'UN PROJET DE RECHERCHE CLINIQUE INNOVANT POUR INTRODUIRE L'IMAGERIE DU GRP-R EN FRANCE CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE CANCER DE LA PROSTATE</b>	<b>109</b>
<b>CHAPITRE 3</b>	
<b>DEVELOPPER DE NOUVEAUX ANALOGUES DE LA BOMBESINE A BORDEAUX</b>	<b>112</b>
<i>Article 5</i>	
<b>QUATRIEME PARTIE - ETUDES PRELIMINAIRES D'AUTRES REPECTEURS DE NEUROPEPTIDES POUR LE DEVELOPPEMENT DE NOUVELLES ARMES THERAPEUTIQUES</b>	<b>141</b>
<hr/>	

<b>CHAPITRE 1</b>	
<b>RECHERCHE DE NTR<sub>1</sub> DANS DIVERSES TUMEURS</b>	<b>143</b>
1. CANCER DE LA PROSTATE	145
2. CANCER DU SEIN	147
3. AUTRES TUMEURS	148
<b>CHAPITRE 2</b>	
<b>COLLABORATION AVEC DES CHIMISTES POUR AMELIORER LA STABILITE DE LA NEUROTENSINE</b>	<b>149</b>
<b>CHAPITRE 3</b>	
<b>LES RECEPTEURS DU NEUROPEPTIDE-Y (Y<sub>1</sub> ET Y<sub>5</sub>)</b>	<b>150</b>
<b><u>CINQUIEME PARTIE - SIMULATION MONTE-CARLO POUR LA SELECTION DE RADIO-ISOTOPES PERTINENTS POUR LA RADIOTHERAPIE METABOLIQUE</u></b>	<b><u>153</u></b>
<i>Article 6</i>	
<i>Article 7</i>	
<b><u>DISCUSSION GENERALE</u></b>	<b><u>209</u></b>
<b><u>CONTINUE DU TRAVAIL DE THESE</u></b>	<b><u>212</u></b>
<b><u>REFERENCES</u></b>	<b><u>213</u></b>
<b><u>PRODUCTION SCIENTIFIQUE</u></b>	<b><u>225</u></b>

## Glossaire

---

### Les produits

[<sup>18</sup>F]-FDG: [<sup>18</sup>F]-Fluoro-2-désoxy-D-glucose

[<sup>18</sup>F]-FDOPA: [<sup>18</sup>F]-dihydroxyphenylalanine

AcONH<sub>4</sub> : acétate d'ammonium

BBN : bombésine

BSA : *Bovine Serum Albumine* – Albumine Sérique Bovine

DMF : diméthylformamide

DOTA : Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododecane-*N,N',N'',N'''*-tétraacétique

DTPA : Acide diéthylène penta-acétique

HBTU: 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate

HOBT: Hydroxybenzotriazole

MeOH : Méthanol

NaOH : Hydroxyde de sodium

NODAGA : Acide 1,4,7-triazacyclononane-*N*-glutamic acid-*N',N''*-diacétique

NOTA : Acide 1,4,7-triazacyclononane-*N,N',N''*-triacétique

PBS : *Phosphate Buffer Saline* – Tampon Phosphate Salin

RPMI 1640: *Roswell Park Memorial Institute medium*

SVF : Sérum de Veau Foetal

TBS : *Tris Buffer Saline* - Tampon Salin Tris

TBST : TBS-tween

TFA : *Trifluoroacetic acid* - Acide trifluoroacétique

### Les techniques

ARG : Autoradiographie

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

HPLC : *High Pressure Liquid Chromatography* – Chromatographie Liquide Haute Pression

ICC: ImmunoCytoChimie



ICP-AES: *Inductive Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy* – Spectrométrie d'Emission Atomique à Plasma Couplé par Induction

IF : Immunofluorescence

IHC: Immunohistochimie

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique nucléaire

MALDITOF : *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight* - Spectrométrie de Masse d'Ionisation Laser Assistée par Matrice et Temps de Vol

PCR: *Polymerase Chain Reaction* – Réaction de Polymérase en Chaîne

TDM : Tomodensitométrie

TEMP : Tomographie d'Emission Monophotonique

TEP : Tomographie par Emission de Positons

## **Divers**

CE : Capture électronique

CCI: Carcinome Canalaire Infiltrant

cpm : coups par minute

GBq : Gigabecquerel

GIST : *Gastro-intestinal Stromal Tumor* – Tumeur Gastro-Intestinal Stromale

HER : *Human Epithelial Receptor* - Récepteur Epithélial Humain de type

kBq : kiloBecquerel

keV : kiloélectron-volt

MBq : MégaBecquerel

MeV : Mégaélectron-volt

NPY: Neuropeptide tyrosine

pm : picomètre

PP : Polypeptide pancréatique

PRC : Pureté radiochimique

PRN : Pureté radionucléidique

PYY : Polypeptide tyrosine tyrosine

RA : Récepteur aux androgènes

RE : Récepteur aux œstrogènes

rpm : rotations par minute

sst: récepteur de la somatostatine

SUV : *Standardized Uptake Value* – Valeur de Fixation Normalisée

$T_{1/2}$  : Demi-vie physique

TMA: *Tissue Micro Array*

## Table des figures

---

- Figure 1:** Représentation schématique de la liaison des antagonistes et agonistes en fonction de l'état d'activation du récepteur ..... 22
- Figure 2:** Images TEMP de l'<sup>111</sup>In-pentétréotide (gauche) et TEP du <sup>68</sup>Ga-DOTATOC (droite) utilisés chez le même patient atteint d'une tumeur neuro-endocrine avec multiples métastases hépatiques, ganglionnaires et osseuses. Ces dernières sont mieux visibles sur l'imagerie en TEP..... 23
- Figure 3 :** Vues coronales (A) et axiales (B et C) d'une TEP/TDM avec le <sup>68</sup>Ga-BAY86-7548 chez un patient atteint d'un cancer de la prostate avec de multiples métastases ganglionnaires. Les flèches vertes montrent les uretères et les flèches rouges montrent une forte captation du radiotracer avec des SUV<sub>max</sub> de 6,2 et 6,3 g/mL. .... 24
- Figure 4:** Images TEP/TDM du <sup>64</sup>Cu-CB-TE2A-AR06 obtenues chez deux patients atteints de cancers de la prostate prouvés histologiquement. Les images sont obtenues 4h après injection. A, B: Images coronales TEP et fusion TEP/TDM. C: Image de fusion TEP/TDM axiale. Il y a une captation intense dans la tumeur prostatique (flèches rouges) et dans le pancréas. D, E: Autre patient atteint d'un cancer de la prostate prouvé par histologie. Corrélation entre l'image TEP/TDM transaxiale *in vivo* et l'autoradiographie *ex vivo*..... 25
- Figure 5:** Images TEP bloquées (bas) et non bloquées (haut) obtenues 30 min, 1h et 2h après l'injection de l'analogue de la neurotensine <sup>18</sup>F-DEG-VS-NT chez des souris portant une xénogreffe HT-29. Les animaux bloqués ont reçu le <sup>18</sup>F-DEG-VS-NT co-injecté avec le fragment (8-13) de la neurotensine. .... 26
- Figure 6 :** Captation du [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-N<sup>α</sup>His-Ac-[Phe<sup>7</sup>,Pro<sup>34</sup>]-NPY chez une femme avec un cancer du sein. (\*: mammoscintigraphie; +: scintigraphie osseuse). .... 26
- Figure 7:** Images TEP au <sup>68</sup>Ga-DOTATATE d'un patient avant (A) et 3 mois après (B) traitement avec 15.2 GBq de <sup>177</sup>Lu-DOTA-JR11 et images TEP au <sup>68</sup>Ga-DOTATATE d'un autre patient avant (C) et 12 mois après (D) traitement avec 5.9 GBq de <sup>177</sup>Lu-DOTA-JR11. Le suivi à 3 mois (B) montre une diminution de captation par les métastases hépatiques et osseuses ainsi que dans la tumeur primitive pulmonaire droite (flèche). Le suivi à 12 mois de l'autre patient (D) montre une diminution de captation par les métastases hépatiques..... 28
- Figure 8:** Chromatogramme UV de la matière première DOTATOC..... 59
- Figure 9:** Gamme étalon du DOTATOC ..... 60
- Figure 10:** Chromatogramme UV du <sup>nat</sup>Ga-DOTATOC ..... 60

<b>Figure 11:</b> Gamme étalon de la solution de référence <sup>nat</sup> Ga-DOTATOC .....	61
<b>Figure 12 :</b> Chromatogrammes radio (gauche) et UV (droite) du produit fini <sup>68</sup> Ga-DOTATOC .....	61
<b>Figure 13:</b> Immunomarquage de sst <sub>2A</sub> sur une coupe de lymphome de Hodgkin EBV-induit de type scléronodulaire. A: grossissement 20X. B: grossissement 40X. ....	96
<b>Figure 14:</b> A: Expression relative du GRP-R dans différentes lignées cellulaires de cancer du sein. B: Western blot représentatif du GRP-R (réalisé à partir de lysats de tumeurs congelées). Une seule bande rouge au poids moléculaire attendu du GRP-R(43 - 64 kDa, donnée fournie par le fabricant) est visible confirmant la spécificité de l'anticorps utilisé. La bande verte est celle de la GAPDH. ....	105
<b>Figure 15:</b> Concordance des signaux obtenus en western blot et en immunohistochimie. A: L'expression du GRP-R est quantifiée en 4 groupes (0, 1+, 2+ et 3+). B: Pour les statistiques, les groupes 0 et 1+ ont été regroupés en "low" et les groupes 2+ et 3+ en "high" .....	106
<b>Figure 16:</b> A: Immunomarquage cytoplasmique à renforcement membranaire du GRP-R (grossissement 20X). B: Exemple d'immunoréactivité négative (grossissement 10X). C: Exemple d'immunoréactivité faible (grossissement 10X). D: Exemple d'immunoréactivité modérée (grossissement 10X). E: Exemple d'immunoréactivité fortement positive (grossissement 10X). ....	106
<b>Figure 17:</b> Diagramme de GANTT du projet UROPET .....	111
<b>Figure 18:</b> A: Forte expression de NTR <sub>1</sub> (grossissement 20X). B: Localisation subcellulaire de l'immunomarquage (grossissement 40X) .....	145
<b>Figure 19:</b> A: Expression de NTR <sub>1</sub> sur une coupe de cancer du sein triple négatif. B: Localisation subcellulaire de NTR <sub>1</sub> sur la même coupe (grossissement 40X) .....	147
<b>Figure 20:</b> Western blot d'Y <sub>1</sub> sur lignées cellulaires mammaires et prostatiques. ....	150
<b>Figure 21:</b> Western Blot d'Y <sub>5</sub> sur différentes lignées cellulaires mammaires et prostatiques .....	151

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 1:</b> lots de validation de la solution de chlorure de $^{68}\text{Ga}$ .....	59
<b>Tableau 2:</b> Lots de validation du $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC .....	62
<b>Tableau 3:</b> Données clinico-biologiques des lymphomes de Hodgkin étudiés.....	97
<b>Tableau 4:</b> Score IRS et classification IRS pour l'évaluation de l'immunohistochimie.....	104
<b>Tableau 5:</b> Comparaison des signaux obtenus en western blot et en immunocytochimie sur cellules fixées en Bouin de Hollande. ....	105
<b>Tableau 6:</b> Tableau de contingence entre l'expression du GRP-R et les données HER2, de statut tumoral et de Ki-67.....	107
<b>Tableau 7:</b> Caractéristiques phénotypiques et moléculaires des lignées cellulaires utilisées dans cette étude. +: positif; -: négatif; wt: sauvage; m: muté; del: délété.....	144

## Objectifs du travail de Thèse

---

La découverte des mécanismes moléculaires impliqués dans la prolifération, la survie des cellules tumorales, le processus d'invasion et de métastases a étayé le rationnel pour le développement d'une nouvelle approche thérapeutique basée sur le développement de molécules dirigées contre des cibles spécifiques. Cependant, la majorité de ces médicaments sont inefficaces lorsqu'ils sont administrés à des populations de patients non préalablement sélectionnées. Ces échecs soulignent l'importance de connaître les caractéristiques moléculaires tumorales de chaque patient. La méthode standard pour établir le phénotype moléculaire des cellules tumorales d'un patient est la biopsie, mais elle peut être difficile à réaliser en fonction de la localisation. De plus, une biopsie ne rend pas compte de l'hétérogénéité tumorale. L'imagerie nucléaire permet de répondre doublement à cette problématique car elle fournit, d'une part, des informations sur la biologie de la tumeur et sa localisation, et d'autre part, permet de prédire l'efficacité d'une thérapie ciblée et/ou de planifier une radiothérapie vectorisée. Le développement de cette imagerie/thérapie moléculaire est un des enjeux de la médecine personnalisée de demain. On parle alors de "théranostic"

Parmi les différentes voies de recherche ouvrant des perspectives théranostiques nous avons choisi de nous intéresser au potentiel offert par les neuropeptides et leurs récepteurs qui peuvent être fortement exprimés à la surface des cellules tumorales. L'exemple phare est celui des récepteurs de la somatostatine pour lesquels l'imagerie par Tomographie par Emission de Positons (TEP) avec des analogues radiomarqués au  $^{68}\text{Ga}$  (par exemple le  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC) permet de planifier une radiothérapie interne vectorisée avec ces mêmes analogues mais radiomarqués à l' $^{90}\text{Y}$  ou au  $^{177}\text{Lu}$  (par exemple  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC ou  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE).

Aujourd'hui, d'autres familles de neuropeptides émergent pour le ciblage tumoral.

**Ainsi, l'objectif de cette Thèse est de promouvoir le ciblage tumoral à l'aide d'analogues de neuropeptides radiomarqués.**

Ce travail de Thèse est présenté en cinq parties

Dans la **Première Partie**, l'intérêt des analogues de neuropeptides pour l'imagerie et la radiothérapie interne vectorisée est présenté dans une revue bibliographique, après avoir exposé l'expression des cibles moléculaires impliquées dans les tumeurs neuro-endocrines, le cancer du sein et le cancer de la prostate. Ces cancers nous apparaissent aujourd'hui parmi les plus pertinents pour l'utilisation d'analogues de neuropeptides à visée "théranostique".

Dans la **Deuxième Partie**, la mise au point d'une plate-forme de radiomarquage au  $^{68}\text{Ga}$  a été une étape indispensable pour implémenter l'imagerie TEP au  $^{68}\text{Ga}$  à Bordeaux. J'ai apporté ici mon expertise en tant que radiopharmacien et ce travail a fait l'objet de ma thèse d'exercice soutenue en 2014. Cette plate-forme a été validée sur le plan méthodologique mais également sur le plan clinique grâce à un essai clinique "GALTEP" mené en collaboration

avec des endocrinologues du CHU de Bordeaux. Cet essai prospectif a eu pour objectif de comparer les performances diagnostiques de la TEP/TDM au  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC par rapport à l'imagerie scintigraphique conventionnelle à l' $^{111}\text{In}$ -pentétréotide et au scanner pour la détection des tumeurs neuro-endocrines duodéno pancréatiques chez dix-neuf patients atteints de Néoplasie Endocrinienne Multiple de type 1 (NEM-1). Pour envisager de nouvelles applications des analogues radiomarqués de la somatostatine, nous avons ensuite exploré l'expression des récepteurs de la somatostatine dans des lymphomes et plus précisément dans le lymphome de Hodgkin.

Dans la **Troisième Partie** nous nous sommes intéressés à une autre famille de neuropeptides dont le potentiel translationnel est important: la bombésine et ses récepteurs GRP-R et NMB-R. A ce titre, nous avons finement caractérisé l'expression du GRP-R dans le cancer du sein grâce à un partenariat étroit avec l'Institut Bergonié (Dr G. Macgrogan). Ensuite, nous avons développé et caractérisé une nouvelle classe de peptides radiomarqués au  $^{68}\text{Ga}$  pour le ciblage de ces récepteurs grâce à une collaboration avec des chimistes de l'université de New Delhi (Pr A. K. Mishra).

Dans la **Quatrième Partie**, nous avons initié l'étude de l'expression des récepteurs de la famille de la neurotensine et du neuropeptide-Y dans diverses tumeurs, avec un intérêt particulier pour le cancer du sein, toujours en partenariat étroit avec l'Institut Bergonié. Ces deux systèmes de neuropeptides sont aujourd'hui moins connus en oncologie.

Enfin, dans la **Cinquième Partie**, dans une perspective de radiothérapie interne vectorisée à l'aide d'analogues de neuropeptides radiomarqués, nous avons modélisé et comparé la dose déposée par plusieurs radio-éléments pour sélectionner le plus adapté à l'irradiation  $\beta^-$  de cellules tumorales et de micrométastases. Ce travail a été réalisé en collaboration avec des physiciens du Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan (CENBG). Mon implication dans ce travail a constitué à sélectionner les radio-éléments à modéliser en fonction de diverses caractéristiques physiques et de radiochimie.

## Première partie

---

### Contexte scientifique

Article 1: Gallium-68: Chemistry and radiolabeled peptides exploring different oncogenic pathways. *Cancer Biother Radiopharm.* 2013;28(2):85-97

**Clément Morgat**, Elif Hindié, Anil Kumar Mishra, Michèle Allard, Fernandez Philippe.

Article 2: Targeting neuropeptide receptors for cancer imaging and therapy: Perspectives with bombesin, neurotensin and neuropeptide-Y receptors. *J Nucl Med.* 2014;55:1650-57.

**Clément Morgat**, Anil Kumar Mishra, Raunak Varshney, Michèle Allard, Philippe Fernandez, Elif Hindié



Les récepteurs de neuropeptides peuvent être fréquemment surexprimés à la surface des cellules tumorales et constituent donc des cibles moléculaires attractives pour le développement d'analogues radiomarqués par des émetteurs  $\gamma$  ( $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) pour l'imagerie par Tomographie d'Emission MonoPhotonique (TEMP) et plus récemment par des émetteurs  $\beta^+$  comme le  $^{68}\text{Ga}$ , le  $^{64}\text{Cu}$  ou le  $^{18}\text{F}$  pour l'imagerie TEP. La présence de ces récepteurs ouvre également la possibilité d'une radiothérapie métabolique à l'aide de ces mêmes analogues radiomarqués à  $^{90}\text{Y}$  ou au  $^{177}\text{Lu}$ , émetteurs  $\beta^-$ , voire avec des émetteurs  $\alpha$ . La connaissance détaillée de l'expression des récepteurs de neuropeptides dans des tumeurs spécifiques (incidence, homogénéité, hétérogénéité, densité d'expression sur les cellules tumorales) sont des pré-requis nécessaires pour envisager leur potentiel pour l'imagerie ou la radiothérapie interne vectorisée. Cependant, en raison de différences inter-espèces, les données obtenues à partir d'animaux peuvent ne pas être valides et, la présence de récepteurs de peptides sur des tumeurs doit être recherchée sur du matériel biologique humain pour une implémentation en clinique plus aisée (1). Ainsi, seules les études menées sur des échantillons humains seront décrites. Les récepteurs de neuropeptides sont non seulement pertinents dans des processus oncopathologiques mais ils peuvent également avoir une expression différentielle à différents temps de la cancérogénèse et de la progression tumorale ainsi que dans des sous-types tumoraux spécifiques(2,3).

Dans le **Chapitre 1**, nous présentons les systèmes de neuropeptides que nous avons sélectionnés pour ce travail de Thèse: somatostatine, bombésine, neurotensine et neuropeptide-Y. En outre, alors que les applications potentielles des récepteurs de neuropeptides en oncologie sont vastes, nous avons choisi de concentrer nos efforts sur les tumeurs neuro-endocrines, le cancer du sein et le cancer de la prostate.

Dans le **Chapitre 2**, nous exposons l'état de l'art de l'imagerie nucléaire à l'aide d'analogues de neuropeptides radiomarqués, avec un intérêt tout particulier pour l'imagerie TEP au  $^{68}\text{Ga}$ .

Enfin, dans le **Chapitre 3**, pour illustrer le concept de "théranostic", nous présentons rapidement la radiothérapie interne vectorisée avec des analogues de neuropeptide radiomarqués avec des émetteurs thérapeutiques.

# Chapitre 1

## Neuropeptides et cancer

Dans ce paragraphe, la biologie moléculaire et cellulaire de ces systèmes de neuropeptides (peptides initialement découverts dans le système nerveux central (SNC)) est décrite ainsi que la distribution des récepteurs dans les organes autres que le SNC. La distribution physiologique dans le SNC n'est pas abordée et dans la majorité des cas à peu d'implication après administration systémique, en raison de la barrière hémato-encéphalique. Les neuropeptides sont synthétisés dans des organes périphériques par un nombre limité de cellules spécialisées. Ils peuvent agir en tant qu'hormones autocrines, paracrines et endocrines. Ces neuropeptides se lient avec une haute affinité à leurs récepteurs endogènes et provoquent une internalisation du complexe agoniste-récepteur. Enfin, la transduction du signal implique des récepteurs couplés aux protéines G (sauf pour NTR<sub>3</sub>).

### 1. Les systèmes de récepteurs de neuropeptides

#### *Somatostatine*

La somatostatine peut être sous 2 formes biologiquement actives, la somatostatine-14 et la somatostatine-28. La somatostatine inhibe non seulement la libération de l'hormone de croissance à partir de l'hypophyse antérieure mais aussi la libération de diverses hormones comme la prolactine, la TSH (thyroid-stimulating hormone) de l'hypophyse, et l'insuline et le glucagon des cellules  $\beta$  et  $\alpha$  du pancréas. Ces actions sont médiées *via* des récepteurs couplés aux protéines G. Les 5 sous-types de récepteurs (sst<sub>1-5</sub>), appartiennent à 2 sous-familles: SRIF<sub>1</sub> (comprenant les sous-types sst<sub>2A/B</sub>, sst<sub>3</sub> et sst<sub>5</sub>) et SRIF<sub>2</sub> (comprenant les sous-types sst<sub>1</sub> et sst<sub>4</sub>)(4,5).

#### *Bombésine*

La bombésine est un tétradécapeptide découvert chez la grenouille "*Bombinabombina*". Deux peptides apparentés sont présents chez l'Homme, le gastrin-releasing peptide (GRP) et la neuromédine B (NMB), tous deux rencontrés dans le tractus gastro-intestinal. Le GRP et la bombésine ont les mêmes sept derniers acides aminés N-terminaux; cette séquence est responsable de la liaison de haute affinité avec le récepteur du GRP (GRP-R). Chez l'homme, le GRP est un peptide régulateur induisant la libération de gastrine, régulant la sécrétion d'acide gastrique et modulant la contraction des muscles lisses.

Chez l'Homme, trois récepteurs ont été clonés : le GRP-R (BB<sub>2</sub>) présentant une meilleure affinité pour le GRP que pour la NMB, le NMB-R (BB<sub>1</sub>) avec une affinité supérieure pour la NMB que pour le GRP, et BB<sub>3</sub> ou BRS<sub>3</sub> récepteur orphelin. Ils appartiennent tous à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G. Parmi les sous-types de récepteurs de la bombésine, le GRP-R est le plus étudié en oncologie nucléaire. Les rôles biochimiques et physiologiques de NMB-R et BRS<sub>3</sub> sont moins connus.

### *Neurotensine*

La neurotensine, un tridécapeptide, est présent dans le SNC, et en périphérie dans les cellules endocrines du tractus digestif.

Dans le SNC, la neurotensine provoque hypothermie, sédation, et analgésie alors que dans les organes périphériques, principalement l'intestin, la neurotensine agit comme une hormone paracrine et endocrine en régulant l'appétit et les sécrétions pancréatiques exocrines.

Les effets de la neurotensine sont médiés par trois sous-types de récepteurs, NTR<sub>1</sub> (sous-type de haute affinité), NTR<sub>2</sub> (sous-type de faible affinité) et NTR<sub>3</sub>. NTR<sub>1</sub> et NTR<sub>2</sub> appartiennent à la superfamille de récepteurs couplés aux protéines-G alors que le sous-type NTR<sub>3</sub> appartient à une famille récemment identifiée de sorting récepteur qui est strictement homologue à la protéine sortiline gp95 (95kDa). Dans les organes autres que le SNC, le sous-type NTR<sub>1</sub> est principalement rencontré dans le colon et le poumon et il est absent du pancréas et du tissu mammaire (6,7). La distribution des autres sous-types reste aujourd'hui peu étudiée.

### *Neuropeptide-Y*

Le système du neuropeptide Y est composé de trois peptides comportant chacun trente-six acides aminés : le neuropeptide tyrosine (NPY), le polypeptide tyrosine tyrosine (PYY) et le polypeptide pancréatique (PP). L'accent sera principalement mis sur le NPY car le PYY et le PP semblent moins utiles pour le ciblage tumoral.

Chez l'homme, NPY possède des fonctions intégratives dans les organes périphériques en induisant vasoconstriction et en stimulant l'absorption d'aliments.

Les actions biologiques du système du neuropeptide Y sont déclenchées par plusieurs sous-types de récepteurs qui sont des récepteurs hepta-hélicoïdaux, couplés aux protéines G et sont au nombre de six : Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub>, Y<sub>4</sub>, Y<sub>5</sub> et y<sub>6</sub>. Y<sub>3</sub> est en réalité un récepteur aux chémokines alors qu'y<sub>6</sub> est inactif chez l'Homme. Dans les organes périphériques, les sous-types Y<sub>1</sub> et Y<sub>2</sub> sont présents dans les organes reproducteurs, le colon, les reins (Y<sub>1</sub>), les glandes surrénales (Y<sub>1</sub>) et le tissu mammaire (Y<sub>2</sub>) (8,9).

## **2. Tumeurs neuroendocrines**

Les tumeurs neuro-endocrines (TNE) constituent un groupe hétérogène de tumeurs rares. Elles proviennent de cellules neuroendocrines de l'endoderme de l'intestin

embryonnaire et de la crête neurale. Les TNE peuvent se développer dans diverses localisations anatomiques. Cependant, les localisations primitives des TNE sont habituellement le tractus gastro-entéro-pancréatique (GEP) et les poumons. D'autres localisations moins fréquentes sont la peau, les glandes surrénales, la thyroïde et le tractus génital. Traditionnellement, les TNE GEP sont classées en fonction de leur origine dans l'intestin antérieur (pancréas, estomac, duodénum), l'intestin moyen (iléum, appendice) ou l'intestin postérieur (colon, rectum). Les TNE peuvent être aussi définies comme "fonctionnelles" (33 - 50%) ou "non fonctionnelles" selon les symptômes cliniques attribuables à une sécrétion hormonale. On distingue alors, les tumeurs carcinoïdes qui sécrètent de la sérotonine, les gastrinomes qui sécrètent de la gastrine, les insulinomes qui sécrètent de l'insuline, les glucagonomes qui sécrètent du glucagon et les VIPomes qui sécrètent du VIP (Vaso-intestinal Peptide). Le diagnostic des TNE primitives et de leurs métastases est difficile car elles se présentent souvent sous la forme de petites lésions avec des localisations anatomiques variables. Le diagnostic des TNE comprend des techniques d'imagerie morphologique comme la TDM, l'ultrasonographie et l'IRM associées à l'imagerie fonctionnelle par scintigraphie des récepteurs de la somatostatine (10).

### *Récepteurs de la somatostatine*

Les récepteurs de la somatostatine sont fréquemment exprimés dans les TNE GEP aussi bien dans la tumeur primitive que dans les métastases. La densité d'expression est souvent élevée. Différents sous-types de récepteurs peuvent être exprimés mais le sous-type sst<sub>2</sub> est de loin majoritaire (sst<sub>2</sub>>sst<sub>1</sub> = sst<sub>5</sub>>sst<sub>3</sub>>sst<sub>4</sub>) avec une localisation membranaire (11).

### **3. Cancer de la prostate**

Chez l'homme, le cancer de la prostate reste le cancer le plus fréquemment diagnostiqué. Le <sup>18</sup>F-FDG a un rôle dans l'évaluation de la réponse au traitement dans les formes métastatiques du cancer de la prostate, notamment dans la phase androgéno-indépendante (castration resistant) mais son utilité est limitée dans le diagnostic et le bilan d'extension de la maladie initiale ou de la récurrence biologique occulte après traitement à visée curative. Les analogues de la somatostatine radiomarqués au <sup>68</sup>Ga ont été évalués chez des patients atteints de cancer de la prostate, mais les résultats ne sont pas encourageants (12). La <sup>18</sup>F-Choline semble être plus utile pour la détection locale de la maladie métastatique en rechute biochimique et dans la détection de ganglions malins. Cependant ce médicament radiopharmaceutique n'est pas recommandé en première ligne pour le diagnostic du cancer de la prostate primitif en raison d'une sensibilité et d'une spécificité limitées pour le diagnostic différentiel entre le cancer de la prostate et des pathologies prostatiques bénignes.

Ainsi, il existe un besoin médical de développer l'imagerie non invasive dans des circonstances cliniques bien définies où l'imagerie actuelle fait défaut comme le guidage de biopsies prostatiques ou dans la détermination du site local ou distant de récurrence lors d'une

rechute biologique avec augmentation du PSA (Prostate Specific Antigen) pour envisager une radiothérapie de rattrapage ou encore dans la détermination du statut des ganglions lymphatiques chez des patients à haut risque métastatique.

Plusieurs autres "sondes" sont actuellement en développement clinique pour l'imagerie du cancer de la prostate comme des anticorps ( $^{111}\text{In}$ -capromab (13) et  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-J591 (14)) ou des petites molécules inhibitrices, radiomarquées au  $^{18}\text{F}$  ou au  $^{68}\text{Ga}$ , ciblant le PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen)(15) ou des molécules s'accumulant dans les cellules cancéreuses prostatiques *via* des transporteurs d'acides aminés comme l'analogue d'acide aminé  $^{18}\text{F}$ -FACBC (16). L'imagerie du cancer de la prostate à l'aide d'analogues de neuropeptides est le sujet d'intenses recherches, principalement centrées sur le ciblage du GRP-R, mais d'autres récepteurs pourraient étendre le champ d'application des récepteurs de neuropeptides.

### *Récepteurs de la bombésine*

Markvalder et ses collaborateurs ont initié l'étude de l'expression des récepteurs de la bombésine dans des tissus de cancers prostatiques humains et ont mis en évidence que le GRP-R est fortement exprimé dans les phases initiales de la transformation cancéreuse ainsi que dans les carcinomes invasifs suggérant un éventuel rôle lors de cette transformation car les tissus sains ont une faible expression et densité de GRP-R. Ainsi, les tumeurs bien différenciées devraient exprimer le GRP-R contrairement aux tumeurs peu différenciées (17). Néanmoins, certaines métastases osseuses androgéno-indépendantes peuvent exprimer parfois le GRP-R bien qu'elles soient peu différenciées. L'étude de 12 tumeurs primitives par la même équipe a confirmé la forte expression du GRP-R dans le cancer de la prostate (100%)(18). Récemment une étude a été réalisée sur un grand nombre de 530 spécimens de cancers de prostate pour clairement établir le profil d'expression du GRP-R en fonction de la progression tumorale. Les auteurs ont montré une surexpression du GRP-R dans les tumeurs primitives alors qu'aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les stades initiaux et avancés de la maladie (formes hormonorésistantes et métastatiques). De plus, la forte expression du GRP-R est significativement corrélée avec l'expression du récepteur aux androgènes et est associée à un meilleur pronostic bien que cette notion ait échoué lors de la significativité statistique. C'est pourquoi le GRP-R constitue une valeur pronostique lors d'une forte expression du récepteur aux androgènes (19). Bien qu'une expression modérée du GRP-R ait été mise en évidence dans les formes à hauts risques (stades avancés), les métastases ganglionnaires et osseuses expriment quand même le GRP-R avec une fréquence non négligeable (respectivement 85 et 52%)(20).

### *Récepteurs de la neurotensine*

Les récepteurs de la neurotensine ont été moins étudiés dans le cancer de la prostate comparé au GRP-R mais le sous-type  $\text{NTR}_1$  pourrait avoir un intérêt clinique. En effet, les stades précoces et avancés surexpriment  $\text{NTR}_1$ , ce qui suggère que le profil d'expression de ce récepteur ne varie pas en fonction de la tumorigenèse(21) mais plutôt en fonction du

phénotype tumoral: NTR<sub>1</sub> est exprimé dans les cellules basales (AR<sup>-</sup>) et est absent des cellules luminales (AR<sup>+</sup>) du cancer de la prostate (22). Ainsi, ce récepteur pourrait représenter un signal de croissance alternative en l'absence d'androgène ou lors d'un traitement anti-androgénique. Il est également impliqué dans la résistance à certaines chimiothérapies (23). De plus, il a été récemment montré que le blocage pharmacologique de NTR<sub>1</sub> est impliqué dans la radiosensibilisation de cellules de cancer de la prostate de hautsgrades(24). La neurotensine et son récepteur NTR<sub>1</sub> sont également impliqués dans les capacités d'invasion de cellules de cancer de la prostate (25).

Les autres sous-types de récepteurs (*i.e.*, NTR<sub>2</sub> et NTR<sub>3</sub>) pourraient également avoir un rôle dans la pathologie prostatique, mais les données disponibles sont encore trop disparates pour tirer les premières conclusions (22).

#### **4. Cancer du sein**

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué et représente la principale cause de décès chez la femme avec 1,7 millions de cas et 521900 décès en 2012. Chez la femme, le cancer du sein représente 25% des cas de cancers et 15% de décès dus aux cancers (26). Le cancer du sein est une pathologie hétérogène. Parmi les tumeurs invasives, les deux principales catégories sont les carcinomes canaux infiltrants (CCI) et les carcinomes lobulaires infiltrants (CLI). De plus, pour des arguments thérapeutiques le cancer du sein est divisé en sous-types distincts en fonction de la présence du récepteur aux œstrogènes (RE), du récepteur à la progestérone (RP) et de la présence ou l'absence de surexpression du récepteur du facteur de croissance épidermique humain de type 2 (her-2). Parmi eux, le phénotype triple négatif (qui n'exprime ni RE, ni RP et ne surexprime pas her-2) est associé à un mauvais pronostic et les traitements autres que la chimiothérapie sont limités. Il existe donc un besoin médical d'identifier de nouvelles cibles moléculaires à la surface des cellules tumorales pour améliorer la survie de ces patientes.

Suite aux analyses du transcriptome de cellules tumorales mammaires, les cancers du sein peuvent aussi être classés en sous-types moléculaires (*i.e.*, luminal A/B, basal-like, HER2 enrichi, moléculaire apocrine, claudin low), chacun ayant une valeur pronostique différente (27). Cette classification moléculaire se développe en parallèle de l'approche classique.

Des données préliminaires suggèrent que le rôle des neuropeptides dans ce nouveau cadre moléculaire mérite de plus amples investigations.

##### *Récepteur de la neurotensine*

Dans le tissu mammaire sain, le récepteur NTR<sub>1</sub> est peu ou pas exprimé alors qu'il a été fréquemment détecté dans les CCI (90-100 %) avec une densité modérée. Toutefois, un sous-groupe correspondant à 35 % des patientes atteintes de CCI présentent une grande proportion de cellules tumorales exprimant fortement NTR<sub>1</sub> ( $\geq 80$  %). De plus, NTR<sub>1</sub> a été proposé comme un facteur indépendant de mauvais pronostic car une analyse rétrospective a

montré qu'une forte expression de NTR<sub>1</sub> était positivement corrélée au grade SBR (Scarff Bloom Richardson), à la taille tumorale, au nombre de métastases ganglionnaires, à la récurrence, à la prise de chimiothérapie anticancéreuse, et à un plus faible taux de survie à 10 ans (66,2 % versus 96,5 %)(28). Il est important de signaler, que l'immunoréactivité de la neurotensine (le peptide) a aussi été mise en évidence dans les CCI et sa co-expression (20-30 % des cas) avec une forte expression de NTR<sub>1</sub> ( $\geq 80$  %) est négativement corrélée avec l'expression de RE $\alpha$ , et positivement corrélée au grade SBR 3 suggérant une implication autocrine du système neurotensine / NTR<sub>1</sub> dans la progression du cancer du sein. Plus récemment, la même équipe a démontré que l'activation du système neurotensine / NTR<sub>1</sub> provoque la surexpression des récepteurs HER1, HER2 et HER3, élargissant un peu plus le champ d'application possible des analogues de la neurotensine (29).

### *Récepteur de la bombésine*

Il a été montré que le GRP-R est exprimé dans les carcinomes *in situ* (stade précancéreux) mais aussi dans les carcinomes invasifs (62-72%) à haute densité mais avec une distribution hétérogène (18,30) suggérant que le profil d'expression du GRP-R ne varie pas en fonction du stade tumoral mais probablement en fonction du phénotype tumoral. Ainsi, chez des patientes métastatiques, toutes les métastases ganglionnaires expriment le GRP-R (100%) à haute densité uniquement lorsque la tumeur primitive est GRP-R positive. Dans une étude récente menée sur un Tissue Micro Array (TMA) de 200 tumeurs primitives et leurs métastases associées, l'immunoréactivité du GRP (le peptide) a été recherchée. Les patientes dont la tumeur primitive exprime fortement le GRP développent plus facilement des métastases et celles dont les métastases ganglionnaires expriment fortement le GRP ont un plus mauvais pronostic (68 *versus* 123 mois)(31). Une étude récente sur 50 échantillons de biopsies de cancer du sein a montré que l'expression de la protéine GRP-R est corrélée à l'expression de RE (32). La même équipe a peu de temps après publié une étude à plus grande échelle, confirmant les données de ces études pilotes mais à l'échelle de l'ARNm ce qui limite son champ d'application clinique (33).

### *Récepteur du neuropeptide-Y*

Les récepteurs au NPY ont été recherchés par autoradiographie sur des échantillons de tissu mammaire cancéreux ; 85 % expriment le sous-type Y<sub>1</sub>. De plus, 100% des métastases ganglionnaires expriment Y<sub>1</sub> si la tumeur positive est également positive à Y<sub>1</sub> (identique à ce qui est observé avec le GRP-R). L'utilisation de ligands sélectifs d'Y<sub>1</sub> et Y<sub>2</sub> a permis d'identifier Y<sub>1</sub> comme le sous-type majoritaire. Y<sub>2</sub> est moins exprimé (24%) et toujours concomitant à Y<sub>1</sub>. Par contre, dans le tissu mammaire sain (canaux et lobules) Y<sub>2</sub> est le sous-type majoritaire alors qu'Y<sub>1</sub> est retrouvé dans une minorité des cas et toujours concomitant à Y<sub>2</sub>. Il est donc raisonnable de penser qu'un switch Y<sub>2</sub>  $\rightarrow$  Y<sub>1</sub> a lieu lors du processus de cancérogénèse et d'invasion dans le cancer du sein(34). Des études de co-expression de

récepteurs réalisées sur des cancers primitifs du sein résécables ont mis en évidence que la plus forte densité de récepteurs est obtenue avec  $Y_1$  (et le GRP-R) (35).

### *Conclusion*

Le récepteur  $NTR_1$  représente à l'heure actuelle une des cibles les plus attractives dans le cancer du sein et à ce titre il a été proposé comme marqueur indépendant de mauvais pronostic. De plus, GRP-R et  $Y_1$  sont fréquemment surexprimés et devraient être particulièrement intéressants pour le ciblage de métastases lorsque la tumeur primitive est elle-même positive pour la présence de ces récepteurs. Il est important de noter qu'aucunes des études mentionnées ci-dessus n'a décrit l'expression de ces récepteurs en fonction des sous-types moléculaires. Ainsi, chaque récepteur de neuropeptides suscités pourrait être présent de façon sélective et représenter une signature moléculaire spécifique d'un sous-type donné de cancer du sein. De telles études seraient très utiles.



## Chapitre 2

### Imagerie et neuropeptides

Un radiopharmaceutique « idéal » doit avoir une clairance à partir du sang rapide, son métabolisme *in vivo* doit être aussi faible que possible, posséder une forte affinité et une captation tumorale spécifique avec un fort ratio signal tumeur/non tumeur. En raison de leur faible poids moléculaire, les peptides offrent souvent un meilleur compromis que les anticorps.

Classiquement, le ciblage des récepteurs de peptides utilise des agonistes comme c'est le cas avec le système de la somatostatine. Cependant, l'utilisation d'antagonistes à la place d'agonistes est le sujet d'intenses recherches (36,37). Les antagonistes ne sont pas internalisés dans les cellules tumorales après liaison aux récepteurs. Cependant, les principaux arguments pour l'utilisation des antagonistes sont une forte captation tumorale car la fixation de ces derniers est indépendante de l'état d'activation du récepteur (phosphorylation des protéines-G)(38). Ils utilisent donc plus de sites de liaisons à la surface des cellules tumorales alors que les agonistes ne ciblent que les récepteurs activés. **Figure 1.**

De plus, suite à leur internalisation, les agonistes subissent en partie une dégradation pouvant entraîner une dissociation du radioélément. Enfin, quand le neuropeptide endogène possède des propriétés de stimulation tumorale, un antagoniste est privilégié, notamment quand des quantités non négligeables doivent être administrées pour la radiothérapie interne vectorisée (36).

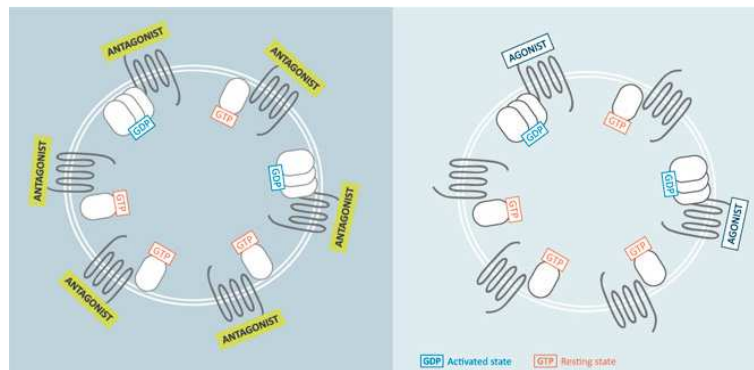


Figure 1: Représentation schématique de la liaison des antagonistes et agonistes en fonction de l'état d'activation du récepteur

Des efforts sont également fournis pour améliorer la stabilité métabolique des analogues peptidiques administrés par voie systémique, par exemple avec la co-administration d'inhibiteurs enzymatiques spécifiques pour améliorer la biodistribution et la captation tumorale (39).

## 1. Analogues radiomarqués de la somatostatine

Le ciblage des récepteurs de la somatostatine est utilisé depuis de nombreuses années pour l'imagerie planaire TEMP et hybride (TEMP/TDM) des tumeurs neuroendocrines avec l'<sup>111</sup>In-pentétréotide (40,41). Récemment, l'imagerie TEP avec les nouveaux analogues de la somatostatine DOTATOC, DOTATATE et DOTANOC radiomarqués au <sup>68</sup>Ga connaît un essor important en raison, de meilleurs profils d'affinités de ces nouveaux analogues vis à vis des différents sous-types de récepteurs de la somatostatine comparé à l'<sup>111</sup>In-pentétréotide (42,43), mais également en raison de la meilleure résolution et sensibilité apportées par l'imagerie TEP. **Figure 2.**

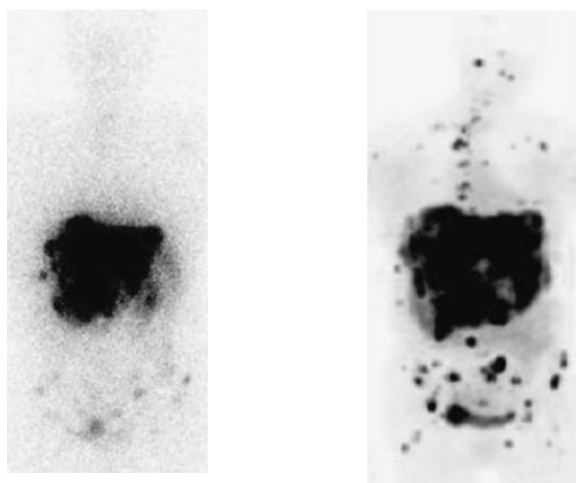


Figure 2: Images TEMP de l'<sup>111</sup>In-pentétréotide (gauche) et TEP du <sup>68</sup>Ga-DOTATOC (droite) utilisés chez le même patient atteint d'une tumeur neuro-endocrine avec multiples métastases hépatiques, ganglionnaires et osseuses. Ces dernières sont mieux visibles sur l'imagerie en TEP.

Ainsi, la TEP avec les nouveaux analogues de la somatostatine est supérieure à la scintigraphie à l'<sup>111</sup>In-pentétréotide et offre d'excellentes performances en termes de sensibilité (~ 95 %), spécificité (~ 92 %), exactitude (~ 96 %), de confort pour le patient (temps d'examen unique) et de coût (41,44,45). Ainsi, l'imagerie moléculaire TEP avec les nouveaux analogues de la somatostatine DOTANOC, DOTATOC et DOTATATE, radiomarqués au <sup>68</sup>Ga (46), ou au <sup>64</sup>Cu (47), a montré d'excellents résultats dans les TNE gastro-entéro-pancréatiques. Les données préliminaires obtenues dans les phéochromocytomes et les paragangliomes sont également très encourageantes (48).

### *Conclusion*

Pour l'exploration des TNE, la scintigraphie des récepteurs à la somatostatine avec l'<sup>111</sup>In-pentétréotide est aujourd'hui l'examen de référence. Cet examen permet d'imager les TNE sur-exprimant sst2. Cependant la scintigraphie des récepteurs à la somatostatine peut

être sous-optimale dans ces indications du fait des limites intrinsèques de l'imagerie TEMP mais également du profil d'affinité de  $^{111}\text{In}$ -pentétréotide vis-à-vis de sst2. Par ailleurs, l'utilisation de ce radiotraceur présente certaines limites dont la réalisation d'images sur 48h – 72h et une dosimétrie désavantageuse. C'est dans ce cadre qu'ont été introduits plusieurs DOTA-peptides radiomarqués au  $^{68}\text{Ga}$  pour l'imagerie TEP des récepteurs de la somatostatine.

## 2. Antagonistes radiomarqués du GRP-R

De nombreux analogues du GRP ont été étudiés pour le ciblage de tumeurs exprimant le GRP-R et certains ont déjà été transposés dans des essais cliniques (49).

La faisabilité d'un ciblage *in vivo* du récepteur au GRP a été apporté par Van de Wiele *et al* qui ont utilisé un agoniste sélectif de la bombésine, le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RP827 (50). Une captation spécifique est notée dans des cancers du sein primitifs ainsi que dans les métastases associées. Le ratio de fixation tumeur/tissu sain est significativement corrélé à l'expression du GRP-R. Par contre aucune captation n'est notée chez des patientes résistantes au tamoxifène présentant des métastases osseuses (51).

Parmi les antagonistes, le  $^{68}\text{Ga}$ -RM2, aussi appelé BAY86-7548, après avoir démontré son innocuité dans un essai clinique de phase I, a récemment été utilisé dans un essai de phase II chez 14 patients atteints d'un cancer de la prostate (11 patients naïfs de traitement, 2 en rechute biochimique après chirurgie et un patient hormono-résistant)(52,53).

La captation intraprostatique est bonne chez tous les patients (11/11) et est corrélée avec les données chirurgicales alors que la sensibilité pour la rechute ganglionnaire chez les 2 patients en rechute biochimique est modérée (**Figure 3**).

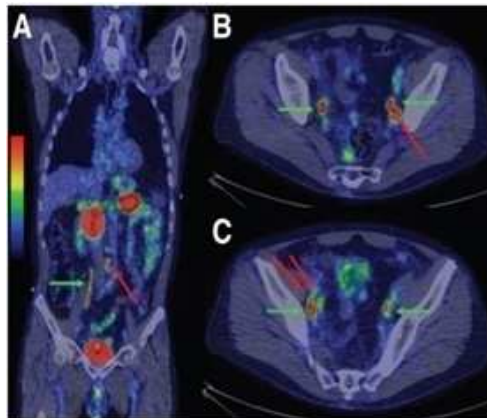


Figure 3 : Vues coronales (A) et axiales (B et C) d'une TEP/TDM avec le  $^{68}\text{Ga}$ -BAY86-7548 chez un patient atteint d'un cancer de la prostate avec de multiples métastases ganglionnaires. Les flèches vertes montrent les uretères et les flèches rouges montrent une forte captation du radiotraceur avec des  $\text{SUV}_{\text{max}}$  de 6,2 et 6,3 g/mL.

Des données préliminaires de phase II obtenues avec un autre antagoniste, le  $^{64}\text{Cu}$ -CB-TE2A-AR-06, suggèrent d'excellentes propriétés *in vivo*; cet analogue est métaboliquement stable et présente une captation focale chez 3/4 patients avec un cancer de la prostate récemment diagnostiqué (54)(**Figure 4**).

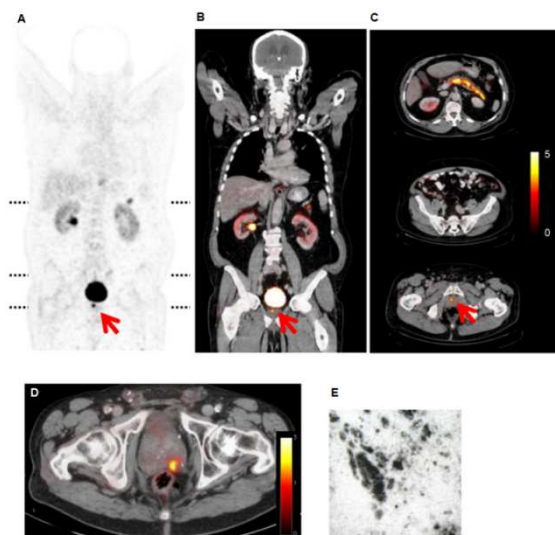


Figure 4: Images TEP/TDM du  $^{64}\text{Cu}$ -CB-TE2A-AR06 obtenues chez deux patients atteints de cancers de la prostate prouvés histologiquement. Les images sont obtenues 4h après injection. A, B: Images coronales TEP et fusion TEP/TDM. C: Image de fusion TEP/TDM axiale. Il y a une captation intense dans la tumeur prostatique (flèches rouges) et dans le pancréas. D, E: Autre patient atteint d'un cancer de la prostate prouvé par histologie. Corrélation entre l'image TEP/TDM transaxiale *in vivo* et l'autoradiographie *ex vivo*

Enfin, un analogue fluoré pour le ciblage *in vivo* du GRP-Ra présenté des résultats initiaux moins bons que ceux obtenus avec un marquage au  $^{68}\text{Ga}$  ou au  $^{64}\text{Cu}$  (55). Il existe aujourd'hui un intérêt croissant pour le ciblage du GRP-R dans les cancers urologiques (56). Des tumeurs autres que celles de la prostate devraient aussi être étudiées.

### 3. Analogues radiomarqués de la neurotensine

Les essais cliniques avec la première génération d'analogues de la neurotensine ont été quelque peu décevants. Buchegger *et al* ont utilisé le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NT-XI chez quatre patients atteints d'un adénocarcinome pancréatique canalaire : la captation tumorale est notée chez un seul patient (la tumeur de ce patient présentait une forte expression de récepteurs à la neurotensine *in vitro*). Cependant une forte captation était également présente dans plusieurs organes (57). Gabriel *et al* ont quant à eux utilisé la  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -demotensin-VI chez quatorze patients présentant diverses pathologies cancéreuses avancées (adénocarcinome pancréatique, cancer du poumon à petites cellules ou non à petites cellules et adénocarcinome du colon). Ce traceur est rapidement métabolisé et sa captation est limitée à trois métastases cérébrales provenant du cancer du poumon non à petites cellules (58).

Plus récemment, des avancées ont permis la synthèse d'analogues plus sélectifs et plus stables vis à vis de la dégradation enzymatique (59,60). Par exemple, le  $^{18}\text{F}$ -DEG-VS-NT a été étudié sur des souris nude portant des xénogreffes de cellules d'adénocarcinome du colon (HT-29)(61)(Figure 5).

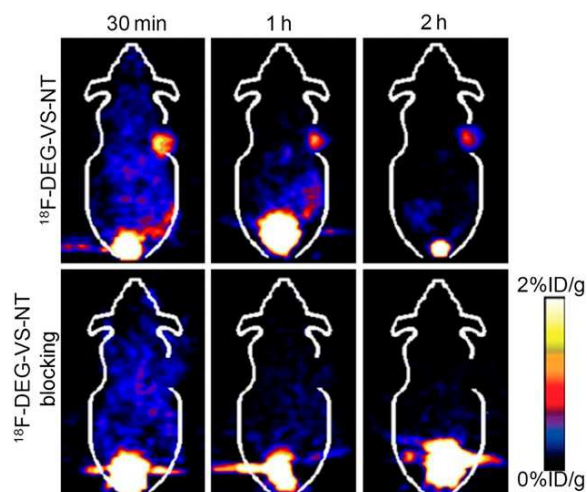


Figure 5: Images TEP bloquées (bas) et non bloquées (haut) obtenues 30 min, 1h et 2h après l'injection de l'analogue de la neurotensine  $^{18}\text{F}$ -DEG-VS-NT chez des souris portant une xénogreffe HT-29. Les animaux bloqués ont reçu le  $^{18}\text{F}$ -DEG-VS-NT co-injecté avec le fragment (8-13) de la neurotensine.

D'excellents résultats ont également été récemment publiés avec des analogues de la neurotensine radiomarqués au  $^{177}\text{Lu}$  présentant un motif 1,2,3-triazole (62). Ces résultats encourageants ouvrent la voie à une nouvelle classe d'analogues de la neurotensine. L'intérêt grandissant du  $\text{NTR}_1$  dans le cancer du sein et le cancer de la prostate devrait encourager leurs développements.

#### 4. Analogues radiomarqués du neuropeptide-Y

Des ligands de hautes affinités pour le récepteur  $\text{Y}_1$  ont été développés et étudiés *in vitro* et *in vivo* par l'équipe de Beck-Sickinger à Leipzig, Allemagne (63,64). La faisabilité du ciblage *in vivo* chez l'Homme a été apportée avec le  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-N}^{\alpha}\text{His-Ac-[Phe}^7\text{,Pro}^{34}\text{]-NPY}$  chez des patientes atteintes de cancers du sein. Les tumeurs exprimant le récepteur  $\text{Y}_1$  sont visibles (**Figure 6**). Un antagoniste peptidique dimérique a été récemment synthétisé et présente une forte affinité et sélectivité pour  $\text{Y}_1$ (65). Un analogue du NPY radiomarqué au  $^{18}\text{F}$  a également récemment montré des résultats pré-cliniques intéressants dans le cancer du sein (66).

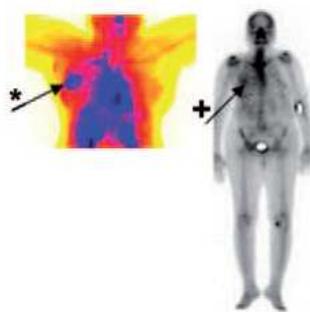


Figure 6 : Captation du  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-N}^{\alpha}\text{His-Ac-[Phe}^7\text{,Pro}^{34}\text{]-NPY}$  chez une femme avec un cancer du sein. (\*: mammoscintigraphie; +: scintigraphie osseuse).

## **5. Conclusion**

La surexpression de différents récepteurs de neuropeptides dans des cancers spécifiques ouvre la voie à de nouvelles stratégies pour l'imagerie et la thérapie ciblée de ces cancers. Le potentiel pour des applications pré-cliniques et cliniques des analogues de neuropeptides est remarquable. En outre, ces radiopeptides devraient permettre une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques tumoraux, à l'origine de nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques. Par exemple, l'introduction des analogues de la somatostatine radiomarqués au  $^{68}\text{Ga}$  a significativement amélioré la qualité de l'imagerie des tumeurs neuroendocrines grâce à la meilleure résolution de l'imagerie TEP et des meilleures affinités des analogues de nouvelle génération.

Les analogues radiomarqués de la bombésine ont également des applications cliniques prometteuses pour la détection précoce du cancer de la prostate et des métastases de cancer du sein grâce à l'imagerie moléculaire du GRP-R.

Les analogues radiomarqués de la neurotensine pourraient représenter des outils moléculaires intéressants pour l'imagerie et la thérapie mais certaines conditions doivent être préalablement remplies comme la diminution de la captation rénale ou l'amélioration de la prévention de la néphrotoxicité par l'administration d'acides aminés, comme c'est le cas avec certains analogues radiomarqués de la somatostatine(67).

Le développement et les applications d'analogues de neuropeptides a encore un long chemin à parcourir. La recherche multidisciplinaire, à l'interface de l'imagerie, de la biologie moléculaire des peptides et de l'oncogénèse moléculaire guidera le développement de nouveaux analogues de neuropeptides qui représenteront dans un futur proche d'importants outils pré-cliniques et cliniques.

## Chapitre 3

### Thérapie et neuropeptides

Les agonistes des récepteurs de la somatostatine radiomarqués à  $^{90}\text{Y}$  ou au  $^{177}\text{Lu}$  sont aujourd'hui largement utilisés pour le traitement de patients atteints de tumeurs neuro-endocrines bien différenciées métastatiques et/ou inopérables de grade 1 ou 2 (ENETS) avec un effet certain sur la survie globale de ces patients (40,68). Avec une protection rénale adaptée, les effets secondaires sont limités. Ces mêmes analogues ont également été radiomarqués avec des émetteurs  $\alpha$  (*i.e.*  $^{213}\text{Bi}$ -DOTATOC) et ont montré leur utilité dans le traitement des TNE réfractaires à l'irradiation  $\beta$  au  $^{177}\text{Lu}/^{90}\text{Y}$ -DOTATOC (69).

Les antagonistes radiomarqués des récepteurs de la somatostatine pour la radiothérapie métabolique sont moins utilisés que les agonistes, mais les données cliniques préliminaires suggèrent une meilleure efficacité thérapeutique avec les antagonistes (37). L'utilisation d'antagonistes radiomarqués ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11, OPS201®) permettrait de délivrer une dose à la tumeur supérieure à celle fournie par les agonistes ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE) **Figure 7**(37).

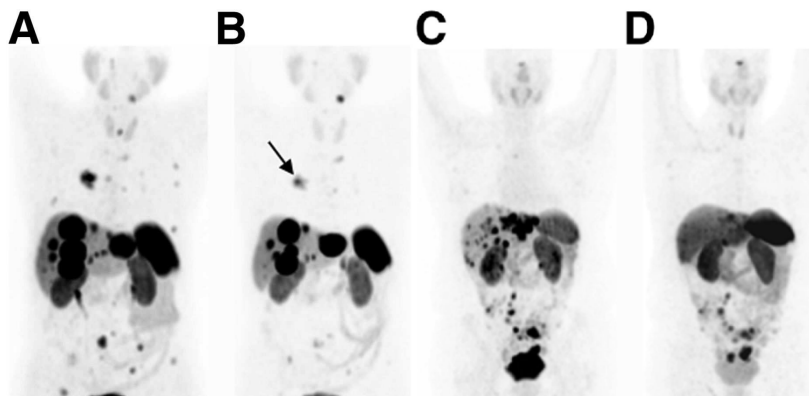


Figure 7: Images TEP au  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATATE d'un patient avant (A) et 3 mois après (B) traitement avec 15,2 GBq de  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 et images TEP au  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATATE d'un autre patient avant (C) et 12 mois après (D) traitement avec 5,9 GBq de  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11. Le suivi à 3 mois (B) montre une diminution de captation par les métastases hépatiques et osseuses ainsi que dans la tumeur primitive pulmonaire droite (flèche). Le suivi à 12 mois de l'autre patient (D) montre une diminution de captation par les métastases hépatiques.

Les applications cliniques d'analogues radiomarqués des récepteurs la bombésine ou du GRP pour le traitement de tumeurs exprimant le GRP-R sont beaucoup moins nombreuses. Par exemple, le  $^{177}\text{Lu}$ -AMBA a été utilisé dans une étude de phase I chez 7 patients atteints de cancers de la prostate. De nombreux effets indésirables, une faible stabilité plasmatique et une progression de la maladie ont été noté chez tous les patients (70). Néanmoins, le caractère

agoniste de ce composé et son absence de sélectivité vis à vis des récepteurs de la bombésine (il est affiné pour les sous-types 1 et 2 des récepteurs de la bombésine) sont des freins à son utilisation clinique. Des antagonistes spécifiques du GRP-R radiomarqués au  $^{177}\text{Lu}$  seraient plus adaptés mais la détermination de l'expression préférentielle du GRP-R dans différents sous-types de cancer du sein est nécessaire avant de définir pour quels sous-types la radiothérapie métabolique à l'aide d'analogues radiomarqués du GRP pourraient être pertinente.

Enfin, les données cliniques initiales concernant des patients ayant bénéficié d'une radiothérapie métabolique avec des analogues de la neurotensine radiomarqués au  $^{177}\text{Lu}$  sont prometteuses (71). La preuve de l'implication de  $\text{NTR}_1$  dans de nombreux processus tumoraux permettra de développer encore plus la radiothérapie interne vectorisée de ces tumeurs.



Article 1: Gallium-68: Chemistry and radiolabeled peptides exploring different oncogenic pathways. *Cancer Biother Radiopharm.* 2013;28(2):85-97

**Clément Morgat**, Elif Hindié, Anil Kumar Mishra, Michèle Allard, Fernandez Philippe.

# Gallium-68: Chemistry and Radiolabeled Peptides Exploring Different Oncogenic Pathways

Clément Morgat, Elif Hindié, Anil K. Mishra, Michèle Allard, and Philippe Fernandez

## Abstract

Early and specific tumor detection and also therapy selection and response evaluation are some challenges of personalized medicine. This calls for high sensitive and specific molecular imaging such as positron emission tomography (PET). The use of peptides for PET molecular imaging has undeniable advantages: possibility of targeting through peptide-receptor interaction, small size and low-molecular weight conferring good penetration in the tissue or at cellular level, low toxicity, no antigenicity, and possibility of wide choice for radiolabeling. Among  $\beta^+$ -emitter radioelements, Gallium-68 is a very attractive positron-emitter compared with carbon-11 or fluorine-18 taking into account its easy production via a  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generator and well established radiochemistry. Gallium-68 chemistry is based on well-defined coordination complexes with macrocycle or chelates having strong binding properties, particularly suitable for linking peptides that allow resistance to *in vivo* transchelation of the metal ion. Understanding specific and nonspecific molecular mechanisms involved in oncogenesis is one major key to develop new molecular imaging tools. The present review focuses on peptide signaling involved in different oncogenic pathways. This peptide signalization might be common for tumoral and non-tumoral processes or could be specific of an oncological process. This review describes gallium chemistry and different  $^{68}\text{Ga}$ -radiolabeled peptides already in use or under development aiming at developing molecular PET imaging of different oncological processes.

**Key words:** cancer,  $^{68}\text{Ga}$ , molecular imaging, PET, radiopharmaceuticals

## Introduction

The anticipated success of personalized medicine depend on molecular-targeted drug having a linked diagnostic test designed to precisely determine whether a patient will benefit from the specific treatment or to monitor targeted therapy as a way to determine ongoing efficacy. Consequently, early and pathological-specific process detection of tumors in humans is one of the challenges of theranostics (*i.e.* the merging of drug therapy and diagnostics to advance personalized medicine). In this context, molecular imaging plays a leading role in exploring, in a given patient, pathogenesis-related specific biochemical dysfunctions. Among molecular imaging techniques, nuclear methods are by far the most sensitive. Apart from localization and quantification, the most important advantage of such molecular imaging is the opportunity it provides to investigate the dynamics of pathogenesis-specific molecular process *in vivo*. Due to its high sensitivity for detec-

tion of small amount of radioactivity emitted by the radiopharmaceuticals of known chemistry, and the possibility of quantification, Positron Emission Tomography (PET) is now widely utilized. PET has been used as a research tool for more than two decades, and it affords researchers the ability to conduct both functional and molecular imaging on biological and biochemical processes *in vivo*. In functional imaging, biological parameters such as metabolic rate and perfusion that can be altered by diseases or treatment are monitored. In molecular imaging, PET can be used to examine and quantify cellular events such as cell trafficking, receptor binding, and gene expression. Therefore, PET is an important modality to elucidate mechanisms associated with diseases and drug interactions. Today, PET is used as a powerful nuclear medicine technique for diagnosis and therapy follow-up of many tumors, but it is not pathogenesis-specific because the most currently used radiotracer is [ $^{18}\text{F}$ ]-2-fluoro-deoxy-D-glucose ([ $^{18}\text{F}$ ]-FDG) that only reveals *in vivo* metabolic activity.<sup>1</sup>

---

INCIA, UMR 5287, Univ. Bordeaux, Talence, France.

Address correspondence to: Clément Morgat; INCIA, UMR 5287, Univ. Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, Bat 2A - 2ème étage, Bordeaux F-33076, France  
E-mail: clement.morgat@chu-bordeaux.fr

In the last decade, several new  $\beta^+$  isotopes have been produced promoting PET development (see Table 1).<sup>2-5</sup> The choice of the PET radionuclide is imposed by its physical half-life, positron branching, production mode, chemistry involved in radiolabeling, and potential effects on the intrinsic spatial PET resolution. For example, radionuclides such as  $^{66}\text{Ga}$  or  $^{86}\text{Y}$  with high  $\beta^+$  maximum energy emit positrons with high range in the matter, which considerably lower spatial resolution particularly important during pre-clinical studies using  $\mu\text{PET}$  imaging system. They have to be carefully manipulated.

Most  $\beta^+$ -emitters are still dependent on an on-site cyclotron. Until nowadays, the two major positron-emitters mainly used for PET molecular imaging are  $^{11}\text{C}$  and  $^{18}\text{F}$ . They present some limitations in radiopharmaceutical development, namely

- $^{11}\text{C}$ : the ubiquitous presence of carbon in any organic molecule makes  $^{11}\text{C}$  an attractive radioisotope for labeling biomolecules because it does not change the chemical structure and the biological properties of the original molecule. For instance,  $^{11}\text{C}$ -labeled methionine is derived from its precursor homocysteine thiolactone rendering methyl group in the system.<sup>6</sup> Several other  $^{11}\text{C}$ -labeled compounds that sustain their biological integrity like [ $^{11}\text{C}$ ]-Choline, [ $^{11}\text{C}$ ]-Acetate are routinely in use.<sup>7</sup> Almost all syntheses involving  $^{11}\text{C}$  begins with [ $^{11}\text{C}$ ]CO<sub>2</sub> and [ $^{11}\text{C}$ ]CH<sub>4</sub> as primary products. The most widely used method for introducing  $^{11}\text{C}$  into a biomolecule is an alkylation reaction, using functional groups such as [ $^{11}\text{C}$ ]CH<sub>3</sub>I or [ $^{11}\text{C}$ ]CH<sub>3</sub>OTf, which are derived from the primary products. However, the syntheses with  $^{11}\text{C}$  present several features: limited number of labeled precursors, submicromolar amounts of the starting materials, and necessity of development of rapid synthetic procedures (multistep syntheses are not generally used for the synthesis of  $^{11}\text{C}$ -labeled molecules) to incorporate the  $^{11}\text{C}$  radioisotope into the biomolecule. Due to these reasons and its relatively short half-life (20.37 minutes), and the necessity of a very closed biomedical cyclotron to PET camera,  $^{11}\text{C}$  has been less developed to clinical applications as opposed to its  $^{18}\text{F}$  counterpart.

- $^{18}\text{F}$  could act as a bioisosteric replacement for a hydrogen atom in a molecule and may imitate a hydroxyl group. Radiochemistry with  $^{18}\text{F}$  implies special challenges and direct incorporation (*i.e.*  $^{18}\text{F}$  is introduced in one step using [ $^{18}\text{F}$ ]F<sup>-</sup> ion as reagent for nucleophilic reactions or [ $^{18}\text{F}$ ]F<sub>2</sub> as reagent for electrophilic reactions) of  $^{18}\text{F}$  at high specific radioactivity into peptides or proteins is not possible due to the harsh reaction conditions needed during labeling reaction (high temperature and high alkalinity), which may decompose or denature the peptide of interest. Nowadays, direct labeling is used for the routine synthesis of [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG<sup>8</sup> and [ $^{18}\text{F}$ ]-FDOPA.<sup>9</sup>

To overcome the risk of denaturation, radiofluorination procedure can be performed using fluorinated prosthetic groups that will then react with functional groups of peptides (e.g. carboxylic acid and amine or sulfhydryl-reactive bioconjugate) under mild conditions.<sup>10,11</sup> This strategy requires a multistep approach and several reactions (synthesis and purification) that lengthen the time required for the radiosynthesis are needed. Thereby, as for  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ -labeling procedures are performed in an in-site biomedical cyclotron. [ $^{18}\text{F}$ ]-SFB (N-succinimidyl,4-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorobenzoate) is an example of prosthetic groups used for indirect  $^{18}\text{F}$ -labeling that reacts with lysine residue of proteins.<sup>12</sup>

Another option to support hospitals with relevant PET radionuclides is using radionuclide generators.<sup>13-17</sup> Generators-based radionuclides would allow easier availability and more flexibility in use. The decay of a long-lived parent nuclide to a short-lived PET daughter radionuclide provides an inexpensive and convenient alternative. As a consequence,  $^{68}\text{Ga}$  has emerged with high potential in clinical PET molecular imaging. Several advantages over  $^{11}\text{C}$  and  $^{18}\text{F}$ , for the development of radiopharmaceuticals are as follows:

- A production much more easier than  $^{11}\text{C}$  and  $^{18}\text{F}$  because it comes from the decay of  $^{68}\text{Ge}$  in  $^{68}\text{Ga}$  in an in-house  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generator;  $^{68}\text{Ga}$  is thus available "on demand" after elution of the system, similar to the production of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , unlike  $^{11}\text{C}$  and  $^{18}\text{F}$  are cyclotron-produced isotopes. The usefulness of imaging based on

TABLE 1. EXAMPLES OF POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY RADIONUCLIDES, THEIR PHYSICAL PROPERTIES, PRODUCTION MODE, AND STABLE PRODUCT DECAY

Radioisotope	Physical half-life	Production	Positron branching	$E^{\beta^+}_{max}$	Chemistry	Stable decay product
$^{11}\text{C}$	20.37 min	Cyclotron	99.75%	960.5 keV	Covalent	$^{11}\text{B}$
$^{13}\text{N}$	9.97 min	Cyclotron	99.82%	1198 keV	Covalent	$^{13}\text{C}$
$^{15}\text{O}$	2.04 min	Cyclotron	99.89%	1735 keV	Covalent	$^{15}\text{N}$
$^{18}\text{F}$	1.83 h	Cyclotron	96.86%	633.5 keV	Covalent	$^{18}\text{O}$
$^{44}\text{Sc}$	3.97 h	$^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ generator	94.27%	1474.3 keV	Coordination	$^{44}\text{Ca}$
$^{62}\text{Cu}$	9.74 min	$^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$ generator	98.00%	2910 keV	Coordination	$^{62}\text{Ni}$
$^{64}\text{Cu}$	12.7 h	Cyclotron	17.86%	653.1 keV	Coordination	$^{64}\text{Ni}$
$^{66}\text{Ga}$	9.49 h	Cyclotron	56.00%	4153 keV	Coordination	$^{66}\text{Zn}$
$^{68}\text{Ga}$	67.71 min	$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator	89.14%	1899 keV	Coordination	$^{68}\text{Zn}$
$^{86}\text{Y}$	14.7 days	Cyclotron	34.00%	3150 keV	Coordination	$^{86}\text{Sr}$
$^{89}\text{Zr}$	78.41 h	Cyclotron	23.00%	897 keV	Coordination	$^{89}\text{Y}$
$^{94\text{m}}\text{Tc}$	52 min	Cyclotron	72.00%	2470 keV	Coordination	$^{94}\text{Mo}$
$^{124}\text{I}$	4.18 days	Cyclotron	22.00%	2100 keV	Covalent	$^{124}\text{Te}$

$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  systems are supported by a large number of studies on  $^{68}\text{Ga}$ -labeled molecules.<sup>18–26</sup> So,  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generator might become in future what  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  generator is today for nuclear medicine.

- Because of its advantageous half-life (67.71 minutes),  $^{68}\text{Ga}$  is a valuable metallic radionuclide in PET suitable for the pharmacokinetics of many peptides.
- Finally,  $^{68}\text{Ga}$  has to be coordinated by a macrocycle to be introduced in a targeted peptide. This chelate allows formation of stable complexes with various trivalent radiometals for imaging or targeted radionuclide-therapy applications paving the way for multimodal imaging agents including PET-MRI.

However, the introduction of this macrocycle may alter the pharmacological and/or pharmacokinetics properties of the biomolecule. Reubi et al. have shown that addition of a DOTA chelator to a pan-somatostatin analog, named 406-040-15, triggers a switch at somatostatin receptor subtype 3 (sst3) receptor from an antagonist to an agonist profile.<sup>27</sup> So, macrocycle linked bioconjugate could exhibit different pharmacological properties compared to the precursor and has to be biologically validated.

In the present article, we will first discuss about gallium chemistry; isotopes and molecular imaging agents based on gallium use and then describe the different processes, specific and nonspecific, involved in carcinogenesis, focusing on the ability to target processes with peptides radiolabeled with  $^{68}\text{Ga}$  under development.

## Gallium

### Gallium chemistry

Gallium is a strong Lewis acid because of its high charge density and small ionic radius (62 pm) and could form thermodynamically stable complexes with strong Lewis bases.<sup>28,29</sup> In aqueous solutions, gallium is stable only as a trivalent cation  $\text{Ga}^{3+}$  under acidic conditions. (The low-valent oxidation state (+I) is not of significance in aqueous media and has no relevance in the radiolabeling of radiopharmaceuticals). *pKa* value of  $\text{Ga}^{3+}$  ion in its hydrated form is 2.6.<sup>28</sup> Between pH 3 and 9, insoluble gallium  $[\text{Ga}(\text{OH})_3]$  is the predominant species, whereas at pH >9.6 soluble gallate ion  $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$  formation begins.

The  $\text{Ga}^{3+}$  cation has a  $d^{10}$  electron configuration and accepts different coordination numbers (usually 4–6), while not displaying preferences for particular coordination polyhedron. Complexation of  $\text{Ga}^{3+}$  ion is mainly based on ligands containing oxygen, nitrogen, and sulfur donor atoms.

### Gallium isotopes

Naturally occurring gallium consists of two isotopes,  $^{69}\text{Ga}$  and  $^{71}\text{Ga}$  (respectively 60.1% and 39.9% natural abundance). Three radioisotopes of gallium are available for labeling of peptides and small molecules. Two of these,  $^{66}\text{Ga}$  ( $T_{1/2}=9.49$  hours) and  $^{68}\text{Ga}$  ( $T_{1/2}=67.71$  minutes), decay by positron-emission and are therefore suitable for PET imaging,  $^{67}\text{Ga}$  ( $T_{1/2}=78.3$  hours) decays by gamma-emission and is used for SPECT imaging.  $^{68}\text{Ga}$  is a short-lived positron-emitter available through the  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  radionuclide generator system. The long-lived  $^{68}\text{Ge}$  ( $T_{1/2}=270.9$  days) is accelerator-produced by the  $^{69}\text{Ga}$  ( $p,2n$ )  $^{68}\text{Ge}$  nuclear reaction and

decays by pure orbital electron capture and produces a short-lived  $^{68}\text{Ga}$ , which is a positron-emitter (high  $\beta^+$ -branching of 89%,  $E_{\beta^+ \text{max}}=1899$  keV).<sup>30</sup> Commercially available generators contain  $^{68}\text{Ga}$  absorbed onto a solid  $\text{TiO}_2$  chromatographic support, generators based on a  $\text{SnO}_2$  solid support are also available. Recently, other kinds of supports have been proposed. Chakravarty et al. developed a nano-zirconia based  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generator<sup>31</sup> and Nakayama et al. built a column containing an N-methylglucamine group linked to styrene-divinylbenzene copolymer beads, which exhibits high affinity to  $^{68}\text{Ge}$  and low affinity to  $^{68}\text{Ga}$  allowing elution of  $^{68}\text{Ga}$  from the system.<sup>32</sup>

### Gallium-based molecular imaging agents

The design of most molecular imaging agents is based on the use of bifunctional chelating agents, that is, a “platform” able to coordinate the radiometal on one side and to conjugate biomolecules through an appropriate functional group on the other side.

Like other metallic radionuclides ions ( $\text{Y}^{3+}$ ,  $\text{In}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zr}^{4+}$ ,  $\text{Sc}^{3+}$ ), gallium cannot be incorporated into radiopharmaceuticals vectors by covalent bonding, but has to be complexed with a chelate using well established coordination chemistry. Two main conditions are needed to develop suitable gallium-based radiopharmaceuticals; on the one hand, stability to hydrolysis to prevent formation of insoluble and soluble gallium hydroxides and on the other hand,  $^{68}\text{Ga}$ -complexes have to be more stable than  $^{68}\text{Ga}$ -transferrin complex to avoid transchelation because transferrin displays two iron binding sites with high affinity for this metal ion. ( $\text{Ga}^{3+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  have similar oxidation state and ionic radii, respectively 62 pm and 65 pm, and the formation constant of Ga-transferin complex,  $\log K_1$ , is 20.3).<sup>28,33–36</sup>

For *in vivo* applications, kinetic inertness can be more important than thermodynamic stability and strong ligand coordination is always required to achieve sufficient stability.

Generally, acyclic chelator complexes are less kinetically inert than macrocycle complexes of comparable stability. Most chelating agents that form highly stable complexes with  $\text{Ga}^{3+}$  are hexadentate, to sequester  $\text{Ga}^{3+}$  up to its maximum coordinate number of six, and contain carboxyl, amino, or thiol groups. Polyaminocarboxylates macrocycles such as 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*N*, *N'*, *N''*, *N'''*-tetraacetic acid (DOTA), or 1,4,7-triazacyclononane-*N*, *N'*, *N''*-triacetic acid (NOTA) and its NCS or N-hydroxysuccinimide derivatives, for example, (DOTA-NCS or DOTA-NHS) respond to these characteristics and show excellent *in vivo* stability (Fig. 1). Other tetra- or pentadentate ligands have also been described.<sup>33</sup>

DOTA is potentially octadentate while NOTA is hexadentate. So, DOTA can more than saturate the usual six-coordinate sphere of  $\text{Ga}^{3+}$ . A study led by Viola et al. was carried out to better understand Ga-DOTA complex structure and geometry (complex was formed by reaction between gallium chloride and DOTA macrocycle in aqueous solution under acidic condition (pH value 5), with regard to reaction stoichiometry). This consists of a  $\text{N}_4\text{O}_2$  donor set involving an equatorial plane composed of two nitrogens from the ring and two oxygens from the carboxylate group. The plane formed is slightly distorted. The third carboxylate group is deprotonated and does not coordinate  $\text{Ga}^{3+}$ , while

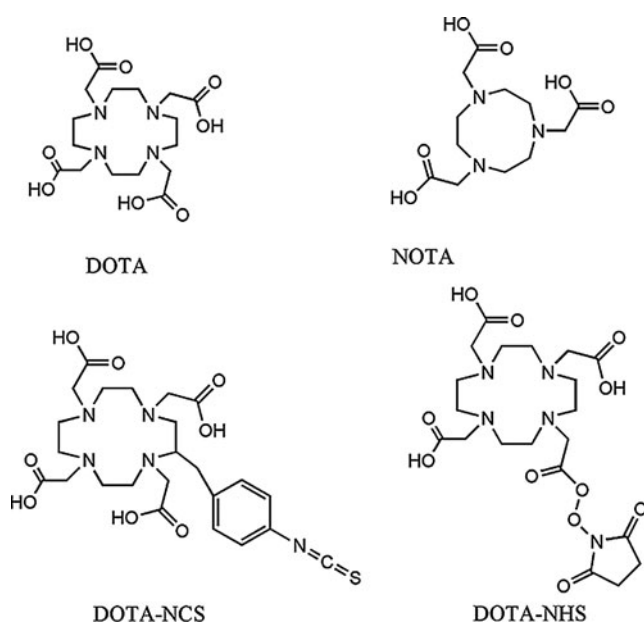


FIG. 1. Structure of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*N*, *N'*, *N''*, *N'''*-tetraacetic acid (DOTA), 1,4,7-triazacyclononane-*N*, *N'*, *N''*-triacetic acid (NOTA), and some derivatives.

the fourth carboxylate group is conjugated to an amino acid group belonging to the targeted peptide) and the Ga-DOTA geometry is a pseudo-octahedral structure involving distortion of DOTA-cavity resulting in a *cis*-coordinated complex (Fig. 2).<sup>37,38</sup> Thus, in the molecular design of bifunctional chelators, the use of a single pendant carboxylate group of DOTA for conjugation to the targeted vector does not affect its gallium binding capacity because only six out of  $N_4O_4$  donors are used in bonding  $Ga^{3+}$  ion. In the case of NOTA, this is not true because the three carboxylate groups are involved in  $Ga^{3+}$  coordination.

DOTA has a larger cavity than NOTA, which results in lower thermodynamic stability of the  $^{68}Ga^{3+}$  complex (thermodynamic stability constants for Ga-NOTA and Ga-DOTA complexes are respectively 30.98 and 21.33),<sup>11,28</sup> and consequently longer reaction times. This is because the ring distortion is determining reaction conditions for labeling. As DOTA needs a higher ring distortion than NOTA to label  $Ga^{3+}$  ion, complex formation with DOTA, requires high temperature (90°C–100°C during 10 minutes using microwave), whereas complex formation with NOTA could be performed at room temperature. Moreover, the compactness of NOTA leads to high stability and selectivity for  $Ga^{3+}$ .<sup>39</sup> The hole-size effects influence both thermodynamics and kinetics of macrocycle complexes. This is because a chelator in its minimum energy metal-binding conformation will be optimized for a particular size of a metal ion, and when other metallic radionuclides are bound the macrocycle conformational energy will increase with a resultant decrease in complex stability.<sup>40</sup>

Although NOTA is particularly suitable for complexing  $^{68}Ga^{3+}$  ion, we believe that the use of DOTA macrocycle (and its derivatives) is of great interest because larger metallic radionuclides such as  $^{213}Bi$ ,  $^{86/90}Y$ ,  $^{89}Zr$ , or  $^{44/47}Sc$  could be coordinated paving the way to imaging or targeted radionuclide-therapy applications. Radiolabeled DOTA-TOC with  $^{68}Ga$ ,  $^{111}In$ ,  $^{177}Lu$ ,  $^{90}Y$ , or  $^{44}Sc$  and DOTA-derived bombe-

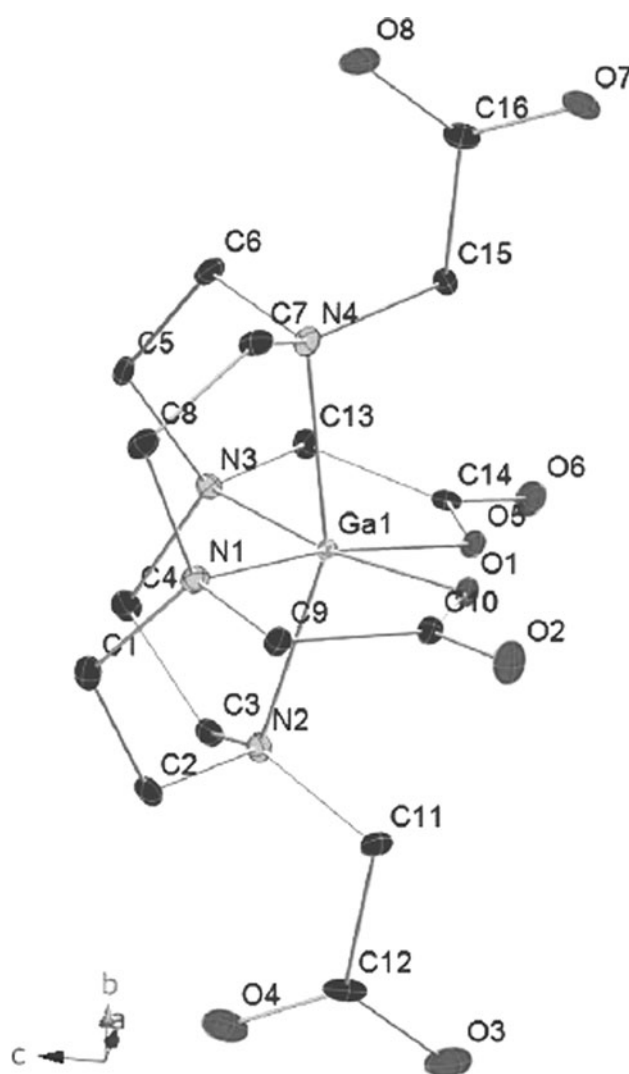


FIG. 2. Grafting a DOTA-radiometal complex on a biomolecule. Image taken from Viola et al. Reprinted with permission from reference number 2885260532558.

sin analog labeled with  $^{213}Bi$  or  $^{86}Y$  have been investigated.<sup>41–46</sup>

Metallation reactions with DOTA are performed using a buffer system such as sodium acetate, HEPES, phosphate, or ammonium acetate to adjust the pH of the  $^{68}Ge/^{68}Ga$  generator eluate closed to pH value 4. This condition is a prerequisite, as discussed in *Gallium chemistry* paragraph, for ionizing  $^{68}Ga$  and complexing DOTA-based biomolecules with this metallic radionuclide because at pH value >4, formation of colloidal hydroxide  $[Ga(OH)_3]_n$  begins. Although this does not generally inhibit complex formation, radiolabeling is nevertheless substantially hampered due to formation of insoluble colloids and their adhesion to the surface of the reaction vessel. At pH values above 9, a water-soluble hydroxo complex  $[Ga(OH)_4]^-$  is formed. As ligand exchange with the tetrahydroxo complex is a much slower process than complexation of ionic  $Ga^{3+}$ , metallation is achieved best at a maximum pH value 4. Metal cation contaminants ( $Fe^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ge^{4+}$ ,  $Ti^{4+}$ , etc.) coming from the  $^{68}Ge/^{68}Ga$  generator eluate, glassware, or from other reagents (HCl, acetate buffer

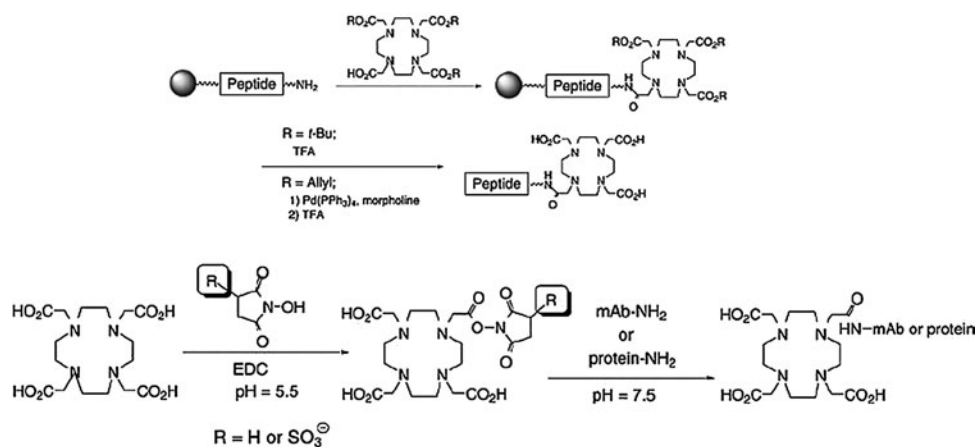


FIG. 3. (Up) Pathways of synthesis using tris-tert-butyl-DOTA and tris allyl-DOTA. (Down) Reaction using DOTA-OSSU. Image taken from Tanaka and Fukase. Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

etc.) could hamper achieving a satisfactory  $^{68}\text{Ga}$  labeling yield and specific activity (stability constant of Fe-DOTA complex is 29.4).<sup>47</sup> To avoid high radiation doses, the radiolabeling procedure is mostly performed in synthesis modules housed in lead shielded hot cells.

Introducing macrocycles into peptides is a challenge and need the development of efficient methods. Because of the similarity between DOTA and NOTA macrocycles we will only discuss the two main strategies for introducing DOTA macrocycle in biomolecules (Fig. 3).<sup>39</sup>

One consists of the use of coupling agents: *tert*-butyl and allyl protecting groups are carboxylic acid functional groups of side chains that react with the desired amine groups of the peptide. The synthesis is performed on a solid phase and includes two stages: the first is the reaction of the protected DOTA with the amine of the peptide by coupling agents, then the deprotection of acid functions with trifluoroacetic acid (TFA) for tris-*tert*-butyl-DOTA and  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , morpholine and TFA for tris-allyl-DOTA.

The other strategy uses activated ester of DOTA. This conjugation step can be carried out by reacting a molar excess of the activated tri-*tert*-butyl ester-derivatized chelator with a designated free amino group of a desirable peptide, in which all other reactive amines are protected, in the presence of a coupling agent. For instance, DOTA-O-sulfosuccinimide ester (DOTA-OSSU).

DOTA-OSSu prepared *in situ* from DOTA, EDC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide), and N-hydroxysulfosuccinimide is intended to directly react with the amine group of the biomolecule to give DOTA conjugates.

Combining peptides advantages (*i.e.* possibility of targeting through peptide-receptor interaction, small size and low-molecular weight conferring good penetration in the tissue or at cellular level, low toxicity, and no antigenicity), macrocycle chemistry richness and  $^{68}\text{Ga}$  physical properties and its availability through a  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generator, we are convinced that  $^{68}\text{Ga}$ -radiolabeled peptide-based PET molecular imaging has a promising future.

#### Mechanisms Involved in Tumoral Processes and Targeting with $^{68}\text{Ga}$ -Radiolabeled Peptides

Several mechanisms that are important in the carcinogenic process are common to tumoral and nontumoral processes but

their dysregulation is often prominent in tumors. They include, but are not limited to, adhesion phenomenon, proliferation process, apoptosis, tumor invasion, and inflammation. For more clarity we will only discuss their implication in oncology.

#### Adhesion phenomenon

Adhesion molecules are both anchorage and signalization molecules. They allow the maintenance of cellular architecture and actively participate in the cellular homeostasis. Their dysregulation during oncogenesis is common. Among these adhesion molecules, integrins ligands have been mainly studied for oncogenesis imaging. Integrins are heterodimeric transmembrane glycoproteins constituted by an  $\alpha$  chain and a  $\beta$  chain.

In human, 18 different  $\alpha$  and 8 different  $\beta$  subunits are described, which can combine into 24 different integrins (Fig. 4).<sup>29</sup>

Overexpression of surface adhesion molecules such as integrins and loss of some cell adhesion molecules are responsible for the acquisition of invasion, metastasis, and neoangiogenesis properties.<sup>48</sup> For example, integrin  $\alpha_v\beta_3$  expression is stimulated by angiogenic factors such as  $\beta$  fibroblast growth factor or tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and promotes angiogenesis. Integrin  $\alpha_v\beta_5$  is another integrin implicated in angiogenesis.<sup>29</sup>

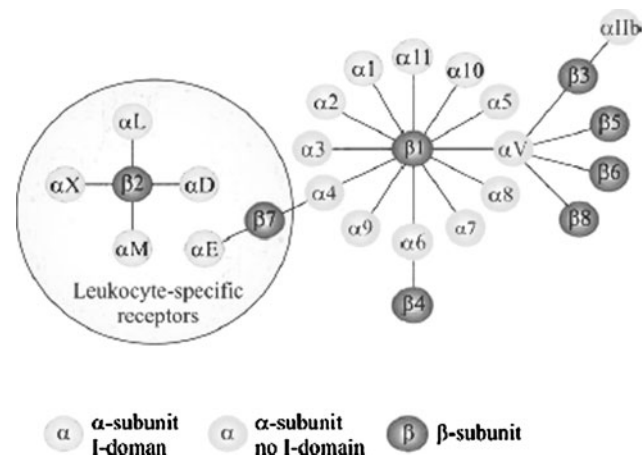


FIG. 4. The integrin superfamily. Image taken from Niu and Chen.

It was found that the amino acid sequence Arg-Gly-Asp (RGD) is an important binding epitope of several extracellular matrix proteins (collagen, fibrinogen, and vitronectin).

Several  $^{68}\text{Ga}$ -radiolabeled peptides selectively binding to integrin  $\alpha_v\beta_3$  are under investigation. We can mention [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NOTA-G<sub>3</sub>-RGD<sub>2</sub><sup>49</sup> synthesized, radiolabeled, and evaluated by Liu et al. and [ $^{68}\text{Ga}$ ]NODAGA-RGD by Knetsch et al.<sup>50</sup> They respectively have been evaluated on human glioblastoma U87MG ( $\alpha_v\beta_3$  positive) and on human melanoma M21 ( $\alpha_v\beta_3$  positive). Integrin binding affinity of NOTA-G<sub>3</sub>-RGD<sub>2</sub> by competitive displacement of [ $^{125}\text{I}$ ]echistatin bound to U87MG cells shows an IC<sub>50</sub> of 66.4 nM, revealing a good affinity. *In vivo* studies, performed 1 hour after injection, show radiotracer accumulation into kidneys and urinary excretion.

#### Proliferation process and growth factors

Mitotic signals are, in healthy cells, processes tightly regulated to control/regulate cell proliferation.

One of the major molecules found in the transmission of these signals is the human Epidermal Growth Factor (hEGF), which binds to its receptor (HER). HER family is composed of four receptors: HER1/EGFR, HER2, HER3, and HER4.

HER has an extracellular domain to which hEGF binds and a transmembrane portion and an intracellular ATP-binding domain with tyrosine kinase activity responsible to signaling pathways. Each HER molecule exists in a monomer form when inactive, converting into dimer when becoming active. Different signal transduction pathways are involved after receptor activation such as Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) or Akt.<sup>51</sup> hEGF and other growth factors (VEGF, PDGFetc.) and their tyrosine kinase receptors play an important role in cell proliferation, apoptosis, adhesion, migration, and cell differentiation. Today, there are strong arguments in favor of their role in oncogenesis.<sup>51,52</sup> Several oncogenic alterations have been identified, both in the extracellular domain and in intracellular proteins involved in signal transduction. For example, EGFR vIII neither binds

to ligands nor dimerizes because of a mutant tyrosine kinase domain that is constitutively activated. As for HER2, it is overexpressed in many cancers: breast, gastric, esophageal, colorectal, lung, prostate, bladder, pancreatic, and ovary. Treatment with trastuzumab, an antibody directed to wild HER2 has improved survival of patients with HER2 overexpressing breast tumors. It is now well known that HER2 overexpression is associated with adverse prognosis in breast cancer.<sup>52</sup>

Tolmachev et al. have developed a HER2-binding affibody labeled with  $^{68}\text{Ga}$ : [ $^{68}\text{Ga}$ ]DOTA-Zher2: 342-pep2. It is an antibody directed to HER2. *In vitro* studies were performed on SKOV3 cells (human ovarian cancer cells with high level of HER2 expression). Kd is 78 pM, which is a very good result revealing a strong affinity. Biodistribution studies were performed on mice bearing SKOV3 xenografts. These studies show good tumor specificity and rapid renal clearance.<sup>52</sup> A study on 3 patients with breast cancer was performed by Baum et al. (Fig. 5).<sup>53</sup> HER2 overexpressing metastatic lesions were clearly visualized.

#### Apoptosis

In the body, and in different organs and tissues, the total number of cells is the result of tightly regulated balance between mitosis and apoptosis. An imbalance between these two functions can promote carcinogenesis.<sup>54</sup> The process of apoptosis, involves two pathways called intrinsic and extrinsic.<sup>55,56</sup> Mitochondrial or intrinsic pathway is particularly activated as result of DNA damage or cellular damage. Then, there is a mitochondrial membrane pore opening releasing cytochrome c, leading to in caspase 3 activation, apoptosis effector, *via* formation of an apoptosome. The extrinsic pathway is activated by TNF, FasL binding on cell membrane receptors. Adapter proteins like FADD are brought into play in addition to intracellular signaling pathways and activation of caspase 8. Caspase 8 can cleave the procaspase 10 into caspase 10 or activate the mitochondrial relay *via* Bid. After caspase 3 activation, there is a rapid redistribution and exposure of phosphatidylserine to the cell surface. Phosphatidylserine is absent from the basolateral leaflet of the membrane of healthy living cells and is located in the plasma membrane of dying cells. Annexin A5 is a protein that specifically binds to phosphatidylserine with high affinity.<sup>57,58</sup>

Induction of apoptosis is the primary mechanism through which most chemotherapies cause tumor cell death.

Follow-up of response to cancer therapy is crucial for an optimal treatment strategy to reduce the dose in a responding patient or to change to another therapy type in a non-responding patient. Molecular imaging of apoptosis offers a direct and early measurement of response to cancer therapy.

Two peptides derived from annexin A5 radiolabeled with  $^{68}\text{Ga}$  were developed by Bauwens et al.<sup>59</sup> while maintaining the binding capacity of annexin A5 to phosphatidylserine: the [ $^{68}\text{Ga}$ ]Cys2-AnxA5 and [ $^{68}\text{Ga}$ ]Cys165-AnxA5. Biodistribution and pharmacokinetics were evaluated before and after treatment with cyclophosphamide in mice bearing xenografts of human B lymphoblast cell line Daudi.

Biodistribution of both tracers proved to be similar with fast clearance from the blood and a high retention in the kidneys. Tumor retention before chemotherapy is low for both radiotracers but was significantly increased following chemotherapy-induced apoptosis. Derivates of annexin A5

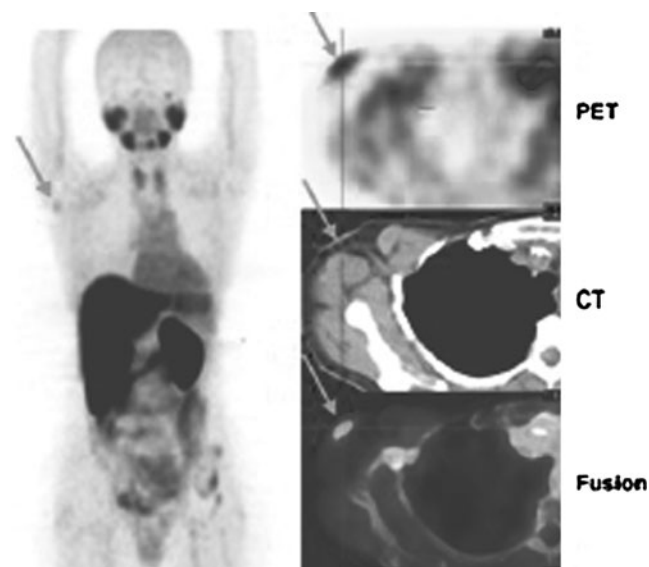


FIG. 5. HER2 expressing metastasis (arrows). Image taken from Baum et al.

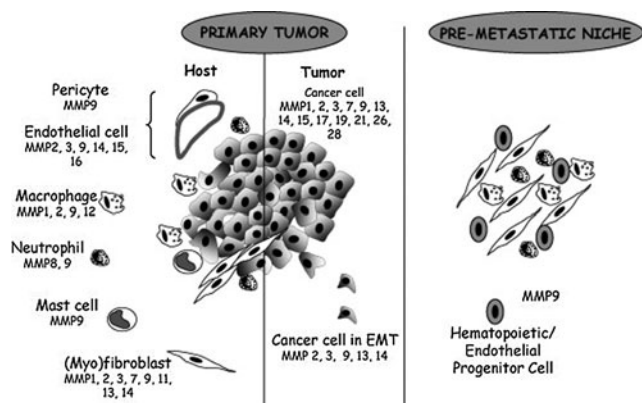


FIG. 6. Matrix metalloproteinases expression. Image taken from Noel et al. Reprinted with permission from reference number 2884811102429.

radiolabeled with  $^{68}\text{Ga}$  could be helpful for early evaluation of antitumor therapy.

#### Tumor invasion

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of zinc-dependent endopeptidases characterized by their ability to degrade extracellular matrix components. They play an important role in shaping and tissue remodeling in physiological or pathological conditions (Fig. 6). Human MMP family is composed of 23 members. For example, MMP9 is found in keratinocytes, neutrophils, and eosinophils.<sup>60</sup>

MMPs play an important role in various aspects of cancer progression. MMPs degrade extracellular matrix proteins, thus promoting tumor cells migration into the blood and surrounding tissues, beyond the immune system. In addition, this degradation allows the release of growth factors that are sequestered. For example, MMP9 mobilizes VEGF from the matrix. MMP9 overexpression is associated with invasion and metastasis or rapid tumor progression in patients with melanoma.<sup>61,62</sup>

Ujula et al. have synthesized and radiolabeled with  $^{68}\text{Ga}$  two analogs of Tumor Cell Targeting Protein (TCTP-1), a ligand of MMP9. One of them, the [ $^{68}\text{Ga}$ ]-DOTA-TCTP-1 is cyclized by a cysteine bridge.

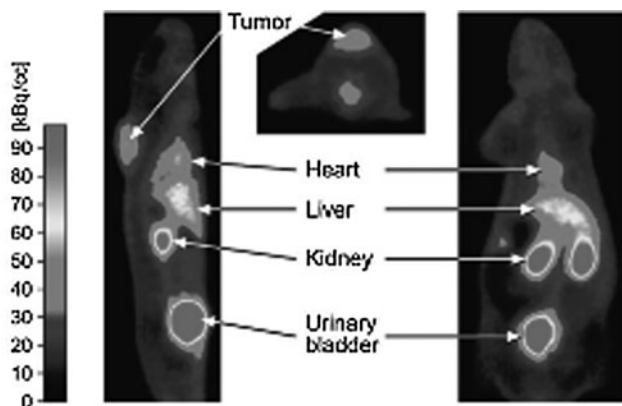


FIG. 7. Positron emission tomography (PET) imaging. Image taken from Ujula et al. Reprinted with permission from American Chemical Society Copyright (2010).

*In vitro* experiments show a high hydrophilicity. *In vivo* stability experiments reveal a good stability in human plasma and a half-life of 2.5 hours. *In vivo* PET imaging after human melanoma cells C8161T/M1 xenografting in athymic rats shows uptake in the tumor (Fig. 7).<sup>61</sup>

#### Oncological Processes and Targeting with $^{68}\text{Ga}$ -Radiolabeled "Hormone-Peptides"

In this section we describe other mechanisms involved in oncological processes represented by hormone peptides and their receptors. We will successively focus on somatostatin, bombesin, neurotensin, neuropeptide Y, "glucagon-like" peptide, "melanocyte stimulating" hormones, and "gonadotrophin releasing" hormones.

#### Somatostatin and neuroendocrine tumors

Somatostatin is a peptide hormone that binds with high affinity to five different subtypes of specific somatostatin receptors (sst1 to sst5). They belong to the G-Protein Coupled Receptor (GPCR) superfamily.

The majority of neuroendocrine tumors (NET), and some other tumors, such as small cell lung cancer, breast tumor, and malignant lymphoma, overexpress multiple somatostatin receptor subtypes, of which the sst2 subtype is predominantly expressed.<sup>63,64</sup>

Somatostatin is not a good peptide to label because of its very short plasma lifetime (about 3 min). Analogs of longer half-life were synthesized such as octreotide, lanreotide, or pentetreotide.<sup>65</sup> Today, somatostatin receptor scintigraphy with [ $^{111}\text{In}$ ]-DTPA-pentetreotide (Octreoscan<sup>®</sup>) allows NET detection with high sensitivity and good specificity for detection of the primary tumor and secondary lesions. Yet, sensitivity of [ $^{111}\text{In}$ ]-DTPA-pentetreotide scintigraphy is limited because a number of tumors overexpress other subtypes of somatostatin receptors and also because the rather low spatial resolution limits the ability to detect lesions with small size and lower receptor density.<sup>66</sup>

Number of peptides have been evaluated for PET detection such as [ $^{68}\text{Ga}$ ]-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-octreotide-Phe<sup>1</sup> ([ $^{68}\text{Ga}$ ]-DOTA-TOC), which binds to sst2 with high affinity. Many studies have shown the superiority of [ $^{68}\text{Ga}$ ]-DOTA-TOC PET over Octreoscan SPECT in patients with NET.<sup>67</sup>

Other octreotide derivatives have been synthesized, radiolabeled with  $^{68}\text{Ga}$ , and evaluated in the management of NET: [ $^{68}\text{Ga}$ ]-DOTA-Nal<sup>3</sup>-octreotide ([ $^{68}\text{Ga}$ ]-DOTA-NOC)<sup>19,68,69</sup> and [ $^{68}\text{Ga}$ ]-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-octreotate ([ $^{68}\text{Ga}$ ]-DOTA-TATE).<sup>70,71</sup>

Poeppl et al. have published a study comparing the use of [ $^{68}\text{Ga}$ ]-DOTA-TOC and [ $^{68}\text{Ga}$ ]-DOTA-TATE in NET imaging and some differential uptake has been shown.<sup>72</sup>

[ $^{68}\text{Ga}$ ]-DOTA-NOC and [ $^{68}\text{Ga}$ ]-DOTA-TATE are today clearly superior to somatostatin receptor scintigraphy for the assessment of NET.

#### Gastrin-releasing peptide and other bombesin-related peptides

Bombesin was discovered in the frog "*Bombina bombina*." Two related peptides are present in man: gastrin-releasing peptide (GRP) and neuromedin-B. They are members of the brain-gut peptides present in the central nervous system,



gastrointestinal tract, and the pulmonary tract. They regulate many biological functions including secretion of gastric acid, regulation of body temperature, modulation of smooth muscle contraction, and secretion of neuropeptide.<sup>73</sup>

The mammalian bombesin receptor family consists of four receptor subtypes: GRP receptor (BB2 or GRPR), neuromedin B receptors (BB1 or NMB-R), BB3, and BB4.<sup>74</sup>

GRPR was found to be predominantly expressed in human prostate cancer (100%), gastrinoma (100%), breast cancer (70%) small and non small cell lung cancer (concomitant expression with BB3 receptor) gastrointestinal carcinoid tumors, and head/neck squamous cell cancers.<sup>25,73–75</sup> Recently, Flores et al. confirm the presence of GRPR in human glioma specimens and normal human neurons.<sup>76</sup>

BB1 receptors are overexpressed in small cell lung cancer (55%), non small cell lung cancer (67%), and intestinal carcinoids (46%).<sup>73</sup>

Small cell lung carcinomas and bronchials carcinoids express the BB3 receptors.<sup>25,74,76,77</sup>

Bombesin analogs for the GRPR have been successfully labeled with <sup>68</sup>Ga. Some side effects have been reported with bombesin agonists, so it may be preferable to use antagonists for targeting GRPR positive tumors.<sup>78,79</sup>

Zhang et al. have synthesized and radiolabeled a bombesin analog: [<sup>68</sup>Ga]-DOTA-PEG4-BN(7-14) (DOTA-PESIN).<sup>80</sup>

Binding experiments, performed *in vitro* on human prostate tumors (PC-3 cells) show an IC<sub>50</sub> of radiotracer of 6.6 nmol/L for human GRPR, revealing a good affinity for its biological target.

*In vivo* experiments, performed on PC-3 cells xenografts in athymic nude mice showed a high and specific tumor uptake and good retention. [<sup>68</sup>Ga]-DOTA-PESIN accumulates mainly in tumor, pancreas, and kidneys.

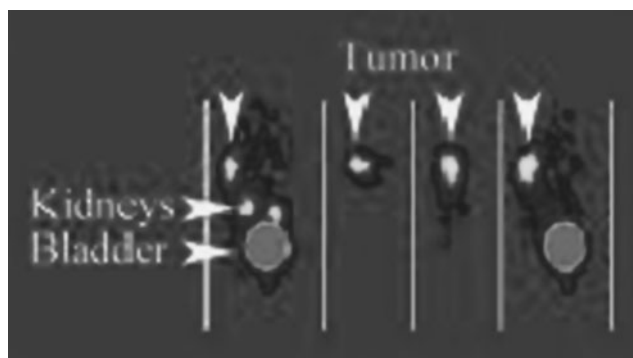
Others bombesin analogs have been successfully synthesized and radiolabeled with <sup>68</sup>Ga such as [<sup>68</sup>Ga]-NODAGA-AR by Abiraj et al.<sup>81</sup> and [<sup>68</sup>Ga]-RM2 by Mansi et al.<sup>82</sup>

#### Neurotensin and ductal pancreatic adenocarcinoma

Neurotensin is a brain gut 13 amino-acid peptide involved in neuronal functions, as neuromodulator in the central nervous system. In the periphery, neurotensin is released from entero-endocrine cells of the gastro intestinal tract in response to increased intraluminal fats, and modulates hormone activity involved in the digestive process, stimulation of pancreatic and biliary secretion, inhibition of gastric acid secretions. ...<sup>83</sup> Neurotensin receptors (NTRs) family contains 3 subtypes: neurotensin receptor 1 (NTR<sub>1</sub>), neurotensin receptor 2 (NTR<sub>2</sub>), and neurotensin receptor 3 (NTR<sub>3</sub>). NTR<sub>1</sub> and NTR<sub>2</sub> are GPCR, respectively the high and low affinity neurotensin receptor. NTR<sub>3</sub> is a nonspecific single transmembranous sorting receptor.

It was found that ductal pancreatic adenocarcinomas express NTR<sub>1</sub> (75–88%) while NTR<sub>1</sub> is not detected in normal pancreas cells. NTR1 has been proposed as a marker of ductal pancreatic adenocarcinoma progression and as a discriminant between endocrine and exocrine pancreatic adenocarcinomas.<sup>83</sup>

Moreover, invasive ductal breast cancers express NTR<sub>1</sub> (90%), while NTR<sub>1</sub> is poorly detected in normal breast cells.<sup>84,85</sup> Numerous cancers express NTRs but with less frequency, such as Ewing's sarcoma (65%), meningioma (52%), and astrocytoma (43%).<sup>86</sup>



**FIG. 8.** PET images of HT-29 cells xenografts. Image taken from Alshoukr et al. Reprinted with permission from American Chemical Society Copyright (2011).

Alshoukr et al. have synthesized and radiolabeled with <sup>68</sup>Ga two DOTA-neurotensin analogs: [<sup>68</sup>Ga]-DOTA-NT-20.3 and [<sup>68</sup>Ga]-DOTA-LB119. *In vitro* assays on HT-29 cells (human colon adenocarcinoma cells) showed an IC<sub>50</sub> of 14 and 7.5 nM (respectively) using [<sup>125</sup>I]-labeled neurotensin as competitor.

Biodistribution studies were performed on athymic mice, bearing a HT-29 cells xenografts (Fig. 8).<sup>18</sup> Tumor uptake of [<sup>68</sup>Ga]-DOTA-NT20.3 was superior to the [<sup>68</sup>Ga]-DOTA-LB119.

Moreover, image contrast was better with [<sup>68</sup>Ga]-DOTA-NT20.3 than [<sup>68</sup>Ga]-DOTA-LB119 allowing the detection of small tumors.

#### Neuropeptide Y system and breast cancer

The neuropeptide Y system is composed of neuropeptide Y (NPY), peptide YY (PYY), and pancreatic polypeptide (PP). They act through their receptors named Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>4</sub>, and Y<sub>5</sub>. There are all GPCR.

More specifically, NPY, a 36 amino-acid peptide is a sympathetic neurotransmitter and could also act as an angiogenic factor.

NPY receptors are expressed in three categories of cancer:<sup>87</sup> endocrine,<sup>88,89</sup> epithelial<sup>90,91</sup>, and embryonal tumors.<sup>92–94</sup>

In endocrine tumors, producing steroid hormones and catecholamines, Y<sub>1</sub> and Y<sub>2</sub> subtypes are the most express among NPY receptors.

Epithelial tumors, and more particularly breast cancer, are the tumors expressing the highest NPY receptors density.

Embryonal tumors such as neuroblastoma express only Y<sub>2</sub> and Y<sub>5</sub> receptors whereas Ewing's Sarcoma family of tumors express Y<sub>1</sub>, Y<sub>4</sub>, and Y<sub>5</sub> receptors. Density and incidence of NPY receptors are moderate in these tumors.

According to Korner and Reubi, breast cancer seems to be the best candidate for targeting NPY receptors based on their very high NPY receptors expression.<sup>87</sup>

Until now, no NPY analogs has been radiolabeled with <sup>68</sup>Ga or has successfully passed preclinical trials, so further optimization is needed even though neuropeptide Y system receptors are still promising targets.

#### "Glucagon-like" peptides and NET

"Glucagon-like" peptide 1 (GLP-1) and 2 are incretin hormones derived from proglucagon after enzymatic cleavage in pancreas. GLP-1 is also released in gut and brain. It is

then metabolized into inactive metabolites by dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4). GLP-1 plays an important role in metabolism and maintenance of glucose homeostasis. GLP-1 exerts its action via its receptor, GLP-1 receptor (GLP1R) belonging to GPCR superfamily.<sup>95</sup>

It was shown that GLP1R is highly overexpressed in human insulinomas and gastrinomas. In insulinomas, GLP-1R density is considerably increased and is more frequently observed than somatostatin receptors.<sup>96,97</sup>

Further, GLP1R is expressed in endocrine, neural, and embryonic tumors, whereas they are virtually absent in carcinomas and lymphomas.<sup>77</sup>

Exendin-3 and GLP-1 have 53% of homology in their amino acid sequence. The main advantage of exendin-3 compared with GLP-1 is that exendin-3 is resistant to cleavage by the DPP-4.

Recently, [<sup>68</sup>Ga]-DOTA-Lys40-exendin-3 was synthesized, radiolabeled, and evaluated by Brom et al. for insulinomas detection. *In vitro* studies were performed on rat insulinoma cells INS-1 (GLP-1R positive). The results show an IC<sub>50</sub> of 5.7 nM. Biodistribution studies *in vivo* were carried out on mice bearing xenografts of insulinomas INS1. High uptake of [<sup>68</sup>Ga]-DOTA-Lys40-exendin-3 was observed and the subcutaneous tumors were clearly visualized.<sup>96</sup>

#### "Melanocyte-Stimulating" Hormones and melanoma

Melanocortin system is a network of skin neuropeptides involved in pigmentation and cortisol production regulation.

Natural Melanocyte Stimulating Hormones (MSH  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) and ACTH derive from pro-opiomelanocortin (POMC) by proteolysis under action of the prohormone convertase family.<sup>98</sup>

There are five known melanocortin receptors called MSH receptors (MC-Rs) and belong to GPCR superfamily. There are also specific signaling pathways to each receptor.

Most cutaneous cells express MC-Rs and synthesize MCs, such as  $\alpha$ -MSH. MC-1R is overexpressed in human and murine melanotic and amelanotic melanomas.<sup>99,100</sup>

Several  $\alpha$ -MSH analogs have been successfully synthesized and radiolabeled with <sup>68</sup>Ga such as the [<sup>68</sup>Ga]-CHX-A'-ReCCMSH (Arg<sup>11</sup>) reported by Wei et al. This radiotracer specifically binds to MC-1R. *In vitro* binding experiments were performed on B16/F10 cells (murine melanoma) The IC<sub>50</sub> of 3.8 nM suggests a very good affinity to its receptor. *In vivo* biodistribution experiments were carried out on C57BL/6 mice bearing a murine melanoma tumor xenograft B16/F10. The radiopharmaceutical is excreted in urine and has good tumor retention. PET imaging showed that tumor and urinary bladder are clearly visible.<sup>101</sup>

#### "Gonadotrophin-Releasing" Hormone and cancers of the reproductive system

Gonadotrophin-Releasing Hormone (GnRH) is a hypothalamic hormone and plays an important role in reproduction. It is secreted in a pulsatile fashion by hypothalamus and binds to its receptor located mainly in the anterior pituitary gland to regulate production and release of luteinizing hormone (LH) and "follicle stimulating" hormone (FSH). LH and FSH control sex hormone production.

LH-RH receptors have been found to be expressed in most prostate cancer cells.<sup>102</sup> GnRH receptor exists in two

isoforms called GnRHR-I and GnRHR-II. They are both GPCR. GnRHR has also been localized in tissues such as ovaries and breast and regulates menstrual cycle, pregnancy, and lactation.<sup>103,104</sup> Finally, GnRHR-I was detected in spleen and gastric parietal cells and plays a role in adhesion, chemotaxis of T cells, and inhibit acid gastric secretion.<sup>105</sup> GnRHR is highly overexpressed in tumors of reproductive organs such as endometrium, ovary, mammary gland, and prostate.<sup>106</sup>

The GnRH-receptor system is suitable for *in vivo* peptide receptor targeting. Schottelius et al. have developed a GnRH-I analog radiolabeled with <sup>68</sup>Ga, the (D-Lys<sup>6</sup>-[<sup>68</sup>Ga]-DOTA)-GnRH-I.<sup>106</sup>

Competition studies were performed on cells membrane preparation expressing GnRHR and show an IC<sub>50</sub> of 13.27 nM, revealing a good affinity for its biological target. However, this analog exhibits a loss of affinity close to 100 compared to the reference Triptoreline.

#### Conclusion

We can hypothesize that radiopharmaceuticals labeled with <sup>68</sup>Ga have a promising future, especially <sup>68</sup>Ga-labeled peptides due to the following reasons: (1) <sup>68</sup>Ga half-life compatible with human PET-imaging; (2) daily production of <sup>68</sup>Ga from a <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator easy to manage in each PET imaging center; (3) peptide radiolabeling procedure.

With these undeniable advantages, several peptides involved in oncogenesis mechanisms have been successfully radiolabeled with <sup>68</sup>Ga such as chemokine receptor CXCR4 ligand<sup>107</sup> or gastrin analog.<sup>108</sup> Nevertheless, other peptides involved in inflammation processes have been also radiolabeled with <sup>68</sup>Ga to target leukocyte trafficking using Vascular Adhesion Protein 1.<sup>20</sup> Moreover, nonpeptide radiotracers labeled with <sup>68</sup>Ga have been proposed for the exploration of P-glycoprotein expression,<sup>109</sup> hypoxia,<sup>110</sup> folate metabolism,<sup>111</sup> bone metastases,<sup>112</sup> and tumor metabolism.<sup>113</sup> Detection of gene mutations involved in oncogenesis is a way explored by Roivainen et al. thanks to radiolabeled oligonucleotides.<sup>114</sup>

Macrocyclic chelators that form very stable complexes with metal cations are of paramount interest for radiopharmaceutical design. One advantage of chelate used for radioelement binding is that DOTA-based biomolecules can be labeled not only with <sup>68</sup>Ga but also with nonradioactive gadolinium (Gd<sup>3+</sup>) giving access to the next generation of multimodal imaging that is PET-MRI. Boss et al. have used DOTA-TOC to detect meningioma with PET-MRI.<sup>115</sup> This technique has a huge potential for innovative imaging application by the combination of PET information (tracer uptake) and different MRI protocols (diffusion, functional, or spectroscopy imaging).<sup>116</sup>

In addition, macrocycle chemistry allows also the attachment of other positron emitters (<sup>64</sup>Cu) or isotope for SPECT imaging (<sup>111</sup>In) or the setting of  $\beta$ -emitting isotopes for therapeutic peptides (coupled <sup>86</sup>Y/<sup>90</sup>Y, <sup>177</sup>Lu, and <sup>67</sup>Cu). Labeling the same molecule with different radioisotopes ( $\gamma$ ,  $\beta^+$ , and  $\beta^-$  emitters) will lead to development of novel innovative radiopharmaceuticals targeting specific molecular for both imaging and therapy applications. To conclude, molecular imaging of oncogenesis with radiolabeled peptides will hold an important place in the management of

cancer, diagnosis and staging, using biochemical characteristics specific to each patient.

### Disclosure Statement

No financial interests exist.

### References

- Groheux D, Hindie E, Delord M, et al. Prognostic impact of <sup>18</sup>F-FDG-PET-CT findings in clinical stage III and IIB breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2012;12:12.
- Taghilo M. Cyclotron production of <sup>89</sup>Zr: A potent radionuclide for positron emission tomography. *Int J the Phys Sci* 2012;7:389.
- Qaim SM. Decay data and production yields of some non-standard positron emitters used in PET. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2008;52:111.
- Monographie BIPM-5- Table of Radionuclides (Vol. 6-A=22 to 242). Consultative Committee for Ionizing Radiation; 2011. Updated Last Updated Date.
- Monographie BIPM-5- Table of Radionuclides (Vol. 1- A =1 to 150). Consultative Committee for Ionizing Radiation; 2004. Updated Last Updated Date.
- Gomzina NA, Kuznetsova OF. [L-[methyl-(11C)]-methionine of high enantiomeric purity production via on-line <sup>11</sup>C-methylation of L-homocysteine thiolactone hydrochloride]. *Bioorg Khim* 2011;37:216.
- Shao X, Hockley BG, Hoareau R, et al. Fully automated preparation of [<sup>11</sup>C]choline and [<sup>18</sup>F]fluoromethylcholine using TracerLab synthesis modules and facilitated quality control using analytical HPLC. *Appl Radiat Isot* 2011;69:403.
- Hamacher K, Coenen HH, Stöcklin G. Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[<sup>18</sup>F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. *J Nucl Med* 1986;27:235.
- Firnau G, Chirakal R, Garnett ES. Aromatic radiofluorination with [<sup>18</sup>F]Fluorine Gas: 6-[<sup>18</sup>F]-Fluoro-L-Dopa. *J Nucl Med* 1984;25:1228.
- Wuest F. Aspects of positron emission tomography radiochemistry as relevant for food chemistry. *Amino Acids* 2005;29:323.
- Schroeder RP, de Visser M, van Weerden WM, et al. Androgen-regulated gastrin-releasing peptide receptor expression in androgen-dependent human prostate tumor xenografts. *Int J Cancer* 2010;126:2826.
- Wester HJ, Hamacher K, Stöcklin G. A comparative study of N.C.A fluorine-18 labeling of proteins via acylation and photochemical conjugation. *Nucl Med Biol* 1996;23:365.
- Pruszyński M, Loktionova NS, Filosofov DV, et al. Post-elution processing of <sup>44</sup>Ti/<sup>44</sup>Sc generator-derived <sup>44</sup>Sc for clinical application. *Appl Radiat Isot* 2010;68:1636.
- Fukumura T, Okada K, Suzuki H, et al. An improved <sup>62</sup>Zn/<sup>62</sup>Cu generator based on a cation exchanger and its fully remote-controlled preparation for clinical use. *Nucl Med Biol* 2006;33:821.
- Klein R, Adler A, Beanlands RS, et al. Precision-controlled elution of a <sup>82</sup>Sr/<sup>82</sup>Rb generator for cardiac perfusion imaging with positron emission tomography. *Phys Med Biol* 2007;52:659.
- Welch MJ, McCarthy TJ. The potential role of generator-produced radiopharmaceuticals in clinical PET. *J Nucl Med* 2000;41:315.
- Roesch F. Scandium-44: Benefits of a long-lived PET radionuclide available from the <sup>44</sup>Ti/<sup>44</sup>Sc generator system. *Curr Radiopharm* 2012;5:187.
- Alshoukr F, Prignon A, Brans L, et al. Novel DOTA-neurotensin analogues for <sup>111</sup>In scintigraphy and <sup>68</sup>Ga PET imaging of neurotensin receptor-positive tumors. *Bioconj Chem* 2011;22:1374.
- Ambrosini V, Campana D, Bodei L, et al. <sup>68</sup>Ga-DOTANOC PET/CT clinical impact in patients with neuroendocrine tumors. *J Nucl Med* 2010;51:669.
- Autio A, Ujula T, Luoto P, et al. PET imaging of inflammation and adenocarcinoma xenografts using vascular adhesion protein 1 targeting peptide <sup>68</sup>Ga-DOTAVAP-P1: Comparison with <sup>18</sup>F-FDG. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37:1918.
- Alonso O, Gambini JP, Lago G, et al. In vivo visualization of somatostatin receptor expression with Ga-<sup>68</sup>-DOTA-TATE PET/CT in advanced metastatic prostate cancer. *Clin Nuclear Med* 2011;36:1063.
- Cagnolini A, Chen J, Ramos K, et al. Automated synthesis, characterization and biological evaluation of [(<sup>68</sup>Ga)]Ga-AMBA, and the synthesis and characterization of (nat)Ga-AMBA and [(<sup>67</sup>Ga)]Ga-AMBA. *Appl Radiat Isot* 2010;68:2285.
- Maschauer S, Einsiedel J, Hocke C, et al. Synthesis of a <sup>68</sup>Ga-labeled peptoid-peptide hybrid for imaging of neurotensin receptor expression in vivo. *ACS Med Chem Lett* 2010;1:224.
- Strauss LG, Koczan D, Seiz M, et al. Correlation of the Ga-<sup>68</sup>-bombesin analog Ga-<sup>68</sup>-BZH3 with receptors expression in gliomas as measured by quantitative dynamic positron emission tomography (dPET) and gene arrays. *Mol Imaging Biol* 2012;14:376.
- Dimitrakopoulou-Strauss A, Hohenberger P, Haberkorn U, et al. <sup>68</sup>Ga-labeled bombesin studies in patients with gastrointestinal stromal tumors: Comparison with <sup>18</sup>F-FDG. *J Nucl Med* 2007;48:1245.
- Eder M, Knackmuss S, Le Gall F, et al. <sup>68</sup>Ga-labelled recombinant antibody variants for immuno-PET imaging of solid tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37:1397.
- Reubi JC, Erchegyi J, Cescato R, et al. Switch from antagonist to agonist after addition of a DOTA chelator to a somatostatin analog. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37:1551.
- Wadas TJ, Wong EH, Weisman GR, et al. Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease. *Chem Rev* 2010;110:2858.
- Niu G, Chen X. Why integrin as a primary target for imaging and therapy. *Theranostics* 2011;1:30.
- Mirzadeh S, Lambrecht RM. Radiochemistry of Germanium. *J Radioanal Nucl Chem* 1996;202:7.
- Chakravarty R, Shukla R, Ram R, et al. Development of a nano-zirconia based <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator for biomedical applications. *Nucl Med Biol* 2011;38:575.
- Nakayama M, Haratake M, Ono M, et al. A new <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator system using an organic polymer containing N-methylglucamine as adsorbent for <sup>68</sup>Ge. *Appl Radiat Isot* 2003;58:9.
- Bandoli G, Dolmella A, Tisato F, et al. Mononuclear six-coordinated Ga(III) complexes: A comprehensive survey. *Coord Chem Rev* 2009;253:56.
- Maecke HR, Hofmann M, Haberkorn U. <sup>68</sup>Ga-Labeled peptides in Tumor Imaging. *J Nucl Med* 2005;46:172.

35. Reichert DE, Lewis JS, Anderson CJ. Metal complexes as diagnostic tools. *Coord Chem Rev* 1999;184:3.
36. Harris WR, Pecoraro VL. Thermodynamic binding constants for gallium transferrin. *Biochemistry* 1983;22:292.
37. Viola NA, Rarig RS, Ouellette W, et al. Synthesis, structure and thermal analysis of the gallium complex of 1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA). *Polyhedron* 2006;25:3457.
38. Velikyan I, Maecke HR, Långstrom B. Convenient preparation of 68Ga-based PET-radiopharmaceuticals at room temperature. *Bioconjug Chem* 2008;19:569.
39. Tanaka K, Fukase K. PET (positron emission tomography) imaging of biomolecules using metal-DOTA complexes: A new collaborative challenge by chemists, biologists, and physicians for future diagnostics and exploration of *in vivo* dynamics. *Org Biomol Chem* 2008;6:815.
40. Hancock RD. Chelate Ring Size and Metal Ion selection. *J Chem Educ* 1992;69:615.
41. Pruszyński M, Majkowska-Pilip A, Loktionova NS, et al. Radiolabeling of DOTATOC with the long-lived positron emitter 44Sc. *Appl Radiat Isot* 2012;70:974.
42. van Essen M, Krenning EP, Kooij PP, et al. Effect of therapy with [177Lu-DOTA0,Tyr3]octreotate in patients with paraganglioma, meningioma, small cell lung carcinoma, and melanoma. *J Nucl Med* 2006;47:1599.
43. Valencak J, Heere-Ress E, Traub-Weidinger T, et al. Somatostatin receptor scintigraphy with 111In-DOTA-lanreotide and 111In-DOTA-Tyr3-octreotide in patients with stage IV melanoma: *In-vitro* and *in-vivo* results. *Melanoma Res* 2005;15:523.
44. Schumacher T, Hofer S, Eichhorn K, et al. Local injection of the 90Y-labelled peptidic vector DOTATOC to control gliomas of WHO grades II and III: An extended pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002;29:486.
45. Wild D, Frischknecht M, Zhang H, et al. Alpha- versus beta-particle radioreceptor therapy in a human prostate cancer model (213Bi-DOTA-PESIN and 213Bi-AMBA versus 177Lu-DOTA-PESIN). *Cancer Res* 2011;71:1009.
46. Cheng KT, Lewis JS, Biddlecombe GB. 86Y-DOTA-[Pro1-Tyr4]-Bombesin[1-14]. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information; 2008.
47. Asti M, Tegoni M, Farioli D, et al. Influence of cations on the complexation yield of DOTATATE with yttrium and lutetium: A perspective study for enhancing the 90Y and 177Lu labeling conditions. *Nucl Med Biol* 2012;39:509.
48. Beer AJ, Kessler H, Wester HJ, et al. PET Imaging of Integrin  $\alpha v \beta 3$  expression. *Theranostics* 2011;1:48.
49. Liu Z, Niu G, Shi J, et al. (68)Ga-labeled cyclic RGD dimers with Gly3 and PEG4 linkers: Promising agents for tumor integrin  $\alpha v \beta 3$  PET imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009;36:947.
50. Knetsch PA, Petrik M, Griessinger CM, et al. [68Ga]NO-DAGA-RGD for imaging  $\alpha v \beta 3$  integrin expression. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011;38:1303.
51. Kaur A, Dasanu CA. Targeting the HER2 pathway for the therapy of lower esophageal and gastric adenocarcinoma. *Expert Opin Pharmacother* 2011;12:2493.
52. Tolmachev V, Velikyan I, Sandstrom M, et al. A HER2-binding Affibody molecule labelled with 68Ga for PET imaging: Direct *in vivo* comparison with the 111In-labelled analogue. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37:1356.
53. Baum RP, Prasad V, Muller D, et al. Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic 111In- or 68Ga-labeled affibody molecules. *J Nucl Med* 2010;51:892.
54. Speirs CK, Hwang M, Kim S, et al. Harnessing the cell death pathway for targeted cancer treatment. *Am J Cancer Res* 2011;1:43.
55. Zhivotovsky B, Orrenius S. Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death community. *Cell Calcium* 2011;50:211.
56. Niu G, Chen X. Apoptosis imaging: Beyond annexin V. *J Nucl Med* 2010;51:1659.
57. Ungethüm L, Kenis H, Nicolaes GA, et al. Engineered annexin A5 variants have impaired cell entry for molecular imaging of apoptosis using pretargeting strategies. *J Biol Chem* 2011;286:1903.
58. Boersma HH, Kietselaer BL-JH, Stolk LML, et al. Past, present, and future of annexin A5: From protein discovery to clinical applications. *J Nucl Med* 2005;46:2035.
59. Bauwens M, De Saint-Hubert M, Devos E, et al. Site-specific 68Ga-labeled Annexin A5 as a PET imaging agent for apoptosis. *Nucl Med Biol* 2011;38:381.
60. Noel A, Jost M, Maquoi E. Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19:52.
61. Ujula T, Huttunen M, Luoto P, et al. Matrix metalloproteinase 9 targeting peptides: Syntheses, 68Ga-labeling, and preliminary evaluation in a rat melanoma xenograft model. *Bioconjug Chem* 2010;21:1612.
62. Nikkola J, Vihinen P, Vuoristo MS, et al. High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:5158.
63. Guillermet-Guibert J, Lahlou H, Pyronnet S, et al. Endocrine tumours of the gastrointestinal tract. Somatostatin receptors as tools for diagnosis and therapy: Molecular aspects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005;19:535.
64. Chen K, Conti PS. Target-specific delivery of peptide-based probes for PET imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:1005.
65. Grozinsky-Glasberg S, Grossman AB, Korbonits M. The role of somatostatin analogues in the treatment of neuroendocrine tumours. *Mol Cell Endocrinol* 2008;286:238.
66. Gabriel M, Decristoforo C, Kendler D, et al. 68Ga-DOTA-Tyr3-Octreotide PET in neuroendocrine tumors: Comparison with somatostatin receptor scintigraphy and CT. *J Nucl Med* 2007;48:508.
67. Buchmann I, Henze M, Engelbrecht S, et al. Comparison of 68Ga-DOTATOC PET and 111In-DTPAOC (Octreoscan) SPECT in patients with neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007;34:1617.
68. Ambrosini V, Nanni C, Zompatori M, et al. (68)Ga-DOTA-NOC PET/CT in comparison with CT for the detection of bone metastasis in patients with neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37:722.
69. Ambrosini V, Tomassetti P, Castellucci P, et al. Comparison between 68Ga-DOTA-NOC and 18F-DOPA PET for the detection of gastro-entero-pancreatic and lung neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008;35:1431.
70. Haug AR, Auernhammer CJ, Wangler B, et al. 68Ga-DOTATATE PET/CT for the early prediction of response to somatostatin receptor-mediated radionuclide therapy in patients with well-differentiated neuroendocrine tumors. *J Nucl Med* 2010;51:1349.

71. Srirajakanthan R, Kayani I, Quigley AM, et al. The role of <sup>68</sup>Ga-DOTATATE PET in patients with neuroendocrine tumors and negative or equivocal findings on <sup>111</sup>In-DTPA-troreotide scintigraphy. *J Nucl Med* 2010;51:875.
72. Poepfel TD, Binse I, Petersenn S, et al. Differential uptake of <sup>68</sup>Ga-DOTATOC and <sup>68</sup>Ga-DOTATAE in PET/CT of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Recent Results Cancer Res* 2013;194:353.
73. Jensen RT, Batten JF, Spindel ER, et al. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian Bombesin Receptors: Nomenclature, distribution, pharmacology, signaling and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev* 2008;60:1.
74. Gonzalez N, Moody TW, Igarashi H, et al. Bombesin-related peptides and their receptors: Recent advances in their role in physiology and disease states. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008;15:58.
75. Beer M, Montani M, Gerhardt J, et al. Profiling gastrin-releasing peptide receptor in prostate tissues: clinical implications and molecular correlates. *Prostate* 2012;72:318.
76. Flores DG, Meurer L, Uberti AF, et al. Gastrin-releasing peptide receptor content in human glioma and normal brain. *Brain Res Bull* 2010;82:95.
77. Koopmans KP, Neels ON, Kema IP, et al. Molecular imaging in neuroendocrine tumors: Molecular uptake mechanisms and clinical results. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009;71:199.
78. Cescato R, Maina T, Nock B, et al. Bombesin receptor antagonists may be preferable to agonists for tumor targeting. *J Nucl Med* 2008;49:318.
79. Mansi R, Wang X, Forrer F, et al. Evaluation of a 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid-conjugated bombesin-based radioantagonist for the labeling with single-photon emission computed tomography, positron emission tomography, and therapeutic radionuclides. *Clin Cancer Res* 2009;15:5240.
80. Zhang H, Schuhmacher J, Waser B, et al. DOTA-PESIN, a DOTA-conjugated bombesin derivative designed for the imaging and targeted radionuclide treatment of bombesin receptor-positive tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007;34:1198.
81. Abiraj K, Mansi R, Tamma ML, et al. Bombesin antagonist-based radioligands for translational nuclear imaging of gastrin-releasing peptide receptor-positive tumors. *J Nucl Med* 2011;52:1970.
82. Mansi R, Wang X, Forrer F, et al. Development of a potent DOTA-conjugated bombesin antagonist for targeting GRPr-positive tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011;38:97.
83. Dupouy S, Mourra N, Doan VK, et al. The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers. *Biochimie* 2011;93:1369.
84. Evers BM. Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues. *Peptides* 2006;27:2424.
85. Alshoukr F, Rosant C, Maes V, et al. Novel neurotensin analogues for radioisotope targeting to neurotensin receptor-positive tumors. *Bioconjug Chem* 2009;20:1602.
86. Carraway RE, Plona AM. Involvement of neurotensin in cancer growth: Evidence, mechanisms and development of diagnostic tools. *Peptides* 2006;27:2445.
87. Korner M, Reubi JC. NPY receptors in human cancer: A review of current knowledge. *Peptides* 2007;28:419.
88. Kitlinska J. Neuropeptide Y in neural crest-derived tumors: Effect on growth and vascularization. *Cancer Lett* 2007;245:293.
89. Ruscica M, Dozio E, Motta M, et al. Role of neuropeptide Y and its receptors in the progression of endocrine-related cancer. *Peptides* 2007;28:426.
90. Korner M, Waser B, Reubi JC. Neuropeptide Y receptors in renal cell carcinomas and nephroblastomas. *Int J Cancer* 2005;115:734.
91. Medeiros PJ, Al-Khazraji BK, Novielli NM, et al. Neuropeptide Y stimulates proliferation and migration in the 4T1 breast cancer cell line. *Int J Cancer* 2012;131:276.
92. Kitlinska J. Neuropeptide Y (NPY) in neuroblastoma: Effect on growth and vascularization. *Peptides* 2007;28:405.
93. Lu C, Everhart L, Tilan J, et al. Neuropeptide Y and its Y2 receptor: Potential targets in neuroblastoma therapy. *Oncogene* 2010;29:5630.
94. Zhang L, Bijker MS, Herzog H. The neuropeptide Y system: Pathophysiological and therapeutic implications in obesity and cancer. *Pharmacol Ther* 2011;131:91.
95. Korner M, Christ E, Wild D, Reubi JC. Glucagon-like peptide-1 receptor overexpression in cancer and its impact on clinical applications. *Front Endocrinol* 2012;3.
96. Brom M, Oyen WJ, Joosten L, et al. <sup>68</sup>Ga-labelled exendin-3, a new agent for the detection of insulinomas with PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37:1345.
97. Wild D, Christ E, Caplin ME, et al. Glucagon-like peptide-1 versus somatostatin receptor targeting reveals 2 distinct forms of malignant insulinomas. *J Nucl Med* 2011;52:1073.
98. Bohm M, Luger TA, Tobin DJ, et al. Melanocortin receptor ligands: New horizons for skin biology and clinical dermatology. *J Invest Dermatol* 2006;126:1966.
99. Eves PC, MacNeil S, Haycock JW. alpha-Melanocyte stimulating hormone, inflammation and human melanoma. *Peptides* 2006;27:444.
100. Miao Y, Quinn TP. Peptide-targeted radionuclide therapy for melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;67:213.
101. Wei L, Zhang X, Gallazzi F, et al. Melanoma imaging using (111)In-, (86)Y- and (68)Ga-labeled CHX-A''-Re(Arg11)CCMSH. *Nucl Med Biol* 2009;36:345.
102. Liu SV, Schally AV, Hawes D, et al. Expression of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in prostate cancers following therapy with LH-RH agonists. *Clin Cancer Res* 2010;16:4675.
103. Millar RP, Pawson AJ, Morgan K, et al. Diversity of actions of GnRHs mediated by ligand-induced selective signaling. *Front Neuroendocrinol* 2008;29:17.
104. Harrison GS, Wierman ME, Nett TM, et al. Gonadotropin-releasing hormone and its receptor in normal and malignant cells. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:725.
105. Hapgood JP, Sadie H, van Biljon W, et al. Regulation of expression of mammalian gonadotrophin-releasing hormone receptor genes. *J Neuroendocrinol* 2005;17:619.
106. Schottelius M, Berger S, Poethko T, et al. Development of novel <sup>68</sup>Ga- and <sup>18</sup>F-labeled GnRH-I analogues with high GnRHR- targeting efficiency. *Bioconjug Chem* 2008;19:1256.
107. Gourni E, Demmer O, Schottelius M, et al. PET of CXCR4 expression by a (68)Ga-labeled highly specific targeted contrast agent. *J Nucl Med* 2011;52:1803.
108. Brom M, Joosten L, Laverman P, et al. Preclinical evaluation of <sup>68</sup>Ga DOTA minigastrin for the detection of

- cholecystokinin-2/gastrin receptor-positive tumors. *Mol Imaging* 2011;10:144.
109. Thews O, Dillenburg W, Fellner M, et al. Activation of P-glycoprotein (Pgp)-mediated drug efflux by extracellular acidosis: *In vivo* imaging with <sup>68</sup>Ga-labelled PET tracer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37:1935.
110. Hoigebazar L, Jeong JM, Choi SY, et al. Synthesis and characterization of nitroimidazole derivatives for <sup>68</sup>Ga-labeling and testing in tumor xenografted mice. *J Med Chem* 2010;53:6378.
111. Fani M, Wang X, Nicolas G, et al. Development of new folate-based PET radiotracers: Preclinical evaluation of <sup>68</sup>Ga-DOTA-folate conjugates. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011;38:108.
112. Fellner M, Baum RP, Kubicek V, et al. PET/CT imaging of osteoblastic bone metastases with (<sup>68</sup>Ga)-bisphosphonates: First human study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37:834.
113. Burchardt C, Riss PJ, Zoller F, et al. [(<sup>68</sup>Ga)Ga-DO(2)A-(OBu-tyr)(2)]: Synthesis, (<sup>68</sup>Ga)-radiolabeling and *in vitro* studies of a novel (<sup>68</sup>Ga-DO(2)A)-tyrosine conjugate as potential tumor tracer for PET. *Bioorg Med Chem Lett* 2009;19:3498.
114. Roivainen A, Tolvanen T, Salomaki S, et al. <sup>68</sup>Ga-labeled oligonucleotides for *in vivo* imaging with PET. *J Nucl Med* 2004;45:347.
115. Boss A, Bisdas S, Kolb A, et al. Hybrid PET/MRI of intracranial masses: Initial experiences and comparison to PET/CT. *J Nucl Med* 2010;51:1198.
116. Pichler BJ, Wehrl HF, Kolb A, et al. Positron emission tomography/magnetic resonance imaging: The next generation of multimodality imaging? *Semin Nucl Med* 2008;38:199.

Article 2: Targeting neuropeptide receptors for cancer imaging and therapy: Perspectives with bombesin, neurotensin and neuropeptide-Y receptors. *J Nucl Med.* 2014;55:1650-57.

**Clément Morgat**, Anil Kumar Mishra, Raunak Varshney, Michèle Allard, Philippe Fernandez, Elif Hindié

# Targeting Neuropeptide Receptors for Cancer Imaging and Therapy: Perspectives with Bombesin, Neurotensin, and Neuropeptide-Y Receptors

Clément Morgat<sup>1-3</sup>, Anil Kumar Mishra<sup>2-4</sup>, Raunak Varshney<sup>4</sup>, Michèle Allard<sup>1,2,5</sup>, Philippe Fernandez<sup>1-3</sup>, and Elif Hindié<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>CHU de Bordeaux, Service de Médecine Nucléaire, Bordeaux, France; <sup>2</sup>University of Bordeaux, INCIA, UMR 5287, Talence, France; <sup>3</sup>CNRS, INCIA, UMR 5287, Talence, France; <sup>4</sup>Division of Cyclotron and Radiopharmaceutical Sciences, Institute of Nuclear Medicine and Allied Sciences, DRDO, New Delhi, India; and <sup>5</sup>EPHE, Bordeaux, France

**Learning Objectives:** On successful completion of this activity, participants should be able to list and discuss (1) the presence of bombesin receptors, neurotensin receptors, or neuropeptide-Y receptors in some major tumors; (2) the perspectives offered by radiolabeled peptides targeting these receptors for imaging and therapy; and (3) the choice between agonists and antagonists for tumor targeting and the relevance of various PET radionuclides for molecular imaging.

**Financial Disclosure:** The authors of this article have indicated no relevant relationships that could be perceived as a real or apparent conflict of interest.

**CME Credit:** SNMMI is accredited by the Accreditation Council for Continuing Medical Education (ACCME) to sponsor continuing education for physicians. SNMMI designates each *JNM* continuing education article for a maximum of 2.0 AMA PRA Category 1 Credits. Physicians should claim only credit commensurate with the extent of their participation in the activity. For CE credit, SAM, and other credit types, participants can access this activity through the SNMMI website (<http://www.snmlearningcenter.org>) through October 2017.

Receptors for some regulatory peptides are highly expressed in tumors. Selective radiolabeled peptides can bind with high affinity and specificity to these receptors and exhibit favorable pharmacologic and pharmacokinetic properties, making them suitable agents for imaging or targeted therapy. The success encountered with radiolabeled somatostatin analogs is probably the first of a long list, as multiple peptide receptors are now recognized as potential targets. This review focuses on 3 neuropeptide receptor systems (bombesin, neurotensin, and neuropeptide-Y) that offer high potential in the field of nuclear oncology. The underlying biology of these peptide/receptor systems, their physiologic and pathologic roles, and their differential distribution in normal and tumoral tissues are described with emphasis on breast, prostate, and lung cancers. Radiolabeled analogs that selectively target these receptors are highlighted.

**Key Words:** cancer; molecular imaging; peptide/neuropeptide; PET; radiopharmaceutical; receptor; bombesin; neurotensin; neuropeptide Y

**J Nucl Med 2014; 55:1650-1657**

DOI: 10.2967/jnumed.114.142000

**M**olecular imaging with PET or SPECT can visualize biochemical processes and their dysfunction using specific probes. These nuclear medicine techniques are helpful in fundamental research and clinical routine to characterize mechanisms involved in a pathologic

process; to assist clinicians in diagnosis, staging, and patient management; to select patients who are expected to benefit from a specific treatment; and to monitor its efficacy. In oncology, molecular imaging is strongly dependent on the availability of a specific target on tumor cells or within the tumor stroma or vasculature and the suitability of the designed radiolabeled vector, which depends on its biodistribution, metabolism, affinity, and specificity for the target. One of the most promising avenues in PET nuclear oncology is the imaging of neuropeptide (regulatory peptide) receptors.

Targeting somatostatin receptors has been widely used for imaging neuroendocrine tumors (NETs) using diethylenetriamine-pentaacetic acid (DTPA)-octreotide labeled with <sup>111</sup>In and for peptide receptor radionuclide therapy of metastatic NETs using somatostatin analogs labeled with <sup>90</sup>Y or <sup>177</sup>Lu (1). Recently, some high-affinity somatostatin analogs holding a DOTA-chelate (DOTATOC, DOTATATE, DOTANOC), and radiolabeled with <sup>68</sup>Ga (1,2) or <sup>64</sup>Cu (3) for PET/CT imaging, showed excellent results in gastroenteropancreatic NETs superseding in resolution and sensitivity conventional <sup>111</sup>In-DTPA-octreotide imaging (Fig. 1A). These new analogs also provided encouraging results in pheochromocytomas and paragangliomas (Fig. 1B) (4). Also of importance in NETs is the incretin receptor family. Insulinomas have high expression of glucagon-like peptide-1 receptor, and glucagon-like peptide 1 radiolabeled analogs have been shown to offer excellent sensitivity (Fig. 2) (5). Another member of this family, the receptor for glucose-dependent insulinotropic polypeptide, has recently been found to be expressed in most pancreatic, ileal, and bronchial NETs, including those that are somatostatin receptor-negative (6), as well as in medullary thyroid cancer (7), and radiolabeled glucose-dependent insulinotropic polypeptide analogs are promising (8). Other targets in NETs are the cholecystokinin B receptor and the recently described neuropeptide S receptor 1 (9).

The success encountered in NETs is probably only the first of a long list. This review focuses on 3 neuropeptide receptor systems whose significance in the field of oncology is growing (bombesin, neurotensin, and neuropeptide-Y [NPY] receptors). The underlying

Received Apr. 25, 2014; revision accepted Aug. 5, 2014.

For correspondence or reprints contact either of the following:

Clément Morgat, CHU Bordeaux, Hôpital Haut-Lévêque, Avenue de Magellan, 33604 Pessac, France.

E-mail: [clement.morgat@chu-bordeaux.fr](mailto:clement.morgat@chu-bordeaux.fr)

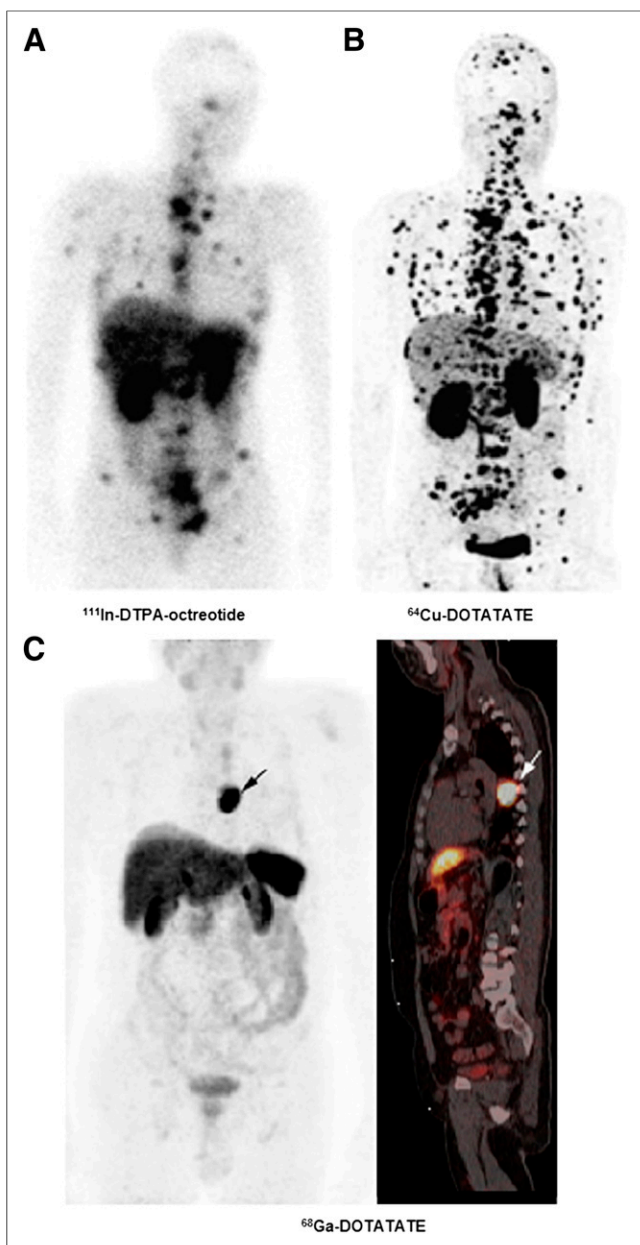
Elif Hindié, CHU Bordeaux, Hôpital Haut-Lévêque, Avenue de Magellan, 33604 Pessac, France.

E-mail: [elif.hindie@chu-bordeaux.fr](mailto:elif.hindie@chu-bordeaux.fr)

Published online Sep. 4, 2014.

COPYRIGHT © 2014 by the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Inc.



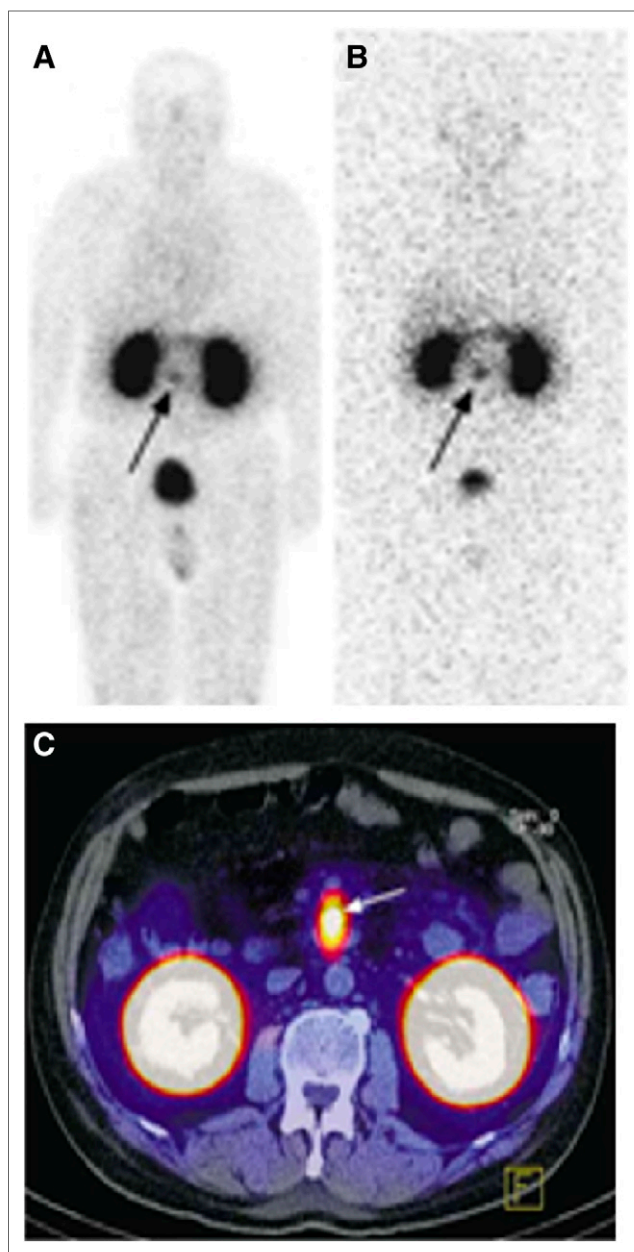


**FIGURE 1.** Somatostatin receptor imaging in patients with NETs. (A and B) Comparison of conventional  $^{111}\text{In-DTPA-octreotide}$  scintigraphy (A) and  $^{64}\text{Cu-DOTATATE}$  PET (B) in patient with multiple bone and soft-tissue metastases. (C)  $^{68}\text{Ga-DOTATATE}$  PET/CT images in patient with thoracic paraganglioma (arrows). (Reprinted with permission of (3,4).)

biology, distribution, and physiologic role of these peptide/receptor systems are described. We then discuss their presence in tumors, with a focus on breast, prostate, and lung cancers. Promising radiolabeled peptides that specifically target these receptors are highlighted.

#### THE BOMBESIN, NEUROTENSIN, AND NPY RECEPTORS

The bombesin, neurotensin, and NPY receptors are present in the central nervous system and in peripheral tissues. Physiologic distribution in the central nervous system is outside the scope of the present topic and, because of the blood-brain barrier, is of little relevance for imaging after systemic administration. Neuropeptides

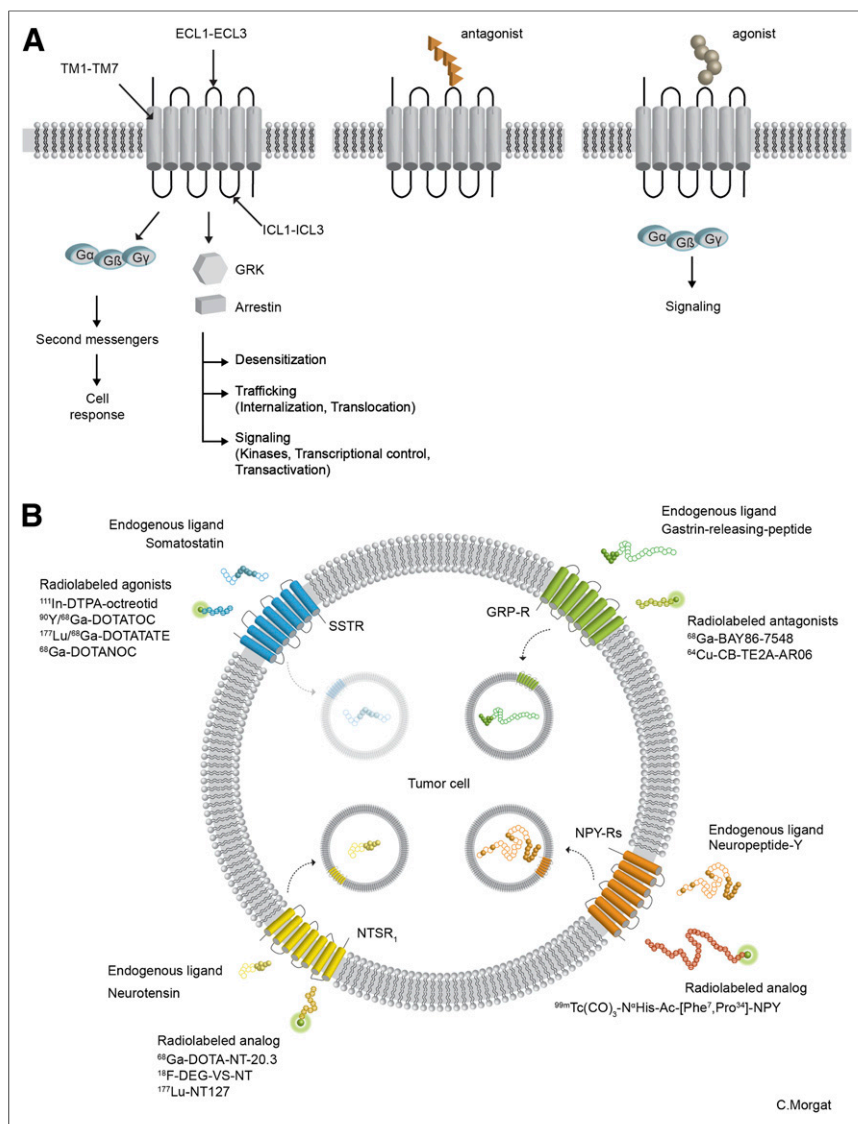


**FIGURE 2.** Glucagon-like peptide 1 receptor imaging in a man with symptomatic neuroglycopenia and endogenous hyperinsulinism. Planar scans at 4 h (A) and at 4 d (B) and transaxial SPECT/CT fusion image at 4 d (C) after injection of  $^{111}\text{In-DTPA-exendin-4}$  show insulinoma (arrows). (Reprinted with permission of (5).)

are synthesized in the gastrointestinal tract and other peripheral organs by a restricted number of specialized cells. They can act as autocrine, paracrine, or endocrine molecules and bind with high affinities to their receptors, which in most of cases are G protein-coupled receptors (GPCRs) (10). GPCRs, also known as 7-transmembrane receptors, transduce signals through their interactions with extracellular small-molecule ligands and intracellular G proteins to initiate signaling cascades (Fig. 3).

#### Bombesin System

Bombesin was originally derived from the skin of the frog *Bombina orientalis*. Two related peptides, gastrin-releasing peptide (GRP) and neuromedin-B, are present in humans (11). GRP elicits



**FIGURE 3.** (A) GPCRs generally operate within transduction unit containing receptor that binds soluble signal, heterotrimeric ( $\alpha\beta\gamma$ ) G protein, and effector component such as enzyme that promotes intracellular changes leading to biologic response. GPCRs can also signal in a G-protein-independent manner, through direct interactions with other effectors, such as arrestin (10). (B) Schematic representation of somatostatin, bombesin, neurotensin, and NPY receptors; their endogenous ligands; and some promising radiopharmaceuticals aiming for these receptors. DEG-VS-NT = (2-(2-(2-fluoroethoxy)ethoxy)ethylsulfonyl)ethene-neurotensin; DTPA = diethylenetriaminepentaacetic acid; ECL = extracellular loop; ICL = intracellular loop; SSTR 5 = somatostatin receptor; TM = transmembrane domain.

gastrin release and regulates gastric acid secretion and enteric motor function. Receptors of the bombesin family are GPCRs (11,12). There are 3 receptors: GRP receptor (GRPR) (also known as bombesin receptor 2 [BB<sub>2</sub>]); neuromedin-B receptor (BB<sub>1</sub>); and orphan receptor (BRS<sub>3</sub>, or BB<sub>3</sub>). GRP has higher affinity for GRPR than for neuromedin-B receptor. GRPR is promising for cancer targeting (11). GRPR is expressed in the pancreas and at lower levels in the colon, breast, prostate, and skin (11).

### Neurotensin System

Neurotensin is a 13-amino-acid peptide that functions as a neurotransmitter and hormone. In the gastrointestinal tract, neurotensin is released from the enteroendocrine N cells in response to

lipid ingestion and is involved in the stimulation of pancreatic, biliary, and gastric acid secretions; the facilitation of fatty acid absorption; and the regulation of small-bowel motility. The C-terminal region neurotensin(8–13) is responsible for the activation of neurotensin receptor (13). Neurotensin effects are mediated through 3 receptor subtypes: neurotensin receptor 1 (NTSR<sub>1</sub>) and NTSR<sub>2</sub> (high- and low-affinity receptors, respectively) are GPCRs (12), whereas NTSR<sub>3</sub> (sortilin) has a single-transmembrane domain. NTSR<sub>1</sub> is promising for cancer targeting. In peripheral tissues, NTSR<sub>1</sub> is located mainly in the colon and lung (14).

### NPY System

The NPY family comprises 3 peptides: NPY, polypeptide-YY, and pancreatic polypeptide. Major emphasis is given to NPY in oncology. NPY plays integrative functions in peripheral organs such as vasoconstriction or induction of food intake. In humans, NPY exerts its effects through 4 GPCRs: Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>4</sub>, and Y<sub>5</sub> (12). Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, and Y<sub>5</sub> can be associated with different aspects of oncogenesis and angiogenesis. In peripheral organs, NPY receptors can be found in colon, kidney, adrenal gland, reproductive organs, testis, and breast (15).

### PRESENCE OF BOMBESIN, NEUROTENSIN, OR NPY RECEPTORS IN SELECTED TUMORS

We focus on breast, prostate, and lung cancer, but the presence of these receptors is also signaled in other tumors. Neuropeptide receptors not only can be present in tumors but also can influence the oncopathologic process and be expressed at specific stages of carcinogenesis or tumor progression and in selective subtypes of a tumor.

Quantitative receptor autoradiography and semiquantitative immunohistochemistry-immunohistochemistry are considered relevant methods to compare levels of receptor expression between normal and tumoral

tissues. Although less straightforward, data on receptor messenger RNA levels or neuropeptide levels in tumors have also been considered.

### Breast Cancer

**Neurotensin Receptors.** One team showed that 91% of invasive ductal breast carcinomas were positive for NTSR<sub>1</sub> (16). Also, the level of expression of NTSR<sub>1</sub> was positively correlated with tumor size, Scarff-Bloom-Richardson grade, number of metastatic lymph nodes, recurrence, and survival (17). The neurotensin receptor is not present in normal epithelial breast cells (18).

**Bombesin Receptors.** Using receptor autoradiography, Gugger and Reubi reported the presence of GRPR in 62% of invasive breast

carcinomas, often with high density and heterogeneous distribution (19). Lymph node metastases from patients with GRPR-positive primary tumors were also GRPR-positive. Gugger and Reubi also found a ubiquitous GRPR expression in non-neoplastic human breast tissue (19). In a preliminary report, GRPR messenger RNA has been found to be correlated with estrogen receptor expression (20).

**NPY Receptors.** With receptor autoradiography, NPY receptors have been identified in 85% of breast carcinomas. Lymph node metastases from receptor-positive primary tumors were also positive.  $Y_1$  was the dominant receptor in tumors, whereas non-neoplastic breast tissue expressed  $Y_2$  preferentially (21). Reubi et al. suggested that neoplastic transformation might switch the NPY receptor from  $Y_2$  to  $Y_1$  subtype (21). Recent in vitro studies have incriminated  $Y_5$  in breast cancer growth and angiogenesis (22).

**Preliminary Conclusions.** NTSR<sub>1</sub> is an attractive target associated with clinical and pathologic factors for poor prognosis (17). GRPR and NPY receptors should also be of interest for targeting breast cancer metastases when the primary tumor is positive, but comparison between these receptors is needed. Importantly, no study has investigated the distribution of these neuropeptide receptors according to tumor phenotype (based on the status of estrogen receptor, progesterin receptor, and human epidermal growth factor receptor 2) or molecular classification of breast cancers (23). Identification of targetable receptors in specific subtypes of breast cancer would be of major importance—notably so in triple-negative breast cancer, which currently has limited systemic treatment options other than chemotherapy.

### Prostate Cancer

**Bombesin Receptors.** Using receptor autoradiography, Markwalder and Reubi reported that GRPR is present, often in high density, in invasive carcinoma as well as in prostatic intraepithelial neoplasia, whereas GRPR density in non-neoplastic prostate hyperplasia was low (24). Well-differentiated carcinomas had a higher receptor density than poorly differentiated ones. One study found GRPR to be expressed in 86% of lymph node metastases but only 53% of bone metastases (25). Beer et al. studied prostate samples from 530 patients using immunohistochemistry (26). Normal prostate tissues were mostly GRPR-negative, whereas GRPR was overexpressed in prostate cancer. However, more aggressive prostate cancer had lower GRPR expression levels than lower-grade tumors, with significant inverse correlation between GRPR expression and increasing Gleason score, prostate-specific antigen value, and tumor size. Moreover, GRPR expression was positively correlated with androgen receptor expression (26). Kömer et al. found a progressive increase in GRPR density over atypical glands from normal prostate gland to high-grade prostatic intraepithelial neoplasia but no further increase to invasive carcinoma (27). These findings are of importance when interpreting GRP imaging studies.

**Neurotensin Receptors.** Early studies noted that neurotensin and neurotensin receptors are recruited in advanced prostate cancer as an alternative growth pathway in the absence of androgens (28). NTSR<sub>1</sub> is expressed in prostate cancer cells but not in normal prostate epithelial cells (29). In cell cultures, NTSR<sub>1</sub> expression increases with the tumorigenic potential of cancer cells (30). NTSR<sub>1</sub> was also reported to be involved in resistance to radiotherapy (29).

**NPY Receptors.** Recent studies uncovered the expression of  $Y_1$ -R gene and protein in prostate cancer cells and a role of NPY in regulating tumor growth (31,32). Data on the expression of NPY-R in tissues from patients with prostate cancer of different stages are therefore urgently needed.

**Preliminary Conclusions.** The natural history of prostate cancer extends from an indolent localized process to biochemical relapse after radical treatment with curative intent to lethal castrate-resistant metastatic disease. There is a need to improve diagnostic imaging in many clinical circumstances, and molecular imaging is expected to play an important role (33). In addition to <sup>18</sup>F-FDG and <sup>18</sup>F-choline, several other PET tracers are in development (33).

Neuropeptide imaging in prostate cancer has been focused mostly on GRPR targeting, with exciting first results with some novel radiolabeled analogs. No doubt, other neuropeptide receptors such as NTSR<sub>1</sub> and NPY receptors will enlarge the field of investigation. GRPR and NTSR<sub>1</sub> have divergent expression as regards androgen status and, thus, may have complementary roles in prostate cancer. GRPR expression is positively correlated with androgen receptor expression, and GRPR imaging might be most sensitive in the early stage of disease or in patients with biochemical-relapse “prostate-specific antigen rise” who are not on androgen-deprivation therapy. Contrarily, the NTSR<sub>1</sub> pathway appears to be activated by androgen deprivation, suggesting a role for NTSR<sub>1</sub> imaging during the switch to castration-resistant disease (28–30).

### Lung Cancer

**Neurotensin Receptors.** Alifano et al. investigated NTSR<sub>1</sub> expression in patients with pathologic stage I lung adenocarcinoma. Immunopositivity was found in 60% of cases. NTSR<sub>1</sub> positivity was associated with lower survival rates (34). In vitro, neurotensin antagonist SR48692 inhibits proliferation (35). NTSR<sub>1</sub> is also expressed in 90% of mesotheliomas (36).

**Bombesin Receptors.** GRPR is expressed at similar rates in non-small cell lung cancer (62%) and small cell lung cancer (53%), with subsets of patients showing distinctly strong expression (37). Early studies have shown that GRP stimulates the clonal growth of human small cell lung cancer cell lines and that bombesinlike peptides can function as autocrine growth factors (38). Recently, it was found that a subset of cells that persist after chemotherapy, “cancer stem-like cells,” have increased expression of receptors for GRP and arginine vasopressin (39).

**Preliminary Conclusions.** Improvements in diagnosis and treatment and identification of new targets in lung cancer are urgently needed (40). The identification of NTSR<sub>1</sub> as a marker of poor prognosis in resected stage I lung adenocarcinoma may help decisions on adjuvant treatment (34). NTSR<sub>1</sub> expression also opens important perspectives for imaging and targeting. NTSR<sub>1</sub> and GRPR are strongly expressed in subsets of lung adenocarcinomas (34,37). It will be important to determine the molecular profile of these tumors and whether they are associated with driver mutations or gene rearrangements (e.g., epidermal growth factor receptor and EML4-ALK) involved in tumor progression.

### Other Tumors

The role of these neuropeptide receptors extends to other tumors. Pilot studies drew attention to the role of neurotensin in pancreatic adenocarcinoma (41,42). In xenografts of human pancreatic carcinoma MIA PaCa-2, neurotensin significantly increased the size, weight, and DNA and protein content, and these effects were inhibited by SR48692 (41). With receptor autoradiography, 75% of ductal pancreatic adenocarcinomas were neurotensin receptor-positive, whereas no neurotensin receptors were found in endocrine pancreatic cancers, in chronic pancreatitis, or in normal pancreatic tissues (42). This high expression in ductal pancreatic adenocarcinomas offers the molecular basis for neurotensin

**TABLE 1**  
Main Physical Properties of  $^{18}\text{F}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ , and  $^{64}\text{Cu}$

Radionuclide	Half-life	Production	Positron-branching	Mean/max $\beta^+$ energy (MeV) (63)	Positron range in water (mm) (Rrms/Rmax) (63)
$^{18}\text{F}$	109.8 min	Cyclotron	96.7%	0.250/0.64	0.2/2.3
$^{68}\text{Ga}$	67.6 min	$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator	89.1%	0.836/1.9	1.2/9.0
$^{64}\text{Cu}$	12.7 h	Cyclotron	17.4%	0.278/0.58	0.2/2.0

Rrms/Rmax = root-mean square positron range/maximum extrapolated range.

receptor scintigraphy for early tumor diagnosis, as well as a rationale for treatment strategies with neurotensin receptor antagonists and radiolabeled neurotensin analogs (42). In head and neck squamous cell carcinomas, high messenger RNA expression levels of neurotensin and NTSR<sub>1</sub> are associated with a poor metastasis-free survival rate (43). In vitro, neurotensin agonists have been shown to promote cellular invasion, migration, and induction of interleukin 8 and matrix metalloproteinase 1 transcripts (43). NTSR<sub>1</sub> is also overexpressed in colorectal carcinoma (44). GRPR and NTSR<sub>1</sub> are both expressed in gastrointestinal stromal tumors. Melanocortin-1 receptor in melanomas is targetable with  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ligands. However, GRPR, NTSR<sub>1</sub>, and NPY receptors also deserve investigation. A high level of GRPR immunorexpression was found in 59% of cutaneous melanomas (45). NPY receptors Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, or both were detected in tumor cells and neovasculature in subsets of ovarian neoplasms, renal cell carcinomas, nephroblastomas, adrenal tumors, and neural-crest-derived tumors, with high incidence and density in Ewing sarcomas and neuroblastomas (46,47). Thus, not only tumor cells but also tumoral vessels can overexpress neuropeptide receptors, as is the case for GRPR in urinary tract cancers and ovarian cancer (48).

#### RADIOLABELED ANALOGS TARGETING BOMBESIN, NEUROTENSIN, OR NPY RECEPTORS

Ideal radioligands should have fast clearance from circulation, low in vivo metabolism, high affinity, specific uptake, and high tumor-to-nontumor ratios. Because of their lower molecular weight, peptide probes can more easily meet these criteria than antibodies.

Classically, peptide receptor targeting used only analogs that were agonists. More recently, however, the use of antagonists has been a subject of major interest (49,50). Although not internalized into tumor cells after binding to the receptors, some antagonists offer excellent targeting (49). A recent clinical study that compared a somatostatin antagonist ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11) with the agonist  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE in the same patients found higher tumor uptake and higher tumor-to-kidney and tumor-to-bone marrow ratios with the radiolabeled antagonist (50). However, the exact mechanisms (number of binding sites, dissociation rate, metabolic stability) by which some antagonists behave better than agonists in vivo are still unclear and will need further investigation. When the neuropeptide has tumor-stimulating properties or undesirable physiologic effects, an antagonist is preferred, especially when non-negligible amounts have to be administered, such as for peptide receptor radionuclide therapy (49).

Macrocyclic chelators, such as DOTA, NODAGA, or CB-TE2A (4,11-bis(carboxymethyl)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]-hexadecane), can form stable complexes with various radiometals relevant for

PET ( $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ) or SPECT ( $^{111}\text{In}$ ) imaging or  $\beta$  therapy ( $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ).

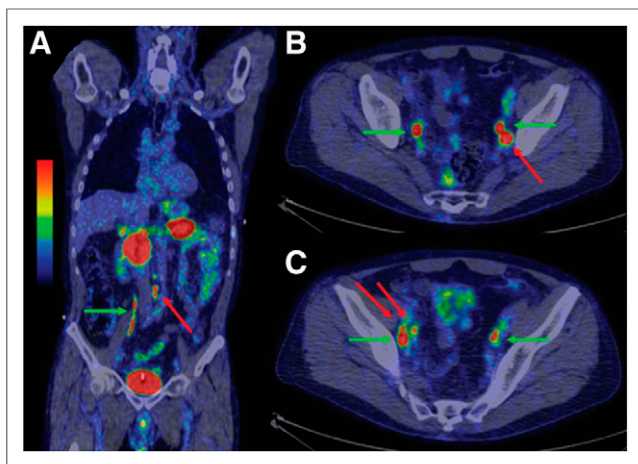
$^{68}\text{Ga}$  and  $^{64}\text{Cu}$  are experiencing wide development. Some of their physical properties are shown in Table 1.  $^{68}\text{Ga}$  is attractive because of in-house production with a  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generator and its short half-life, allowing rapid examination (51). On the other hand, the longer half-life of  $^{64}\text{Cu}$  allows industrial shipping and can be favored when delayed imaging improves tumor-to-background ratios. Both radionuclides have somewhat less optimal physical properties than  $^{18}\text{F}$ . The high positron energy of  $^{68}\text{Ga}$  (maximum  $\beta^+$ , 1.9 MeV) might slightly affect resolution on PET imaging (Table 1). As for  $^{64}\text{Cu}$ , the longer half-life, low positron branching (17.8%), and the presence of  $\beta^-$  emission (38.5%) would increase radiation dose. However, because many peptides have fast urinary clearance, patients' absorbed doses remain in the range of those with  $^{18}\text{F}$  examinations. Distinct advantages of these radioisotopes over  $^{18}\text{F}$  are chemical properties excellent for peptide labeling through appropriate chelators, and the ability to predict dosimetry and better plan radiopeptide therapy with  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ , or  $^{67}\text{Cu}$ -labeled radiopharmaceuticals.

#### Radiolabeled GRP Analogs

A proof of concept for in vivo GRPR targeting was provided by Van de Wiele et al., who used  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled N<sub>3</sub>S-Gly-5-Ava-BN (7-14) (RP527), a selective agonist. In breast cancer patients, specific uptake was noted in the primary tumor in 8 of 9 patients and in involved axillary lymph nodes. Tumor uptake matched GRPR expression at immunohistochemistry (52). No uptake was seen in tamoxifen-resistant patients with bone metastases.

Among antagonists,  $^{68}\text{Ga}$ -RM2, also known as BAY 86-7548 ( $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-4-amino-1-carboxymethyl-piperidine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH<sub>2</sub>), has been assessed in 14 patients with prostate cancer (11 untreated, 2 with biochemical recurrence, and 1 whose cancer was hormone-refractory) (53). This pilot study had encouraging results as related to the detection of primary prostate cancer and metastatic lymph nodes (Fig. 4), as well as in detection of local recurrence in the prostate bed and nodal relapse. However,  $^{68}\text{Ga}$ -BAY 86-7548 failed to show multiple bone metastases in the hormone-refractory patient. These findings are consistent with levels of GRPR expression in tissues according to tumor status (hormone-sensitive vs. castration-resistant) (26).

Another GRPR antagonist,  $^{64}\text{Cu}$ -CB-TE2A-AR-06 (CB-TE2A-PEG<sub>4</sub>-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH<sub>2</sub>), has recently been investigated in 4 patients with newly diagnosed prostate cancer (Gleason 6–7). It was found to be metabolically stable



**FIGURE 4.** GRPR PET/CT imaging with  $^{68}\text{Ga}$ -BAY 86-7548 in patient with prostate cancer metastasis to multiple lymph nodes. (A) In coronal view, 2 normal-sized (<10 mm) nodes above aortic bifurcation (red arrow) show increased uptake. (B and C) In axial view, 1 left parailiac node (B) and 2 right parailiac nodes (C) also show increased uptake of  $^{68}\text{Ga}$ -BAY 86-7548 (red arrows). These 5 lymph nodes were histologically confirmed as metastases at surgery. Green arrows point to ureters. (Reprinted with permission of (53).)

and showed high focal uptake in 3 of 4 patients (Fig. 5). The fourth patient had less than 5% tumor cells, resulting in modest focal uptake (54). GRPR imaging showed high physiologic uptake in the pancreas (Fig. 5).

#### Radiolabeled Neurotensin Analogs

The first generation of radiolabeled analogs was somewhat disappointing. Buchegger et al. used  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NT-XI in 4 patients with ductal pancreatic adenocarcinomas: only a single patient had tumor uptake (this tumor showed high expression of NTSR<sub>1</sub> receptors in vitro (55). Nontumoral uptake was high in several organs.

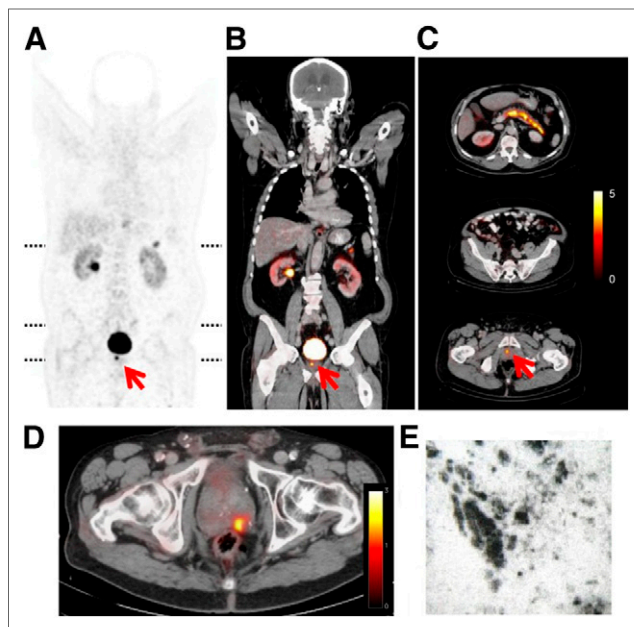
Recently, better stabilized analogs aiming for NTSR<sub>1</sub> have been synthesized, such as  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NT-XIX ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -(NHis)Ac-Arg-(N-CH<sub>3</sub>)-Arg-Pro-Dmt-Tle-Leu),  $^{188}\text{Re}$ -NT-XIX,  $^{111}\text{In}$ -DOTA-NT-20.4 ( $^{111}\text{In}$ -Ac-Lys(DOTA)-Pro-Arg-Me-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH),  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT-20.3 ( $^{68}\text{Ga}$ -Ac-Lys(DOTA)-Pro-Me-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH),  $^{177}\text{Lu}$ -NT127 ( $^{177}\text{Lu}$ -NLys-Lys-Pro-Tyr-Tle-Leu), and  $^{18}\text{F}$ -DEG-VS-NT ( $^{18}\text{F}$ -(2-(2-(2-fluoroethoxy)ethoxy)ethylsulfonylethene-neurotensin) (56–59). Figure 6 shows PET imaging with  $^{18}\text{F}$ -DEG-VS-NT in mice bearing NTSR<sub>1</sub>-positive tumor xenografts. These encouraging results pave the way for clinical trials.

#### Radiolabeled NPY Analogs

Y<sub>1</sub> receptor ligands with high affinity were recently developed, and a proof of concept was provided by the use of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (CO)<sub>3</sub>-N<sup>α</sup>His-Ac-[Phe<sup>7</sup>,Pro<sup>34</sup>]-NPY in women with breast cancer (60).

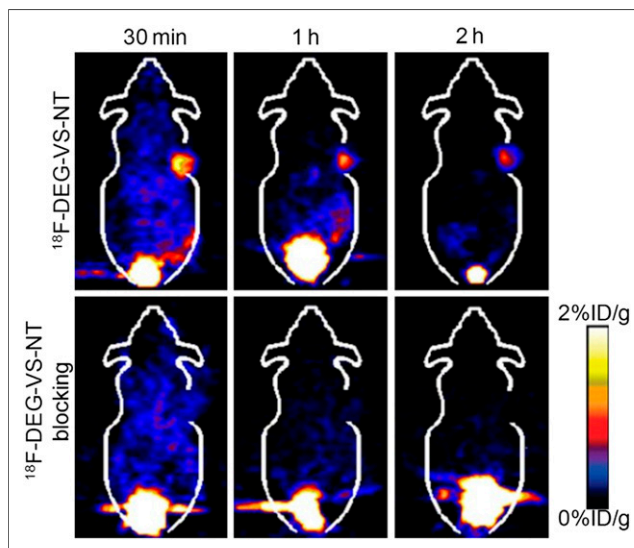
#### Multiple Targeting

Because various neuropeptide receptors can be overexpressed in some tumors, multitargeting can be a way to enhance targeting and counteract heterogeneity of expression within tumors. Heterodimeric ligands were developed for dual targeting of GRPR and NPY receptors in breast cancer (61). Arg-Gly-Asp-bombesin hybrid peptides were also developed for dual targeting of GRPR and integrin α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>-aiming receptors on tumor cells and vasculature (62). We think that it would also be helpful to consider dual targeting of GRPR and



**FIGURE 5.** GRPR PET/CT imaging at 4 h after injection of  $^{64}\text{Cu}$ -CB-TE2A-AR-06 in 2 patients with biopsy-proven prostate cancer. (A–C) Patient with biopsy-proven prostate cancer: coronal sections of PET and fused PET/CT (A and B) and axial PET/CT fusion images at levels indicated by dotted lines in A (C). There is intense uptake by prostate tumor (arrows) and pancreas. (D and E) Correlation between in vivo PET and ex vivo autoradiography in another patient with prostate cancer who underwent surgery after PET/CT: transaxial fused PET/CT (D) and ex vivo GRP autoradiography demonstrating GRPR expression by tumor (E). (Reprinted with permission of (54).)

NTSR<sub>1</sub> in prostate cancer. A heterodimeric peptide may capture the whole spectrum of the disease (androgen-dependent and castration-resistant prostate cancer).



**FIGURE 6.** Blocked (top) and unblocked (bottom) PET images obtained at 30 min, 1 h, and 2 h after injection of neurotensin radioligand  $^{18}\text{F}$ -DEG-VS-NT in mice bearing HT-29 tumor xenografts (NTSR<sub>1</sub>-positive human colon adenocarcinoma cells). Blocked animals received  $^{18}\text{F}$ -DEG-VS-NT coincjected with unlabeled neurotensin(8–13). (Reprinted with permission of (59).)

## CONCLUDING REMARKS

The overexpression of bombesin, neurotensin, or NPY receptors on tumors offers wide perspectives for new applications in imaging and peptide-targeted therapy in oncology.

Preliminary clinical results with the newly synthesized <sup>68</sup>Ga- or <sup>64</sup>Cu-radiolabeled bombesin analogs are promising, and we are witnessing a rapidly growing interest in GRPR targeting in prostate cancer and other GRPR-expressing tumors.

Substantial efforts have recently led to the synthesis of excellent neurotensin analogs. There is no doubt that the impact will be great, given the accumulating evidence on the role of NTSR<sub>1</sub> in breast cancer, prostate cancer, lung cancer, pancreatic adenocarcinoma, and many other tumors. The new radiolabeled NPY analogs are also promising.

In the coming years, the important challenges for successful clinical application will be to better define, within specific subtypes of tumors, which neuropeptide receptors are overexpressed and at which stage of carcinogenesis and cancer progression they are overexpressed. In this context, new classifications based on immunohistochemistry and molecular analysis must be integrated into the rational development of new neuropeptide analogs.

## ACKNOWLEDGMENT

This work was supported in part by funding from TRAIL (Translational Research and Advanced Imaging Laboratory–Bordeaux, France): ANR-10-LABX-0057-TRAIL.

## REFERENCES

1. Teunissen JJM, Kwekkeboom DJ, Valkema R, Krenning EP. Nuclear medicine techniques for the imaging and treatment of neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer*. 2011;18(suppl):S27–S51.
2. Ambrosini V, Campana D, Tomassetti P, Fanti S. <sup>68</sup>Ga-labelled peptides for diagnosis of gastroenteropancreatic NET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2012;39(suppl 1):S52–S60.
3. Pfeifer A, Knigge U, Mortensen J, et al. Clinical PET of neuroendocrine tumors using <sup>64</sup>Cu-DOTATATE: first-in-humans study. *J Nucl Med*. 2012;53:1207–1215.
4. Taïeb D, Neumann H, Rubello D, Al-Nahhas A, Guillet B, Hindie E. Modern nuclear imaging for paragangliomas: beyond SPECT. *J Nucl Med*. 2012;53:264–274.
5. Wild D, Mäcke HR, Christ E, Gloor MD, Reubi JC. Glucagon-like peptide-1 receptor scans to localize occult insulinomas. *N Engl J Med*. 2008;359:766–768.
6. Waser B, Rehmman R, Sanchez C, Fourmy D, Reubi JC. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptors in most gastroenteropancreatic and bronchial neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:482–488.
7. Waser B, Beetschen K, Pellegata NS, Reubi JC. Incretin receptors in non-neoplastic and neoplastic thyroid C cells in rodents and humans: relevance for incretin-based diabetes therapy. *Neuroendocrinology*. 2011;94:291–301.
8. Gourni E, Waser B, Clerc P, Fourmy D, Reubi JC, Maecke HR. The glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor: a novel target for neuroendocrine tumor imaging—first preclinical studies. *J Nucl Med*. 2014;55:976–982.
9. Pulkkinen V, Ezer S, Sundman L, et al. Neuropeptide S receptor 1 (NPSR1) activates cancer-related pathways and is widely expressed in neuroendocrine tumors. *Virchows Arch*. 2014;465:173–183.
10. Audet M, Bouvier M. Restructuring G-protein-coupled receptor activation. *Cell*. 2012;151:14–23.
11. Gonzalez N, Moody TW, Igarashi H, Ito T, Jensen RT. Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2008;15:58–64.
12. Alexander SP, Benson HE, Faccenda E, et al. The concise guide to PHARMACOLOGY 2013/14: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol*. 2013;170:1459–1581.
13. White JF, Noïnaj N, Shibata Y, et al. Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature*. 2012;490:508–513.
14. Wu Z, Martinez-Fong D, Trédaniel J, Forgez P. Neurotensin and its high affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:184.

15. Brothers SP, Wahlestedt C. Therapeutic potential of neuropeptide Y (NPY) receptor ligands. *EMBO Mol Med*. 2010;2:429–439.
16. Souazé F. Expression of neurotensin and NT<sub>1</sub> receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. *Cancer Res*. 2006;66:6243–6249.
17. Dupouy S, Viardot-Foucault V, Alifano M, et al. The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression. *PLoS ONE*. 2009;4:e4223.
18. Evers BM. Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues. *Peptides*. 2006;27:2424–2433.
19. Gugger M, Reubi JC. Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. *Am J Pathol*. 1999;155:2067–2076.
20. Dalm S, Sieuwerts A, Melis M, Martens J, De Jong M. GRP-R expression in breast cancer as target for nuclear imaging and therapy: correlation with ER [abstract OP101]. Paper presented at: Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine; Lyon, France; October 20, 2013.
21. Reubi JC, Gugger M, Waser B. Y<sub>1</sub>-mediated effect of neuropeptide Y in cancer: breast carcinomas as targets. *Cancer Res*. 2001;61:4636–4641.
22. Medeiros PJ, Jackson DN. Neuropeptide Y Y<sub>5</sub>-receptor activation on breast cancer cells acts as a paracrine system that stimulates VEGF expression and secretion to promote angiogenesis. *Peptides*. 2013;48:106–113.
23. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406:747–752.
24. Markwalder R, Reubi JC. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. *Cancer Res*. 1999;59:1152–1159.
25. Ananias HJ, van den Heuvel MC, Helfrich W, de Jong IJ. Expression of the gastrin-releasing peptide receptor, the prostate stem cell antigen and the prostate-specific membrane antigen in lymph node and bone metastases of prostate cancer. *Prostate*. 2009;69:1101–1108.
26. Beer M, Montani M, Gerhardt J, et al. Profiling gastrin-releasing peptide receptor in prostate tissues: clinical implications and molecular correlates. *Prostate*. 2012;72:318–325.
27. Körner M, Waser B, Rehmman R, Reubi JC. Early over-expression of GRP receptors in prostatic carcinogenesis. *Prostate*. 2014;74:217–224.
28. Sehgal I, Powers S, Huntley B, Powis G, Pittelkow M, Maihle NJ. Neurotensin is an autocrine trophic factor stimulated by androgen withdrawal in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:4673–4677.
29. Valerie NC, Casarez EV, Dasilva JO, et al. Inhibition of neurotensin receptor 1 selectively sensitizes prostate cancer to ionizing radiation. *Cancer Res*. 2011;71:6817–6826.
30. Taylor RM, Severns V, Brown DC, Bisoffi M, Sillerud LO. Prostate cancer targeting motifs: expression of α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>, neurotensin receptor 1, prostate specific membrane antigen, and prostate stem cell antigen in human prostate cancer cell lines and xenografts. *Prostate*. 2012;72:523–532.
31. Ruscica M, Dozio E, Boghossian S, et al. Activation of the Y<sub>1</sub> receptor by neuropeptide Y regulates the growth of prostate cancer cells. *Endocrinology*. 2006;147:1466–1473.
32. Massoner P, Kugler KG, Unterberger K, et al. Characterization of transcriptional changes in ERG rearrangement-positive prostate cancer identifies the regulation of metabolic sensors such as neuropeptide Y. *PLoS ONE*. 2013;8:e55207.
33. Jadvar H. Molecular imaging of prostate cancer with PET. *J Nucl Med*. 2013;54:1685–1688.
34. Alifano M, Souazé F, Dupouy S, et al. Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16:4401–4410.
35. Moody TW, Chan DC, Mantey SA, Moreno P, Jensen RT. SR48692 inhibits non-small cell lung cancer proliferation in an EGF receptor-dependent manner. *Life Sci*. 2014;100:25–34.
36. Alifano M, Loi M, Camilleri-Broet S, Dupouy S, Régnaud JF, Forgez P. Neurotensin expression and outcome of malignant pleural mesothelioma. *Biochimie*. 2010;92:164–170.
37. Mattei J, Achcar RD, Cano CH, Macedo BR, Meurer L, Batlle BS. Gastrin-releasing peptide receptor expression in lung cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138:98–104.
38. Carney DN, Cuttitta F, Moody TW, Minna JD. Selective stimulation of small cell lung cancer clonal growth by bombesin and gastrin-releasing peptide. *Cancer Res*. 1987;47:821–825.
39. Sarvi S, Mackinnon AC, Avlonitis N, et al. CD133+ cancer stem-like cells in small cell lung cancer are highly tumorigenic and chemoresistant but sensitive to a novel neuropeptide antagonist. *Cancer Res*. 2014;74:1554–1565.
40. Reck M, Heigener DF, Mok T, Soria JC, Rabe KF. Management of non-small-cell lung cancer: recent developments. *Lancet*. 2013;382:709–719.
41. Iwase K, Evers BM, Hellmich MR, et al. Inhibition of neurotensin-induced pancreatic carcinoma growth by a nonpeptide neurotensin receptor antagonist, SR48692. *Cancer*. 1997;79:1787–1793.

42. Reubi JC, Waser B, Friess H, Buchler M, Laissue J. Neurotensin receptors: a new marker for human ductal pancreatic adenocarcinoma. *Gut*. 1998;42:546–550.
43. Shimizu S, Tsukada J, Sugimoto T, et al. Identification of a novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinomas: a role for the neurotensin-neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway. *Int J Cancer*. 2008;123:1816–1823.
44. Gui X, Guzman G, Dobner PR, Kadkol SS. Increased neurotensin receptor-1 expression during progression of colonic adenocarcinoma. *Peptides*. 2008;29:1609–1615.
45. Marrone BF, Meurer L, Moretto A, Kleina W, Schwartzmann G. Expression of gastrin-releasing peptide receptor in patients with cutaneous malignant melanoma. *Clin Exp Dermatol*. 2013;38:707–712.
46. Körner M, Waser B, Reubi JC. High expression of neuropeptide Y<sub>1</sub> receptors in Ewing sarcoma tumors. *Clin Cancer Res*. 2008;14:5043–5049.
47. Lu C, Everhart L, Tilan J, et al. Neuropeptide Y and its Y<sub>2</sub> receptor: potential targets in neuroblastoma therapy. *Oncogene*. 2010;29:5630–5642.
48. Fleischmann A, Waser B, Reubi JC. Overexpression of gastrin-releasing peptide receptors in tumor-associated blood vessels of human ovarian neoplasms. *Cell Oncol*. 2007;29:421–433.
49. Cascato R, Maina T, Nock B, et al. Bombesin receptor antagonists may be preferable to agonists for tumor targeting. *J Nucl Med*. 2008;49:318–326.
50. Wild D, Fani M, Fischer R, et al. Comparison of somatostatin receptor agonist and antagonist for peptide receptor radionuclide therapy: a pilot study. *J Nucl Med*. 2014;55:1248–1252.
51. Morgat C, Hindié E, Mishra AK, Allard M, Fernandez P. Gallium-68: chemistry and radiolabeled peptides exploring different oncogenic pathways. *Cancer Biother Radiopharm*. 2013;28:85–97.
52. Van de Wiele C, Phonteyne P, Pauwels P, et al. Gastrin-releasing peptide receptor imaging in human breast carcinoma versus immunohistochemistry. *J Nucl Med*. 2008;49:260–264.
53. Kähkönen E, Jambor I, Kempainen J, et al. In vivo imaging of prostate cancer using [<sup>68</sup>Ga]-labeled bombesin analog BAY86-7548. *Clin Cancer Res*. 2013;19:5434–5443.
54. Wieser G, Mansi R, Grosu AL, et al. Positron emission tomography (PET) imaging of prostate cancer with a gastrin releasing peptide receptor antagonist: from mice to men. *Theranostics*. 2014;4:412–419.
55. Buchegger F, Bonvin F, Kosinski M, et al. Radiolabeled neurotensin analog, <sup>99m</sup>Tc-NT-XI, evaluated in ductal pancreatic adenocarcinoma patients. *J Nucl Med*. 2003;44:1649–1654.
56. García-Garayoa E, Bläuenstein P, Blanc A, Maes V, Tourwé D, Schubiger PA. A stable neurotensin-based radiopharmaceutical for targeted imaging and therapy of neurotensin receptor-positive tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2009;36:37–47.
57. Alshoukr F, Prignon A, Brans L, et al. Novel DOTA-neurotensin analogues for <sup>111</sup>In scintigraphy and <sup>68</sup>Ga PET imaging of neurotensin receptor-positive tumors. *Bioconjug Chem*. 2011;22:1374–1385.
58. Maschauer S, Ruckdeschel T, Tripal P, et al. In vivo monitoring of the antiangiogenic effect of neurotensin receptor-mediated radiotherapy by small-animal positron emission tomography: a pilot study. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2014;7:464–481.
59. Wu Z, Li L, Liu S, et al. Facile preparation of a thiol-reactive <sup>18</sup>F-labeling agent and synthesis of <sup>18</sup>F-DEG-VS-NT for PET imaging of a neurotensin receptor-positive tumor. *J Nucl Med*. 2014;55:1178–1184.
60. Khan IU, Zwanziger D, Böhme I, et al. Breast cancer diagnosis by neuropeptide Y analogues: from synthesis to clinical application. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010;49:1155–1158.
61. Shrivastava A, Wang SH, Raju N, Gierach I, Ding H, Tweedle MF. Heterobivalent dual-target probe for targeting GRP and Y<sub>1</sub> receptors on tumor cells. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23:687–692.
62. Durkan K, Jiang Z, Rold TL, et al. A heterodimeric [RGD-Glu-[<sup>64</sup>Cu-NO<sub>2</sub>A]-6-Ahx-RM2] α<sub>5</sub>β<sub>3</sub>GRPr-targeting antagonist radiotracer for PET imaging of prostate tumors. *Nucl Med Biol*. 2014;41:133–139.
63. Zanzonico P. Positron emission tomography: a review of basic principles, scanner design and performance, and current systems. *Semin Nucl Med*. 2004;34:87–111.

## Deuxième partie

---

### Mise au point d'une plate-forme de radiomarquage au $^{68}\text{Ga}$ : validation méthodologique et clinique

Article 3: A phantom-based method to standardize dose-calibrators for new  $\beta^+$ -emitters. *Nucl Med Commun*. 2015;36(2):201-6.

**Clément Morgat**, Joachim Mazère, Philippe Fernandez, Sébastien Buj, Delphine Vimont, Jürgen Schulz, Frédéric Lamare.

Article 4: Evaluation of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT for the detection of duodenopancreatic neuroendocrine tumors in patients with MEN1. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. En révision.

**Clément Morgat**, Fritz-Line Vélayoudom-Céphise, Paul Schwartz, Martine Guyot, Delphine Gaye, Delphine Vimont, Jürgen Schulz, Joachim Mazère, Marie-Laure Nunès, Elif Hindié, Philippe Fernandez, Antoine Tabarin.



L'imagerie TEP avec les nouveaux analogues de la somatostatine (DOTATOC, DOTATATE ou DOTANOC) radiomarqués au  $^{68}\text{Ga}$  est aujourd'hui largement utilisée en Europe. La disponibilité accrue des générateurs  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ , nous a également incité à développer l'imagerie au  $^{68}\text{Ga}$  à Bordeaux. Dans cette optique, j'ai bénéficié d'une formation d'une semaine à Uppsala (Suède) en 2011 en présence d'experts reconnus dans le domaine de la radiochimie du  $^{68}\text{Ga}$  (Dr I. Velikyan). A l'issue de cette formation, les objectifs de notre équipe étaient de transposer l'expérience du centre d'Uppsala, concernant l'imagerie TEP au  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC, sur notre site Bordelais.

Dans le **Chapitre 1**, nous présentons la mise au point et la validation méthodologique de cette plate-forme de radiomarquage au  $^{68}\text{Ga}$  qui est un pré-requis indispensable à l'obtention des autorisations réglementaires pour la conduite d'un essai clinique au  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC.

Dans le **Chapitre 2**, nous présentons les résultats de l'essai clinique GALTEP qui a été mené sur 19 patients NEM-1 atteints de tumeurs neuro-endocrines duodéno pancréatiques.

Enfin, dans le **Chapitre 3**, nous présentons les résultats préliminaires de la recherche de sst2 dans des lymphomes de Hodgkin pouvant élargir le champ d'application des analogues de la somatostatine radiomarqués au  $^{68}\text{Ga}$ .

# Chapitre 1

---

## Validation méthodologique de la plate-forme de radiomarquage au $^{68}\text{Ga}$

En préambule à l'utilisation du  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC dans le cadre d'un essai clinique, le premier aspect de ce travail de Thèse, a consisté à mettre en place une plate-forme opérationnelle de radiomarquage au  $^{68}\text{Ga}$ . Pour cela, nous avons caractérisé et validé les matières premières (solution de chlorure de  $^{68}\text{Ga}$  pour radiomarquage mais aussi du DOTATOC), substance de référence ( $^{\text{nat}}\text{Ga}$ -DOTATOC), stratégie de radiomarquage et produit fini ( $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC). En outre, avant d'envisager l'utilisation de biomolécules marquées au  $^{68}\text{Ga}$  chez l'Homme, l'étalonnage des instruments de mesure, notamment de l'activimètre, est une nécessité.

### *Matériels et méthodes*

#### **Caractérisation de la matière première solution de chlorure de $^{68}\text{Ga}$ pour radiomarquage**

Le  $^{68}\text{Ga}$  est produit par un générateur  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  IASON® (Cyclotron Co., Ltd, Obninsk, Russie) où le  $^{68}\text{Ge}$  est adsorbé sur une matrice inorganique à base de  $\text{TiO}_2$ . L'activité nominale de  $^{68}\text{Ge}$  chargée sur la colonne du générateur est de 40 mCi (1480 MBq le 27/05/2013). Les différentes étapes pour la production, la purification et la concentration de la solution de  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  en vue de la caractérisation et de la validation du générateur  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  sont présentées ci-dessous.

#### Elution du générateur

Le générateur isotopique  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  est élué avec 6,2mL d'une solution d'HCl 0,1 M conformément aux instructions du fournisseur.

#### Acidification de l'éluat

Pour concentrer et purifier l'éluat, la concentration en ions  $[\text{Cl}^-]$  est importante pour la séparation du  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  et du  $^{68}\text{Ge}^{4+}$ . En effet, le  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  est fortement adsorbé sur la résine échangeuse d'anions (sous forme de chloro-complexes anioniques  $[\text{GaCl}_4]^-$  et  $[\text{GaCl}_6]^{3-}$ ) pour une concentration en  $[\text{Cl}^-] > 3 \text{ M}$  alors que le  $^{68}\text{Ge}^{4+}$  et les autres impuretés métalliques ne sont pratiquement pas adsorbées pour une concentration en  $[\text{Cl}^-] < 5 \text{ M}$ . L'éluat du générateur  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  est ainsi acidifié pour augmenter la concentration en  $[\text{Cl}^-]$  jusqu'à une valeur proche de 4 M, avec 5 mL d'HCl ultrapur 30 % (72).

#### Pré-purification/concentration

Cette solution est ensuite transférée sur une cartouche échangeuse d'anions (SPE cartridge Chromafix 30-PS-HCO<sub>3</sub>) retenant le <sup>68</sup>Ga par échange d'anions hydrogénocarbonates contre les chloro-complexes de <sup>68</sup>Ga. L'excès d'ions H<sup>+</sup> est éliminé en lavant la cartouche avec 0,5 mL de NaCl 5 M. Le chlorure de <sup>68</sup>Ga est ensuite élué avec de petits volumes d'eau dé-ionisée (4 x 50 µL)(73,74).

#### Lots de validations du générateur <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga

Pour rester fidèles aux conditions de radiosynthèse nous avons caractérisé et validé l'éluat du générateur après purification/concentration sur cartouche anionique et conformément à la monographie de la Pharmacopée Européenne "Solution de chlorure de <sup>68</sup>Ga pour radiomarquage".

### **Caractérisation de la matière première DOTATOC**

En raison de la courte période physique du <sup>68</sup>Ga (67,7 min), la préparation du <sup>68</sup>Ga-DOTATOC est réalisée extemporanément le jour de l'injection et consiste en un radiomarquage du précurseur peptidique DOTATOC par du <sup>68</sup>Ga, dans des conditions respectant les Bonnes Pratiques de Préparation (BPP, version 2011). En tant qu'ingrédient pharmaceutique actif (API), le DOTATOC nécessite une validation en termes de qualité, *a fortiori* s'il ne dispose pas d'un certificat GMP (*Good Manufacturing Practices*). Néanmoins, à ce jour, il n'existe pas de monographie à la Pharmacopée européenne décrivant les critères de qualité en vigueur pour cet API. A ce titre, le DOTATOC a fait l'objet d'une validation pharmaceutique interne.

Une étude expérimentale, (en collaboration avec la Pharmacie à Usage Intérieur de l'Hôpital Haut Lévêque, l'INSERM U103, Groupe Pharmacocinétique/Pharmacodynamie et l'Unité CNRS, UMR5248, CGFB, Université de Bordeaux), a été réalisée sur trois échantillons de DOTATOC (Anaspec, Inc) préalablement répartis en flacons unitaires dans un environnement de classe C puis conservés à -20°C. Les contrôles qualité suivants ont été effectués: caractères organoleptiques par inspection visuelle, identification de la séquence d'acides aminés après réduction du pont disulfure/alkylation des cystéines par Chromatographie Liquide Capillaire-Ionisation ElectroSpray couplée à la Spectrométrie de Masse Quadripôle-Temps de Vol (CapLC-ESI-qTOF), pureté chimique par Chromatographie Liquide Haute Performance-UV (HPLC-UV) et CapLC-UV, détermination de la quantité pondérale engagée dans le marquage après réalisation d'une gamme étalon en HPLC-UV et stabilité en solution aqueuse jusqu'à J<sub>180</sub> par HPLC-UV (exprimé en rapport d'Aire Sous la Courbe (ASC)).

Les conditions HPLC sont les suivantes : Colonne Luna C18 (250 mm x 4,6 mm - 5 µm) en phase inverse avec un système de gradient et un débit de 1 mL/min, longueur d'onde λ = 280 nm.

Temps (min)	Eau/TFA 0,1%	Acétonitrile
0 – 2 min	80%	20%
2 – 10 min	20%	80%
10 – 12 min	20%	80%
12 – 14 min	80%	20%

## Caractérisation de la substance de référence <sup>nat</sup>Ga-DOTATOC

L'utilisation d'une référence froide, c'est-à-dire la même molécule que celle injectée mais marquée avec un isotope stable, est indispensable pour les contrôles de qualités pré-libératoires des médicaments radiopharmaceutiques. En effet, elle permet d'une part d'identifier le pic d'intérêt sur le chromatogramme UV en HPLC et à calculer la quantité pondérale de <sup>68</sup>Ga-DOTATOC injectée et d'autre part à calculer l'activité spécifique. La quantité pondérale est une exigence de la monographie de la Pharmacopée Européenne alors que l'activité spécifique (MBq/μmol) est une grandeur indispensable pour déterminer *in vivo* l'occupation des récepteurs. Cependant, le <sup>nat</sup>Ga-DOTATOC n'est pas disponible commercialement. Nous l'avons donc synthétisé et validé pour un usage *in vitro* (il n'est jamais injecté à l'Homme) selon les conditions de synthèse suivantes :

A 1 mg de <sup>nat</sup>Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> est ajouté 1 mg de DOTATOC. Le milieu réactionnel est chauffé à 100°C à l'aide de micro-ondes et sous agitation pendant 30 minutes. Après refroidissement à température ambiante, le mélange est déposé sur une Sep-Pak préalablement activée par 5 mL d'éthanol absolu et 20 mL d'H<sub>2</sub>O. La Sep-Pak est ensuite lavée avec 10 mL d'H<sub>2</sub>O pour éliminer le nitrate de <sup>nat</sup>Ga n'ayant pas réagi. Le <sup>nat</sup>Ga-DOTATOC est élué de la Sep-Pak par 5mL d'éthanol. Le produit est enfin lyophilisé pour éliminer les traces d'H<sub>2</sub>O et d'éthanol.

Les contrôles de qualités suivants sont effectués sur la solution de référence de <sup>nat</sup>Ga-DOTATOC :

Spectrométrie de masse : détermination du profil isotopique en MALDI-TOF en mode positif.

Caractères organoleptiques : La solution de référence de <sup>nat</sup>Ga-DOTATOC doit être limpide et incolore par contrôle visuel.

Pureté chimique: La pureté chimique de la solution de référence de <sup>nat</sup>Ga-DOTATOC, déterminée en HPLC-UV, doit être ≥ 95 %.

Une gamme étalon est par ailleurs réalisée avec les conditions HPLC suivantes : Colonne VIDAC C<sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm - 5μm) en phase inverse avec un système de gradient et un débit de 1 mL/min, longueur d'onde λ = 220 nm. Le même gradient que pour la caractérisation de la matière première DOTATOC, a été utilisé.

### Lots de validation du produit fini <sup>68</sup>Ga-DOTATOC

Le milieu réactionnel est chauffé à 95°C pendant 5 minutes à l'aide de micro-ondes. Le <sup>68</sup>Ga-DOTATOC est ensuite purifié par une cartouche C<sub>18</sub> (Sep-Pak Light C<sub>18</sub>, WAT023501 Waters). Le produit est ensuite élué de la cartouche avec 1 mL d'éthanol absolu et formulé à 10 mL avec du PBS, de l'eau et du NaCl 0,9 % (pH 7,4). La solution finale est stérilisée grâce à un filtre 0,22 μm.

Contrôles pré-libératoires effectués en routine:

- Caractères organoleptiques : solution limpide, incolore et exempte de particules
- pH : 4 – 8

- Pureté radiochimique:  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC  $> 91 \%$ ,  $^{68}\text{Ga}$  sous forme colloïdale et  $^{68}\text{Ga}^{3+} < 5 \%$ .
- Quantité pondérale de  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC:  $\leq 50 \mu\text{g}$
- Quantité pondérale de DOTATOC:  $\leq 50 \mu\text{g}$
- Activité volumique : 5 – 60MBq/mL à la date et l'heure de calibration (t+1h après répartition et filtration stérilisante de la solution mère).
- Activité spécifique : 1,5 – 30GBq/ $\mu\text{mol}$  à la date et l'heure de calibration(t+1h après répartition et filtration stérilisante de la solution mère).
- Test d'intégrité du filtre :  $> 3,45$  bars
- Identification du radionucléide : période physique = 62 – 74 min
- Pureté radionucléidique : test A  $\geq 99,9 \%$ . Les énergies des pics d'intérêt sont 511 keV et 1077 keV. Un pic somme peut apparaître à 1022 keV en fonction de la géométrie de comptage. En raison de la très faible probabilité d'apparition du pic énergétique à 1,883MeV ( $\sim 0,14\%$ ), ce dernier n'est pas mentionné dans les spécifications.

Contrôles post-libératoires effectués en routine:

- Pureté radionucléidique : test B  $\geq 99,999 \%$ . Pour la détection et la quantification du  $^{68}\text{Ge}$  et d'autres impuretés émettant des rayonnements  $\gamma$ , la solution à examiner doit avoir décaï pendant au moins 48 h ( $> 10$  demi-vie du  $^{68}\text{Ga}$ ). La radioactivité totale due au  $^{68}\text{Ge}$  et aux autres impuretés émettrices  $\gamma$  ne doit pas représenter plus de 0,001% de la radioactivité totale.
- Stérilité : mise en culture sur bouillons spécifiques pour bactéries aérobies, anaérobies et champignons. Absence de développement.
- Endotoxines bactériennes : test LAL  $< 175$  UI/V

Contrôles supplémentaires réalisés sur le produit fini lors des 3 lots de validation :

- Les solvants résiduels mentionnés ci-dessous sont recherchés et dosés si nécessaire dans le produit fini (dosés à l'Institut des Sciences Analytiques du Service Central d'Analyses du CNRS à Villeurbanne).

Acétonitrile

DMF

Pyridine

- L'éthanol est recherché et dosé à l'Institut des Sciences Analytiques du Service Central d'Analyses du CNRS à Villeurbanne :  $\leq 10 \%$  (V/V) et maximum 2,5 g par administration.
- Etude de toxicité aigüe sur souris sur un lot dédié (Cette étude a été sous-traitée au CERB Centre de Recherches Biologiques) et ne sera donc pas détaillée).

### Caractérisation de la matière première solution de chlorure de $^{68}\text{Ga}$ pour radiomarquage

$^{68}\text{GaCl}_3$					
Contrôle de qualité	Méthodes	Spécifications	Lot 13-06	Lot 13-07	Lot 13-08
Activité après cartouche anionique	Activimètre	N.A	406,4 MBq	431,8 MBq	365,6 MBq
Caractères organoleptiques	Contrôle visuel	Limpide et incolore	Limpide et incolore	Limpide et incolore	Limpide et incolore
pH	Papier indicateur de pH	$\leq 2$	[0,5 – 1]	[0,5 – 1]	[0,5 – 1]
Identification du radionucléide $t_{1/2}$ (min)	Activimètre	62-74 min	68,03 min	68,07 min	67,86 min
Pureté radionucléidique	Spectrométrie $\gamma$	$\geq 99,9 \%$	100 %	100 %	100 %
	Activimètre	$\geq 99,999 \%$	100 %	100 %	100 %
Pureté radiochimique	CCM	$^{68}\text{Ga}$ -DTPA $\geq 95\%$	95,31 %	96,24 %	95,94 %
		$^{68}\text{Ga}(\text{OH}_3) \geq 95 \%$	97,75 %	97,45 %	98,30 %
Teneur en $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Zn}^{2+}$	ICP-AES	10 $\mu\text{g}/\text{GBq}$	0,71 $\mu\text{g}/\text{GBq}$	9,80 $\mu\text{g}/\text{GBq}$	2,65 $\mu\text{g}/\text{GBq}$
Endotoxines bactériennes	Test LAL	$< 175\text{UI}/\text{V}$	$< 10\text{UI}/\text{V}$	$< 20\text{UI}/\text{V}$	$< 15\text{UI}/\text{V}$

Tableau 1: lots de validation de la solution de chlorure de  $^{68}\text{Ga}$

### Caractérisation de la matière première DOTATOC

Le DOTATOC est une matière première limpide et incolore après reconstitution en solution aqueuse. La séquence peptidique expérimentale déterminée à l'aide du logiciel MS-product<sup>®</sup> à partir des fragments peptidiques expérimentaux est conforme à la séquence théorique. La pureté chimique est toujours  $> 99 \%$  par la mise en évidence d'un seul pic au temps de rétention attendu de 5,1 min. **Figure 8.**



Figure 8: Chromatogramme UV (280 nm) de la matière première DOTATOC

La gamme étalon (**Figure 9**) est réalisée avec un excellent coefficient de corrélation ( $R^2 = 0,9990$ ) et la quantité pondérale de DOTATOC engagée dans la réaction de radiomarquage au  $^{68}\text{Ga}$  est de  $55,00 \pm 0,48 \mu\text{g}$ . Cette donnée est importante pour quantifier la présence de DOTATOC dans le produit fini. Enfin, la matière première est stable en solution aqueuse jusqu'à  $J_{180}$  ( $\text{ASC}_{J180} / \text{ASC}_{J0} > 98 \%$ ). Ces résultats valident donc l'utilisation du DOTATOC et garantissent la qualité ultérieure du produit fini  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC.

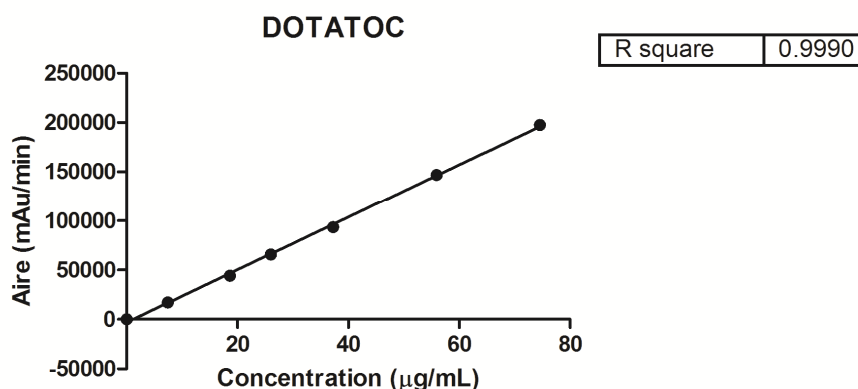


Figure 9: Gamme étalon du DOTATOC

### Caractérisation de la substance de référence $^{\text{nat}}\text{Ga}$ -DOTATOC

La solution de  $^{\text{nat}}\text{Ga}$ -DOTATOC est limpide et incolore et la pureté chimique est toujours  $> 95 \%$ . Le temps de rétention est de 5,5 min (**Figure10**).

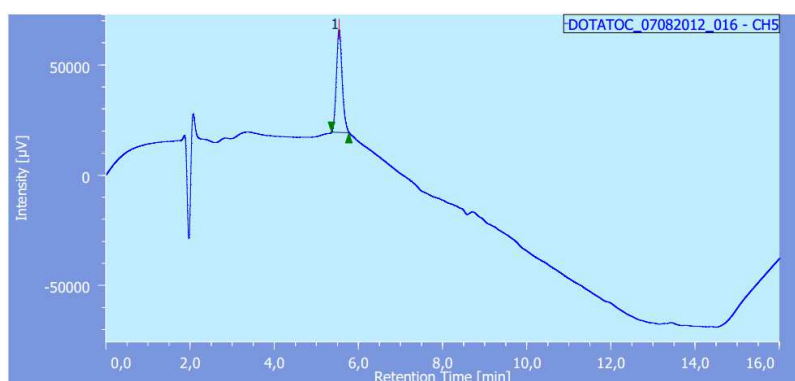


Figure 10: Chromatogramme UV (220 nm) du  $^{\text{nat}}\text{Ga}$ -DOTATOC

La gamme étalon est réalisée avec un excellent coefficient de corrélation ( $R^2 = 0,9997$ )(Figure 11).

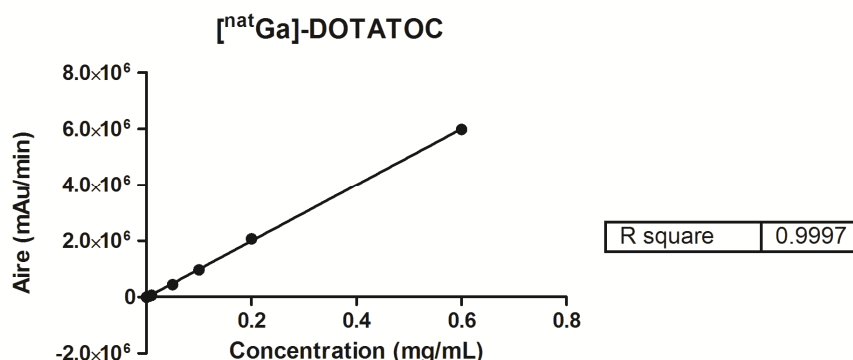


Figure 11: Gamme étalon de la solution de référence  $^{nat}\text{Ga}$ -DOTATOC

La solution de référence  $^{nat}\text{Ga}$ -DOTATOC est donc conforme aux spécifications internes.

Les spécifications sont moins exigeantes que pour la matière première DOTATOC et le produit fini  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC car il est limité à un usage *in vitro*. Il n'est jamais injecté à l'Homme.

### Lots de validation du produit fini $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC

Un rendement de radiomarquage d'environ 30-35 %, non corrigé de la décroissance, avec une activité spécifique de 2-4 GBq/ $\mu\text{mol}$ , 30 minutes après la fin du radiomarquage est obtenu avec 50  $\mu\text{g/mL}$  de DOTATOC. Le temps total de préparation, incluant les contrôles de qualité, est de 75 minutes et nécessite l'intervention d'un radiochimiste et d'un radiopharmacien. Les analyses HPLC et CCM indiquent que la pureté radiochimique du  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC est toujours > 95 %. Les chromatogrammes radio et UV du  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC sont présentés dans la **Figure 12**. Le temps de rétention du  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC est de 5,5 min. Le  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC est stérile et dépourvu de pyrogènes (< 5 EU/mL).

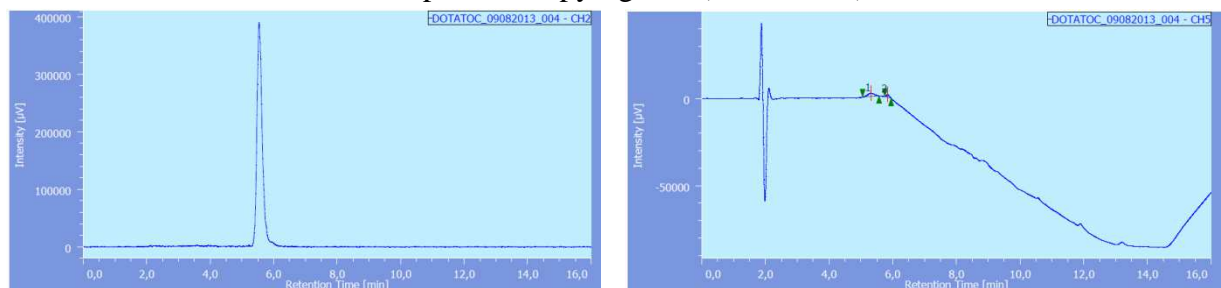


Figure 12 : Chromatogrammes radio (gauche) et UV (droite)(220 nm) du produit fini  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC

Les résultats de 3 lots de validation du  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC sont présentés dans le **Tableau 2** ci dessous.



<i>Contrôles de qualité</i>	<i>Méthodes</i>	<i>Spécifications</i>	<i>DOTATOC 13-06</i>	<i>DOTATOC 13-07</i>	<i>DOTATOC 13-08</i>
Caractères organoleptiques	Contrôle visuel	Limpide et incolore	Limpide et incolore	Limpide et incolore	Limpide et incolore
Identification du radionucléide ( $T_{1/2}$ )	Activimètre	62 – 74 min	67,60 min	68,02 min	68,16 min
Pureté radiochimique	CCM	$^{68}\text{Ga-DOTATOC} \geq 91\%$	95,77 %	95,81 %	97,20 %
		$^{68}\text{Ga(OH)}_3$ et $^{68}\text{Ga}^{3+} \leq 5\%$	2,62 %	2,21 %	1,64 %
pH	Papier indicateur de pH	4,0– 8,0	7,0	[6,5 – 7,0]	7,0
Quantité pondérale de DOTATOC	HPLC-UV	$\leq 50 \mu\text{g}/10\text{mL}$	20,2 $\mu\text{g}/10\text{mL}$	6,86 $\mu\text{g}/10\text{mL}$	15,12 $\mu\text{g}/10\text{mL}$
Quantité pondérale de $^{68}\text{Ga-DOTATOC}$	HPLC-UV	$\leq 50 \mu\text{g}/10\text{mL}$	34,7 $\mu\text{g}/10\text{mL}$	47,7 $\mu\text{g}/10\text{mL}$	40,41 $\mu\text{g}/10\text{mL}$
Activité volumique	Activimètre	[5 – 60]MBq/mL	8,05 MBq/mL	7,95 MBq/mL	6,7 MBq/mL
Activité spécifique	HPLC-UV	[1,5 – 30]GBq/ $\mu\text{mol}$	3,97 GBq/ $\mu\text{mol}$	2,85 GBq/ $\mu\text{mol}$	2,84 GBq/ $\mu\text{mol}$
Pureté radionucléidique	Spectrométrie $\gamma$	> 99,9 % (test A)	100 %	100 %	100 %
	Activimètre	>99,999 % (test B)	100 %	100 %	100 %
Endotoxines bactériennes	Test LAL	< 17,5 UI/mL	< 3UI/mL	< 5UI/mL	< 5UI/mL
Test de stérilité	Ensemencement	Stérile	Stérile	Stérile	Stérile
Ethanol	GC-MS	< 10 % (V/V) < 2,5 g	3,3 % 0,257 g	4,4 % 0,346 g	3,5 % 0,277 g
Solvants résiduels	GC-MS-	DMF	< 0,16 mg/mL (LOD)	< 0,16 mg/mL (LOD)	< 0,16 mg/mL (LOD)
		Acétonitrile	< 0,23 mg/mL (LOD)	< 0,23 mg/mL (LOD)	< 0,23 mg/mL (LOD)
		Pyridine	< 0,06 mg/mL (LOD)	< 0,06 mg/mL (LOD)	< 0,06 mg/mL (LOD)

Tableau 2: Lots de validation du  $^{68}\text{Ga-DOTATOC}$

Les interactions contenant-contenu n'ont pas été étudiées car le produit fini est injecté immédiatement après les contrôles de qualité.

### Discussion

Au cours de ce premier travail nous avons validés 3 lots d'éluats du générateur conformément aux spécifications de la monographie de la Pharmacopée européenne (Ph. Eur 07/2013:2464) de la solution de chlorure de  $^{68}\text{Ga}$  pour radiomarquage. En Juillet 2015, un générateur  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  a obtenu une autorisation de mise sur le marché en France (Galliapharm, Eckert & Ziegler). Le fabricant garantit que l'éluat est conforme aux spécifications de la monographie de la Pharmacopée européenne (Ph. Eur 07/2013:2464) si le générateur est élué tous les jours ouvrables. Néanmoins, la méthodologie de validation décrite ci-dessus reste pertinente pour des générateurs "recherche" comme les générateurs  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$  ou  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$  par exemple.

Nous avons également validé la matière première DOTATOC utilisée pour la production du  $^{68}\text{Ga-DOTATOC}$ . De plus, nous avons établi une liste minimale de contrôles à effectuer sur une matière première non GMP ouvrant ainsi la voie à une libération paramétrique interne et une validation pharmaceutique de matières premières peptidiques pour la recherche

biomédicale. Bien que le DOTATOC soit maintenant disponible sous forme GMP, l'intérêt de valider des matières premières, en particulier si elles ne sont pas GMP, est repris par la Pharmacopée Européenne qui publiera en 2016 une monographie "précurseurs chimiques pour préparations radiopharmaceutiques". Il s'agit d'une nouvelle monographie. Actuellement les exigences relatives aux précurseurs chimiques figurent dans la monographie "Substances pour usage pharmaceutique" et dans la monographie "Préparations radiopharmaceutiques". L'objectif est de regrouper les informations sur les précurseurs chimiques au sein d'un même texte en prenant en compte l'essor de l'imagerie TEP.

Nous avons synthétisé et caractérisé le  $^{nat}\text{Ga}$ -DOTATOC, la substance de référence pour l'identification en HPLC-UV du  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC mais également pour quantifier la quantité de produit fini injecté ainsi que l'activité spécifique qui permet d'accéder à l'occupation des récepteurs. La monographie de la Pharmacopée Européenne du  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC ne préconise pas l'utilisation de cette substance de référence. En effet, dans la monographie l'identification UV est réalisée grâce à la matière première DOTATOC ainsi qu'à l'aide d'une substance apparentée, l'octréotide. De plus, aucune exigence concernant l'activité spécifique n'est mentionnée. Conceptuellement, l'utilisation de la même substance mais marquée avec l'isotope froid est plus rigoureuse car seules les propriétés physiques diffèrent entre le  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC et le  $^{nat}\text{Ga}$ -DOTATOC. L'identification UV devient irréfutable et il est aisé de déterminer l'activité spécifique et la quantité de produit fini injecté

La solution de  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC est conforme aux spécifications de la monographie de la Pharmacopée Européenne 01/2013:2482 du  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC et aux spécifications internes.

### *Conclusion*

L'ensemble de ces données a permis l'acceptation et la réalisation de l'essai clinique de phase II "GALTEP" par l'ANSM (n° EudraCT 2013-003927-12) et le CPP (n° 2013/87). Il est raisonnable de penser que la méthodologie de validation pharmaceutique (matières premières et produit fini) employée au cours de ce travail est aisément transposable pour le dépôt d'autres essais cliniques à base de peptides radiomarqués au  $^{68}\text{Ga}$ .

### **Calibration de l'activimètre**

La plate-forme de radiomarquage étant maintenant pleinement opérationnelle, avant d'envisager l'utilisation du  $^{68}\text{Ga}$  en essai clinique nous nous sommes intéressés à la calibration des instruments de mesure dont l'activimètre. En effet, les activimètres disponibles dans les services de médecine nucléaire ne sont pas calibrés pour une mesure précise et fiable d'activités de  $^{68}\text{Ga}$  et plus généralement pour la mesure des activités des émetteurs  $\beta^+$ , à l'exception du  $^{18}\text{F}$ . Nous avons donc développé et appliqué une méthodologie permettant de répondre à cette problématique (75).

Article 3: A phantom-based method to standardize dose-calibrators for new  $\beta^+$ -emitters. *Nucl Med Commun*. 2015;36(2):201-6.

**Clément Morgat**, Joachim Mazère, Philippe Fernandez, Sébastien Buj, Delphine Vimont, Jürgen Schulz, Frédéric Lamare.

# A phantom-based method to standardize dose-calibrators for new $\beta^+$ -emitters

Clément Morgat<sup>a,b,c</sup>, Joachim Mazère<sup>a,b,c</sup>, Philippe Fernandez<sup>a,b,c</sup>, Sébastien Buj<sup>a</sup>, Delphine Vimont<sup>b,c</sup>, Jürgen Schulz<sup>b,c</sup> and Frédéric Lamare<sup>a,b,c</sup>

Quantitative imaging with PET requires accurate measurements of the amount of radioactivity injected into the patient and the concentration of radioactivity in a given region. Recently, new positron emitters, such as  $^{124}\text{I}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{82}\text{Rb}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ , and  $^{64}\text{Cu}$ , have emerged to promote PET development, but standards are still largely lacking. Therefore, we propose to validate a simple, robust, and replicable methodology, not requiring the use of any standards, to accurately calibrate a dose-calibrator for any  $\beta^+$ -emitter. On the basis of  $^{18}\text{F}$  cross-calibration, routinely performed with fluorine-18-fluorodeoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) in nuclear medicine departments, a methodology was developed using  $\beta^+$ -emitting phantoms to cross-calibrate the dose-calibrator for measuring the activity of positron emitters and quantifying the standardized uptake value (SUV).  $^{68}\text{Ga}$  phantoms filled with activities measured with various dose-calibrator settings were imaged to establish calibration curves (SUV values as a function of the dose-calibrator settings) and to identify the setting value, yielding an SUV value of 1.00 g/ml, reflecting an accurate measurement of  $^{68}\text{Ga}$  activity. Activities measured with

the identified setting were finally checked with a  $\gamma$ -counter. The setting of  $772 \pm 1$  was identified as ensuring that the studied dose-calibrator is correctly calibrated for  $^{68}\text{Ga}$  to ensure an SUV value of  $1.00 \pm 0.01$  g/ml.  $\gamma$ -Ray spectrometry confirmed the accurate measurement of  $^{68}\text{Ga}$  activities by the dose-calibrator (relative error of  $2.9 \pm 1.5\%$ ). We have developed a phantom-based method to accurately standardize dose-calibrators for any  $\beta^+$ -emitter, without any standards. *Nucl Med Commun* 00:000–000 © 2014 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Nuclear Medicine Communications 2014, 00:000–000

Keywords: calibration, dose-calibrator, PET, positron emitter

<sup>a</sup>Bordeaux University Hospital Center, Nuclear Medicine Department, Haut-Levêque Hospital, <sup>b</sup>University of Bordeaux, INCIA, UMR 5287 and <sup>c</sup>CNRS, INCIA, UMR 5287, Bordeaux, France

Correspondence to Clément Morgat, PharmD, Bordeaux University Hospital Center, Haut-Levêque Hospital, Avenue de Magellan, 33600 Pessac, Bordeaux, France

Tel: +33 5 57 65 64 08; fax: +33 5 57 65 68 39; e-mail: clement.morgat@chu-bordeaux.fr

Received 8 August 2014 Accepted 11 September 2014

## Background

Because of its high sensitivity for the detection of a small amount of radioactivity emitted by  $\beta^+$ -radiolabeled tracers and the possibility of quantification, PET using  $^{18}\text{F}$  radionuclide is nowadays an unquestionable tool for the diagnosis and therapeutic follow-up of numerous tumors. To further promote the development of PET molecular imaging, several new  $\beta^+$ -emitters have been produced during the last decades, including  $^{124}\text{I}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{82}\text{Rb}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ , and  $^{64}\text{Cu}$ , which have already been used in several human clinical trials [1–6]. For successful clinical applications of PET radiopharmaceuticals, one prerequisite is to calibrate dose-calibrators to avoid errors on the injected activity measurement, resulting in a wrong quantification and interpretation of the reconstructed images [7,8]. For instance, errors of up to 10% in the measurement of standardized uptake values (SUVs) have been observed because of incorrect calibration of a dose-calibrator [7]. This represents a limitation when carrying out multi-center quantitative PET studies, comparison of SUV measured in different centers becoming unreliable even if efforts are made to obtain standardized imaging protocols [9]. Moreover, the accurate assessment of the radioactivity prior to the administration is essential in order to verify that the exact dose of the radiopharmaceutical is delivered

to the patient. For commonly used positron emitters, such as  $^{18}\text{F}$ , standards are easily available to perform the calibration of dose-calibrator; however, for some new PET radionuclides, standards may be lacking. Thus, we propose to validate a simple, robust, and replicable phantom-based methodology to accurately calibrate a dose-calibrator for any  $\beta^+$ -emitter.

## Methods

Our approach is based on the  $^{18}\text{F}$  cross-calibration between the dose-calibrator and the PET camera (GE Healthcare, Milwaukee, Wisconsin, USA), performed routinely in nuclear medicine departments with fluorine-18-fluorodeoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG). First, a standard of  $^{18}\text{F}$ -FDG was used to verify the  $^{18}\text{F}$  setting of the dose-calibrator and a  $^{18}\text{F}$ -FDG phantom was imaged to ensure that the quantitative SUV measured was exact (i.e. value of 1.00 g/ml). Second, the reverse methodology was applied to another positron emitter used as a demonstrative working example,  $^{68}\text{Ga}$ , with [ $^{68}\text{Ga}$ ]Cl<sub>3</sub> phantoms: using the SUV values in the reconstructed PET images, the dose-calibrator setting value providing an SUV value of 1.00 g/ml was determined, thus reflecting an accurate measurement of  $^{68}\text{Ga}$  activity. Moreover,  $\gamma$ -ray spectrometry (Wizard<sup>2</sup>-3; PerkinElmer, Waltham,

Massachusetts, USA) was used as a reference method to validate the activity measurements of the dose-calibrator using the identified setting value.

### Radionuclides

$^{68}\text{Ga}$  in the form of  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Cl}_3$  was obtained from a  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generator (IASON, nominal activity 1850 MBq; Cyclotron Co., Ltd, Obninsk, Russia) by fractionated elution using HCl 0.1 mol/l in deionized water. FastLab synthesizer (GE FastLab; GE Healthcare, Milwaukee, Wisconsin, USA, GEMS Benelux, Benelux, Belgium) was used as an automated elution system.  $^{68}\text{Ge}$  breakthrough was eliminated according to the concentration/purification method with an anion-exchange cartridge (SPE Cartridge, Chromafix 30-PS- $\text{HCO}_3$ ; Machery-Nagel, Radeberg, Germany) as described previously [10].

$^{18}\text{F}$  in the form of a standard of  $^{18}\text{F}$ -FDG (808 MBq; IBA Molecular, Bordeaux, France) and a commercial  $^{18}\text{F}$ -FDG radiopharmaceutical (IBA Molecular) were used.

### Dose-calibrator and activity measurements

Technical specifications of the dose-calibrator used in this study (MEDI405; Medisystem, Guyancourt, France) are reported in Table 1. Activity measurements were performed after daily quality controls of the dose-calibrator using high-stability check sources of two radionuclides ( $^{133}\text{Ba}$  and  $^{137}\text{Cs}$ ) with different photon energies.

$^{18}\text{F}$ -FDG and  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Cl}_3$  activities were determined by placing the vial or the syringe in the middle of the well insert supplied with the dose-calibrator and 50 activity measurements were repeated for each considered setting value and each experiment. All activity values were corrected for decay, and background and residual activities were accounted for. A measured activity less than background noise was considered as null. The  $^{18}\text{F}$ -FDG and  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Cl}_3$  activity measurements were repeated three times. For  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Cl}_3$  activity, the same source volume was used in all measurements.

**Table 1** Technical specifications of the dose-calibrator used in this study

Model	Medisystem (MEDI 405)
Type	Well-type ionization chamber
Filling gas	Argon
Gas pressure	12 bars
Chamber wall material	Lead
Chamber wall thickness	3 mm
Photon energy range	25 keV–3 MeV
Resolution	0.001 MBq
Linearity (1 MBq–200 GBq, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) (%)	1
Accuracy (%)	1
Measurement time	Maximum 2 s

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ , technetium-99m.

### PET camera and acquisition procedure

The NEMA-NU2-1994 PET, a cylindrical phantom (20 cm in diameter, total volume of 5640 ml; Data Spectrum Corporation, Durham, North Carolina, USA) was used for experiments and was uniformly filled with different activities of  $^{18}\text{F}$ -FDG or  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Cl}_3$  (Tables 2 and 3). For each radionuclide, phantom acquisitions were repeated three times on a PET/computed tomographic system (GE Discovery RX; GE Healthcare). Two bed positions (10 min acquisition per bed position) were acquired to cover the total 20 cm length of the phantom. Images were reconstructed using the HD View Point iterative reconstruction (two iterations, 21 subsets, 5 mm Gaussian postfilter), and corrected for decay, random, and scattered events. A cylindrical region of interest (ROI) was placed in the middle of the phantom in the reconstructed PET image. The size of the ROI was chosen smaller than the actual dimensions of the NEMA phantom to avoid loss of uptake at the edges of the phantom because of partial volume effects. PMOD software (<http://www.pmod.com>) was used to define the ROI and derive the SUV value with a high precision (three decimals).

The proposed methodology is divided into four steps:

- (1) The standard of  $^{18}\text{F}$ -FDG was used to validate the accuracy and the linearity of the dose-calibrator in measuring  $^{18}\text{F}$ -activities.
- (2) The cross-calibration for  $^{18}\text{F}$  between the dose-calibrator and the PET/computed tomographic system was performed using  $^{18}\text{F}$ -FDG phantoms, assuring an SUV value of 1.00 g/ml.
- (3)  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Cl}_3$  phantoms, filled with activities measured either in a vial or a syringe packaging and using several manufacturer's settings values (751, 763, and 766), were imaged to establish two calibration curves according to packaging (SUV values as a function of dose-calibrator setting values) and identify the experimental dose-calibrator setting value corresponding to the SUV value of 1.00 g/ml in the  $^{68}\text{Ga}$ -reconstructed PET images.
- (4) This setting value was used to repeat three final  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Cl}_3$  phantom image acquisitions to verify its accuracy in providing an SUV value of 1.00 g/ml in the reconstructed PET images.

**Table 2**  $^{18}\text{F}$ -FDG activities (mean  $\pm$  SD) and associated measured SUV values

Fluorine-18 vial	
Activity (MBq)	SUV (g/ml)
70.75 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.04
65.42 $\pm$ 0.07	0.99 $\pm$ 0.06
69.12 $\pm$ 0.08	0.99 $\pm$ 0.03

SUV, standardized uptake value.

**Table 3** [ $^{68}\text{Ga}$ ]Cl $_3$  activities (mean  $\pm$  SD) and associated SUV values, for three different activities according to conditioning (vial or syringe) and dose-calibrator setting values (751, 763, 766, and 772)

751				763			
Vial		Syringe		Vial		Syringe	
Activity (MBq)	SUV (g/ml)	Activity (MBq)	SUV (g/ml)	Activity (MBq)	SUV (g/ml)	Activity (MBq)	SUV (g/ml)
138.01 $\pm$ 0.07	0.91 $\pm$ 0.06	137.39 $\pm$ 0.07	0.92 $\pm$ 0.06	131.77 $\pm$ 0.08	0.96 $\pm$ 0.06	130.77 $\pm$ 0.07	0.97 $\pm$ 0.06
158.39 $\pm$ 0.08	0.92 $\pm$ 0.05	160.08 $\pm$ 0.07	0.91 $\pm$ 0.05	150.76 $\pm$ 0.09	0.97 $\pm$ 0.05	152.37 $\pm$ 0.08	0.96 $\pm$ 0.05
161.42 $\pm$ 0.08	0.92 $\pm$ 0.05	162.86 $\pm$ 0.09	0.91 $\pm$ 0.05	153.63 $\pm$ 0.09	0.97 $\pm$ 0.06	155.03 $\pm$ 0.08	0.96 $\pm$ 0.05
766				772			
Vial		Syringe		Vial		Syringe	
Activity (MBq)	SUV (g/ml)	Activity (MBq)	SUV (g/ml)	Activity (MBq)	SUV (g/ml)	Activity (MBq)	SUV (g/ml)
129.53 $\pm$ 0.06	0.97 $\pm$ 0.06	129.02 $\pm$ 0.06	0.98 $\pm$ 0.06	126.01 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.06	125.62 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.06
148.70 $\pm$ 0.09	0.98 $\pm$ 0.06	149.90 $\pm$ 0.10	0.98 $\pm$ 0.06	144.80 $\pm$ 0.07	1.01 $\pm$ 0.06	146.40 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.06
151.55 $\pm$ 0.07	0.98 $\pm$ 0.06	152.93 $\pm$ 0.09	0.97 $\pm$ 0.06	147.57 $\pm$ 0.07	1.01 $\pm$ 0.06	148.95 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.06

SUV, standardized uptake value.

Once the dose-calibrator was calibrated and to validate the proposed methodology, the [ $^{68}\text{Ga}$ ]Cl $_3$  activity values measured with the dose-calibrator were compared with  $\gamma$ -ray spectrometry (PerkinElmer) using the 511 keV peak of  $^{68}\text{Ga}$ . Three experiments were used in this comparison.

### Statistical analysis

A one-way analysis of variance and a post-hoc Newman–Keuls test were performed using SPSS statistics software (SPSS statistics software version 20.0.0; IBM, Armonk, New York, USA). Results were considered statistically significant when  $P$  value less than 0.05.

### Uncertainties analysis

All individual uncertainties are presented as SD of the mean. Uncertainties are reported with a coverage factor  $k=1$ .

To determine the combined standard uncertainty ( $u_c$ , expressed as a percentage) on activity measurement of [ $^{68}\text{Ga}$ ]Cl $_3$  solutions used to calibrate the dose-calibrator, the following individual uncertainties ( $u_i$ ) were considered:

- (1) Activity measurement reproducibility: combined standard uncertainty on activity measurements of three [ $^{68}\text{Ga}$ ]Cl $_3$  solutions.
- (2) Activity measurement repeatability: SD on 10 measurements of activity produced by a [ $^{68}\text{Ga}$ ]Cl $_3$  solution.
- (3) Background variability: SD of mean on a total of 1000 measurements of the background activity at 2-s intervals.
- (4) Decay correction: standard uncertainty in half-life.

The combined standard uncertainty ( $u_c$ ) was determined using the formula  $u_c = \sqrt{\sum u_i^2}$ .

## Results

### $^{18}\text{F}$ -FDG measurements

The  $^{18}\text{F}$ -FDG standard activity (814.5 MBq) measured was in agreement with the supplier specification (808 MBq  $\pm$  10%). The linearity of the dose-calibrator was measured for activities ranging from 5 to 900 MBq and found to be within the acceptance range (deviation < 5%) (Fig. 1).

The mean SUV value measured over all the  $^{18}\text{F}$ -FDG phantom acquisitions was equal to 0.99  $\pm$  0.01 g/ml (Table 2).

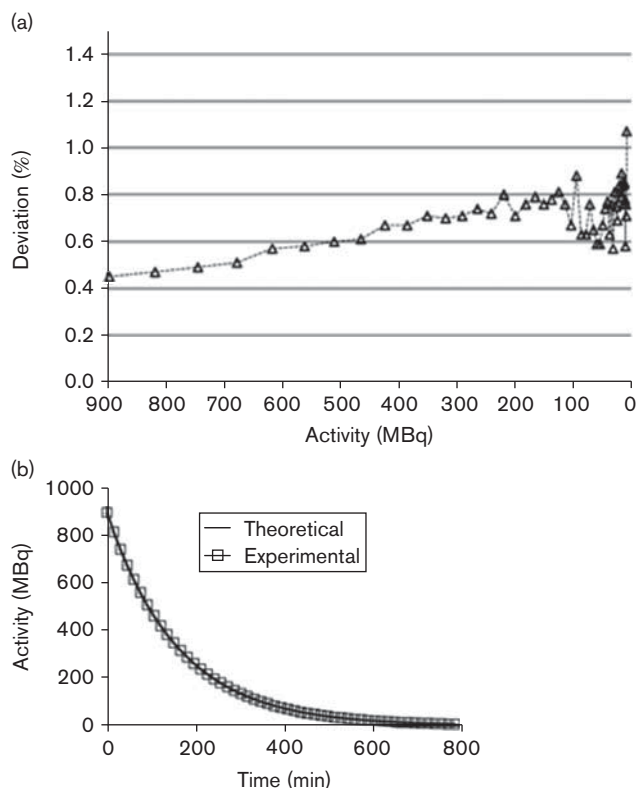
### [ $^{68}\text{Ga}$ ]Cl $_3$ activity and SUV measurements

Activity measurements of [ $^{68}\text{Ga}$ ]Cl $_3$  were found to be significantly different both (i) when considering setting values of 751, 763, 766, and 772 [ $F(3,396)=475555$ ,  $P<0.001$ ;  $F(3,396)=456081$ ,  $P<0.001$ , and  $F(3,396)=500743$ ,  $P<0.001$ , respectively for each of the three experiments] and (ii) when considering vial and syringe packaging [ $F(1,398)=7536$ ,  $P<0.001$ ;  $F(1,398)=36670$ ,  $P<0.001$ , and  $F(1,398)=28930$ ,  $P<0.001$ , respectively, for each of the three experiments]. Post-hoc tests showed that [ $^{68}\text{Ga}$ ]Cl $_3$  activities measured using the different setting values were significantly different, irrespective of the packaging ( $P<0.0001$ ).

For activities measured in vial packaging, the mean SUV values measured over the three [ $^{68}\text{Ga}$ ]Cl $_3$  phantom acquisitions were 0.92  $\pm$  0.01, 0.97  $\pm$  0.01, and 0.98  $\pm$  0.01 g/ml (setting value of 751, 763, and 766, respectively).

For activities measured in syringe packaging, the mean SUV values measured over the three [ $^{68}\text{Ga}$ ]Cl $_3$  phantom acquisitions were 0.91  $\pm$  0.01, 0.96  $\pm$  0.01, and 0.98  $\pm$  0.01 g/ml (setting value of 751, 763, and 766, respectively) (Table 3).

Fig. 1



Validation of the  $^{18}\text{F}$  dose-calibrator setting with the  $^{18}\text{F}$ -FDG standard: accuracy (a) and linearity (b). Deviation is calculated according the usual formula: (experimental activity/theoretical activity)  $\times$  100. In (a) the triangles are the experimental values, and the dotted line is the connecting curve.

### $^{68}\text{Ga}$ Cl<sub>3</sub> calibration curves

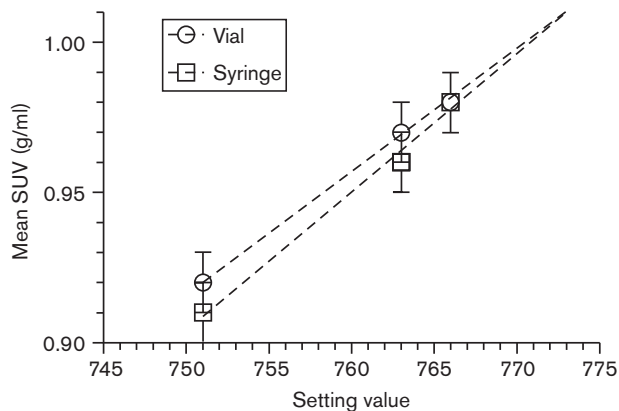
A highly correlated linear relationship ( $R^2 = 0.999$ ) was observed between the manufacturer's setting values and the mean SUV values obtained from  $^{68}\text{Ga}$ Cl<sub>3</sub> activities measured in a vial or a syringe (Fig. 2). Linear regression from the two calibration curves allowed us to calculate the setting value of  $772 \pm 1$  (uncertainty is calculated from SD of the mean of setting values determined using SUV measurements and calibration curves), yielding an SUV value of 1.00 g/ml.

### Validation of the identified setting value for $^{68}\text{Ga}$ cross-calibration

The mean SUV values measured over the three  $^{68}\text{Ga}$ Cl<sub>3</sub> phantom acquisitions using the setting value of 772 (Table 3) were  $1.01 \pm 0.01$  g/ml in the vial and  $1.00 \pm 0.00$  g/ml in the syringe.

The mean relative error between activity values measured with the calibrated dose-calibrator and the  $\gamma$ -ray spectrometry was  $2.9 \pm 1.5\%$ .

Fig. 2



Calibration curves obtained from  $^{68}\text{Ga}$ Cl<sub>3</sub> phantom, providing mean SUV values as a function of dose-calibrator setting values. SUV, standardized uptake value.

### Uncertainties

The proposed procedure enables to calibrate the dose-calibrator with a combined standard uncertainty of 0.81% (Table 4).

### Discussion

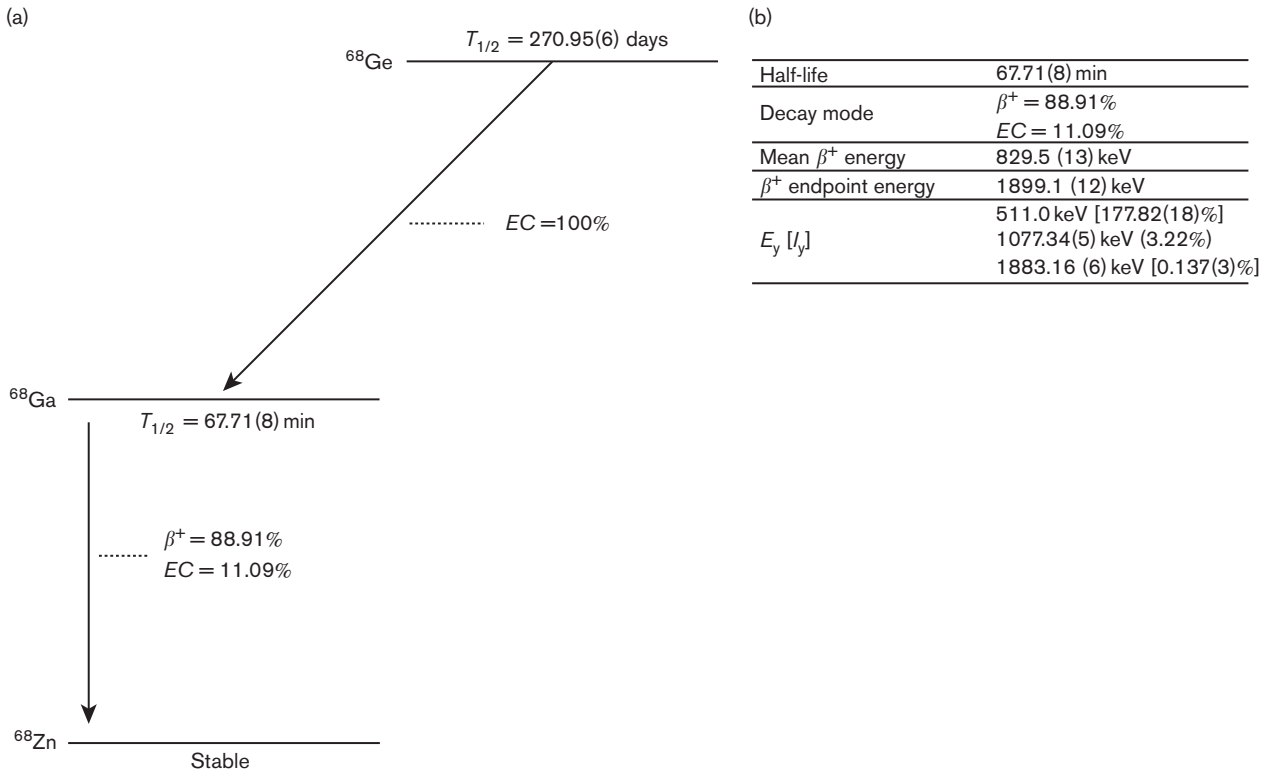
The aim of this work was to develop and validate an alternative calibration method of the dose-calibrator not requiring the use of standards to accurately measure  $\beta^+$ -emitters activities. Given that PET cameras are set up to account for positron-branching of any  $\beta^+$ -emitters, we used a methodology based on the  $^{18}\text{F}$  cross-calibration of the dose-calibrator and the PET system, in which a measured SUV value differing from 1.00 g/ml was synonymous with inaccurate measurement of the activity. We applied this method to one of the most promising new positron emitters,  $^{68}\text{Ga}$ .

$^{18}\text{F}$  is generally described as a pure  $\beta^+$ -emitter, with a positron fraction of  $0.9673 \pm 0.0004$  [11]. We first validated the  $^{18}\text{F}$  setting of the dose-calibrator for measurements of  $^{18}\text{F}$  activity by using a  $^{18}\text{F}$ -FDG standard and subsequently cross-calibrated the PET system with the dose-calibrator to ensure a SUV value of 1.00 g/ml in the reconstructed images (value included in the interval of  $0.99 \pm 0.01$  g/ml).

$^{68}\text{Ga}$  is another  $\beta^+$ -emitter (positron fraction of  $0.8891 \pm 0.0009$  [12], Fig. 3) whose positron fraction is also accounted for by the PET system. Calibration curves (SUV values expressed as a function of dose-calibrator setting) (Fig. 2) show that the SUV value of 1.00 g/ml was not obtained with any other settings (751, 763, and 766). Nevertheless, using a linear regression of the calibration curves, the setting value of  $772 \pm 1$  was found to be associated with a SUV value of 1.00 g/ml (high correlation coefficient  $R^2 = 0.999$ ), irrespective of the packaging.

**Table 4** Uncertainty components evaluated for determination of total activity of [ $^{68}\text{Ga}$ ]Cl<sub>3</sub> solutions

Component ( $u_i$ )	Methodology	Magnitude (%)
Activity measurement reproducibility	Combined standard uncertainty on activity measurements of three [ $^{68}\text{Ga}$ ]Cl <sub>3</sub> solutions	0.13
Activity measurement repeatability	SD of mean on 10 activity measurements of a single [ $^{68}\text{Ga}$ ]Cl <sub>3</sub> solution	0.0509
Background variability	SD of mean on 1000 measurements of background activity	0.788
Decay correction	Standard uncertainty in half-life	0.12
Combined ( $u_c$ )		0.81

**Fig. 3**Simplified decay scheme of  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  (a) and relevant decay characteristics of  $^{68}\text{Ga}$  (b).

This experimental setting value of 772 was verified by repeating the phantom acquisition. Whatever the packaging, an SUV value of 1.00 g/ml was measured in the reconstructed PET images, corroborating the accuracy of the  $^{68}\text{Ga}$  activity measurement (Table 3), and suggesting that the type of conditioning has a limited impact on the measured SUV value in the reconstructed image. Finally, external validation on the basis of  $\gamma$ -ray spectrometry confirmed the accurate calibration of the dose-calibrator.

Therefore, for the studied dose-calibrator, this setting has to be used to cross-calibrate the dose-calibrator and the PET system for  $^{68}\text{Ga}$  with a combined uncertainty of 0.81%. All other settings values have to be used with great caution as they lead to significant overestimation of the measured  $^{68}\text{Ga}$  activity, resulting in underestimation of measured SUV in the PET reconstructed images.

In this study, even though a  $^{68}\text{Ge}$  standard source has been developed recently in the USA [13], we deliberately chose to use  $^{68}\text{Ga}$ , for practical reasons, and a phantom-based method to show the feasibility of a standardization without calibration sources. A radionuclide such as  $^{68}\text{Ga}$ , available at will by a generator, was more flexible in use to achieve and validate our multi-step methodological work, necessitating repeated experiences over time. However, once validated, this method can easily be applied to all dose-calibrators and other positron-emitters even with short half-lives. Indeed, only a few hours are sufficient to accurately standardize dose-calibrators by measuring activities with various settings values, filling phantoms, imaging phantoms with PET, establishing the calibration curve, calculating the setting value, yielding an SUV value of 1.00 g/ml and finally confirming this setting with a last phantom.



## Conclusion

This simple and robust method shows the feasibility of dose-calibrators standardization for positron-emitters activity measurements not only because PET cameras are set up to account for positron-branching of any  $\beta^+$ -emitters but also because phantoms are already available in PET centers for the  $^{18}\text{F}$  cross-calibration performed routinely with  $^{18}\text{F}$ -FDG. In view of the latest advances in PET molecular imaging because of the emergence of several new positron emitters, the method described here is fully relevant to standardize injected activities and SUV values for PET clinical trials.

## Acknowledgements

This work was supported in part by funding from TRAIL (Translational Research and Advanced Imaging Laboratory – Bordeaux, France); ANR-10-LABX-0057-TRAIL.

## Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

## References

- 1 Kist JW, de Keizer B, Stokkel MP, Hoekstra OS, Vogel WV, THYROPET study group. Recurrent differentiated thyroid cancer: towards personalized treatment based on evaluation of tumor characteristics with PET (THYROPET Study): study protocol of a multicenter observational cohort study. *BMC Cancer* 2014; **14**:405.
- 2 Gaykema SB, Brouwers AH, Lub-de Hooge MN, Pleijhuis RG, Timmer-Bosscha H, Pot L, *et al.*  $^{89}\text{Zr}$ -bevacizumab PET imaging in primary breast cancer. *J Nucl Med* 2013; **54**:1014–1018.
- 3 Hsiao E, Ali B, Blankstein R, Skali H, Ali T, Bruyere J Jr, *et al.* Detection of obstructive coronary artery disease using regadenoson stress and  $^{82}\text{Rb}$  PET/CT myocardial perfusion imaging. *J Nucl Med* 2013; **54**:1748–1754.
- 4 Morgat C, Hindié E, Mishra AK, Allard M, Fernandez P. Gallium-68: chemistry and radiolabeled peptides exploring different oncogenic pathways. *Cancer Biother Radiopharm* 2013; **28**:85–97.
- 5 Ambrosini V, Campana D, Tomassetti P, Fanti S.  $^{68}\text{Ga}$ -labelled peptides for diagnosis of gastroenteropancreatic NET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012; **39** (Suppl 1):S52–S60.
- 6 Pfeifer A, Knigge U, Mortensen J, Oturai P, Berthelsen AK, Loft A, *et al.* Clinical PET of neuroendocrine tumors using  $^{64}\text{Cu}$ -DOTATATE: first-in-humans study. *J Nucl Med* 2012; **53**:1207–1215.
- 7 Boellaard R. Standards for PET image acquisition and quantitative data analysis. *J Nucl Med* 2009; **50** (Suppl 1):11S–20S.
- 8 Makris NE, Boellaard R, Visser EP, de Jong JR, Vanderlinden B, Wiers R, *et al.* Multicenter harmonization of  $^{89}\text{Zr}$  PET/CT performance. *J Nucl Med* 2014; **55**:264–267.
- 9 Renaud JM, Mylonas I, McArdle B, Dowsley T, Yip K, Turcotte E, *et al.* Clinical interpretation standards and quality assurance for the multicenter PET/CT trial rubidium-ARMI. *J Nucl Med* 2014; **55**:58–64.
- 10 Velikyan I, Beyer GJ, Långström B. Microwave-supported preparation of  $^{68}\text{Ga}$  bioconjugates with high specific radioactivity. *Bioconjugate Chem* 2004; **15**:554–560.
- 11 National Nuclear Data Center.  $^{18}\text{F}$  [database on the Internet]. Brookhaven National Laboratory, 1995. Available at: <http://www.nndc.bnl.gov>. [Accessed 08 July 2014].
- 12 National Nuclear Data Center.  $^{68}\text{Ga}$  [database on the Internet]. Brookhaven National Laboratory, 2012. Available at: <http://www.nndc.bnl.gov>. [Accessed 08 July 2014].
- 13 Zimmerman BE, Cessna JT. Development of a traceable calibration methodology for solid  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  sources used as a calibration surrogate for  $^{18}\text{F}$  in radionuclide activity calibrators. *J Nucl Med* 2010; **51**:448–453.

## Chapitre 2

---

### Projet de recherche clinique GALTEP

La surexpression des récepteurs de la somatostatine par les tumeurs neuro-endocrines dudodéno pancréatiques (dpNET) chez des patients atteints de Néoplasie Endocrinienne Multiple de type 1 (NEM-1) permet leur imagerie scintigraphique grâce à l'<sup>111</sup>In-DTPA-octreotide. Cependant, cette technique d'imagerie nucléaire souffre d'une sensibilité limitée dans cette indication. L'imagerie TEP/TDM au <sup>68</sup>Ga-DOTATOC améliore la détection des tumeurs neuroendocrines duodéno pancréatiques (40) mais peu de données sont disponibles quant à la détection des dpNET chez des patients NEM-1. L'objectif de cette étude est donc de comparer les performances de l'imagerie TEP au <sup>68</sup>Ga-DOTATOC à l'imagerie scintigraphique conventionnelle à l'<sup>111</sup>In-pentétréotide et au scanner pour la détection des dpNET. Ce projet a été réalisé grâce à une collaboration avec les endocrinologues, radiologues et oncologues du CHU de Bordeaux

#### *Matériels et méthodes*

Le <sup>68</sup>Ga-DOTATOC a été synthétisé conformément à la procédure décrite dans le Dossier du Médicament Expérimental. 19 patients atteints de NEM-1 (12 femmes, âge moyen: 47 ± 13ans) ont été inclus consécutivement sur une période de 6 mois dans le service d'Endocrinologie du CHU de Bordeaux et ont bénéficié d'une TEP/TDM au <sup>68</sup>Ga-DOTATOC à l'Unité TEPRecherche de l'Hôpital Xavier Arnoz en plus de leurs examens de soins courants. L'imagerie TEP/TDM a été réalisée 1 heure après l'injection du <sup>68</sup>Ga-DOTATOC. Le "gold standard" était basé sur l'histologie ou sur l'ensemble des examens d'imagerie morphologique (TDM, IRM, ultrasons) et fonctionnelle (<sup>18</sup>F-FDG) lorsque l'histologie n'était pas disponible.

#### *Résultats*

Le <sup>68</sup>Ga-DOTATOC a été obtenu avec un bon rendement de radiomarquage (44,8 ± 5,8 %), une bonne activité spécifique (8,3 ± 5,6 GBq/μmol) à l'heure d'injection et non corrigé de la décroissance, une excellente pureté radiochimique (> 95%). La préparation était stérile et apyrogène (< 17,5 EU/ml). Après les contrôles de qualité, la solution de <sup>68</sup>Ga-DOTATOC a été injectée aux patients par bolus intraveineux (moyenne 97.1 ± 13,3 MBq, 20,9 ± 8,5μg; médiane 98,2 MBq, 20,5 μg; intervalle 74,55 – 124,33 MBq, 5,7 – 34,0 μg) dans 7,8 ± 1.1mL. Les variations des doses injectées sont dues à la courte demi-vie du <sup>68</sup>Ga et aux éluions du générateur aux efficacités variables. Une attention particulière a été portée à

ce que les préparations radiopharmaceutiques contiennent 1,5 MBq/kg et au maximum 50 µg de <sup>68</sup>Ga-DOTATOC. La solution de <sup>68</sup>Ga-DOTATOC a été bien tolérée par les patients. La sensibilité de l'imagerie au <sup>68</sup>Ga-DOTATOC, à l'<sup>111</sup>In-pentétréotide et du scanner sont de 76 %, 20 % et 60 % ( $p < 0,0001$ ). Toutes les lésions "vraies positives" détectées en imagerie scintigraphique ont également été mises en évidence par l'imagerie au <sup>68</sup>Ga-DOTATOC. La TEP/TDM au <sup>68</sup>Ga-DOTATOC a détecté de plus petites lésions que l'imagerie scintigraphique conventionnelle ( $10,7 \pm 7,6$  vs  $15,2 \pm 5,9$  mm respectivement,  $p < 0,03$ ). Les faux négatifs de l'imagerie au <sup>68</sup>Ga-DOTATOC concernaient des dpNET < 10 mm ainsi que des dpNET agressives positives à l'imagerie TEP/TDM au <sup>18</sup>F-FDG. L'imagerie corps entier au <sup>68</sup>Ga-DOTATOC a permis l'identification de tumeurs NEM-1 extra-abdominales, comme une tumeur carcinoïde bronchique non détectée au scanner et 3 méningiomes non mis en évidence avec l'imagerie scintigraphique conventionnelle.

### *Conclusion*

En comparaison à l'imagerie scintigraphique avec l'<sup>111</sup>In-pentétréotide, la sensibilité de l'imagerie TEP/TDM au <sup>68</sup>Ga-DOTATOC est meilleure pour la détection des TNE pancréatiques ou duodénales chez des patients atteints de NEM-1. L'imagerie TEP/TDM au <sup>68</sup>Ga-DOTATOC a également été capable de détecter des lésions supplémentaires. Ainsi, cette nouvelle modalité d'imagerie pourrait être recommandée pour le bilan initial ou le suivi de patients atteints de NEM-1.

Article 4: Evaluation of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT for the detection of duodenopancreatic neuroendocrine tumors in patients with MEN1. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. En révision.

**Clément Morgat**, Fritz-Line Vélayoudom-Céphise, Paul Schwartz, Martine Guyot, Delphine Gaye, Delphine Vimont, Jürgen Schulz, Joachim Mazère, Marie-Laure Nunès, Elif Hindié, Philippe Fernandez, Antoine Tabarin.

**Evaluation of <sup>68</sup>Ga-DOTA-TOC PET/CT for the detection of duodenopancreatic neuroendocrine tumors in patients with MEN1**

Clément Morgat, PharmD, PhD<sup>1,2,3\*</sup>, Fritz-Line Vélayoudom-Céphise, MD, PhD<sup>4\*</sup>, Paul Schwartz, MD<sup>3</sup>, Martine Guyot, MD<sup>3</sup>, Delphine Gaye, MD<sup>5</sup>, Delphine Vimont<sup>1,2</sup>, Jürgen Schulz PhD<sup>1,2</sup>, Joachim Mazère, PharmD, PhD<sup>1,2,3</sup>, Marie-Laure Nunes, MD<sup>4</sup>, Denis Smith, MD<sup>6</sup>, Elif Hindié, MD, PhD<sup>1,2,3</sup>, Philippe Fernandez, MD, PhD<sup>1,2,3\*</sup>, Antoine Tabarin, MD<sup>4\*</sup>.

\* CM and FLV are both first co-authors, and PF and AT contributed equally to this study.

<sup>1</sup>CNRS, INCIA, UMR 5287, F-33000 Bordeaux, France,

<sup>2</sup>University of Bordeaux, INCIA, UMR 5287, F-33000 Bordeaux, France,

<sup>3</sup>Dpt of Nuclear Medicine, University Hospital of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France,

<sup>4</sup>Dpt of Endocrinology, USN Haut-Lévêque, F-33604 Pessac, France,

<sup>5</sup>Dpt of Radiology, University Hospital of Bordeaux, F-33604 Pessac, France,

<sup>6</sup>Dpt of Oncology, University Hospital of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

**Corresponding author to whom reprint requests should be addressed:**

Clément MORGAT, Service de Médecine Nucléaire, Hôpital Haut-Lévêque, 33604 Pessac France.

Phone: +33557656408. Fax: +33557656839. e-mail: clement.morgat@chu-bordeaux.fr

First co-authors :

- Clément MORGAT, Service de Médecine Nucléaire, Hôpital Haut-Lévêque, 33604 Pessac France.

Phone: +33557656408. Fax: +33557656839. e-mail: clement.morgat@chu-bordeaux.fr

- Fritz-Line VELAYOUDOM-CEPHISE, Service d'Endocrinologie, Diabétologie et Nutrition, Hôpital Haut-Lévêque, 33604 Pessac, France.

Phone: +33557656078 - Fax: +33557656529. e-mail : flcephise@gmail.com

**Financial support:** This work was funded by La Ligue contre le Cancer

## ABSTRACT

**Context:** Somatostatin Receptor scintigraphy with  $^{111}\text{In}$ -pentetreotide (SRS) is used to detect duodenopancreatic neuroendocrine tumors (dpNETs) in Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1). However, SRS has limited sensitivity for this purpose. Positron emission tomography/Computed tomography (PET/CT) with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC has a higher rate of sporadic dpNETs detection than SRS but there is few data for dpNETs detection in MEN1.

**Purpose:** To compare the performances of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT, SRS and contrast-enhanced computed tomography (CE-CT) to diagnose dpNETs in MEN1.

**Design and Setting:** Single institution prospective comparative study.

**Patients and Methods:** 19 consecutive MEN1 patients (aged  $47 \pm 13$  years) underwent  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT, SRS and CE-CT within two months in random order. Blinded readings of images were performed separately by experienced physicians. Unblinded analysis of CE-CT, combined with additional magnetic resonance imaging, endoscopic-ultrasound,  $^{18}\text{F}$ -2-fluoro-deoxy-D-glucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) PET/CT or histopathology results served as reference standard for dpNETs diagnosis.

**Results:** the sensitivity of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT, SRS and CE-CT was 76%, 20% and 60% respectively ( $p < 0.0001$ ). All the true positive lesions detected by SRS were also depicted on  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT.  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT detected lesions of smaller size than SRS ( $10.7 \pm 7.6$  and  $15.2 \pm 5.9$  mm respectively,  $p < 0.03$ ). False negatives of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT included small dpNETs ( $< 10\text{mm}$ ) and  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT positive aggressive dpNETs. No false positives were recorded. In addition, whole body mapping with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT identified extra-abdominal MEN1-related tumors including one neuroendocrine thymic carcinoma identified by the three imaging procedures, one bronchial carcinoid undetected by CE-CT and 3 meningiomas undetected by SRS.

**Conclusion:** Owing to higher diagnostic performance,  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT (or alternative  $^{68}\text{Ga}$ -labeled somatostatin analogues) should replace  $^{111}\text{In}$ -pentetreotide in the investigation of MEN1 patients.

**Key Words:** duodenopancreatic neuroendocrine tumors; multiple endocrine neoplasia type 1;  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT;  $^{111}\text{In}$ -pentetreotide SPECT/CT; contrast-enhanced computed tomography

## **INTRODUCTION**

Multiple Endocrine Neoplasia type-1 (MEN1) is an autosomal dominant hereditary syndrome caused by germline mutations of the menin tumor suppressor gene [1]. MEN1 is responsible for various endocrine and non-endocrine tumors amongst which parathyroid adenoma/hyperplasia, duodenopancreatic neuroendocrine tumors (dpNETs) and pituitary adenomas are the more prevalent [2]. Amongst dpNETs, non-functioning tumors (NF) are the most common followed by gastrinomas and insulinomas [3]. dpNETs have malignant potential and MEN1 prognosis is mainly linked to their metastatic risk [4, 5]. Since surgery is the only curative treatment, systematic detection and follow-up of dpNETs are warranted in MEN1 patients [3]. Given that MEN1-associated dpNETs are frequently multiple, their accurate diagnosis presents significant challenges [3]. Various imaging procedures have been proposed for this purpose such as <sup>111</sup>In-DTPA-pentetreotide-labelled somatostatin receptor scintigraphy (SRS), endoscopic ultrasound (EUS), contrast-enhanced-computed tomography (CE-CT) and magnetic resonance imaging (MRI). However, to date, no consensus for optimum radiological imaging in MEN1 patients has been established [3, 6].

SRS takes advantage of a unique feature of dpNETs: in 70–90 % of cases they exhibit expression of somatostatin receptor type 2 (SSTR<sub>2</sub>) [7]. However, the sensitivity of this functional imaging has limitations due to its low spatial resolution and inability to detect dpNETs with low SSTR density and/or small size [8]. Recently, some high affinity somatostatin analogs holding a DOTA-chelate and radiolabeled with <sup>68</sup>Ga for PET/CT imaging have emerged, which supersede in resolution and sensitivity conventional SRS in the detection of metastatic or small neuroendocrine tumors [7-10].

To date, only 3 studies have evaluated the performance of the new somatostatin receptor PET tracers for detection of dpNETs in MEN1 patients. However, 2 were retrospective studies which did not include comparison with SRS and multiphase CE-CT [11, 12] and one was prospective using <sup>68</sup>Ga-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-Octreotate (<sup>68</sup>Ga-DOTA-TATE) PET/CT [13]. The aim of our study was therefore to compare prospectively the performance of <sup>68</sup>Ga-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-octreotide (<sup>68</sup>Ga-DOTA-TOC) PET/CT, SRS and CE-CT for the diagnosis of dpNETs in MEN1 patients.

## **PATIENTS AND METHODS:**

### **Patients**

19 genetically confirmed MEN1 patients (12 women, age at inclusion: 47±13 years, range 26-70 years), previously evaluated and treated in our department, were enrolled in this prospective study (Clinical Trial

GALTEP, Eudract 2013-003927-12). Patients were recruited consecutively during their scheduled follow-up. A written informed consent was obtained from all individual participants included in the study that was approved by the local ethical committee.

All patients had primary hyperparathyroidism, 12 were treated for pituitary adenomas, 2 underwent resection of lung neuroendocrine tumors (NETs) and 1 underwent resection of bilateral adrenal carcinomas. Endoscopic enucleations were previously performed for 2 insulinomas (P1, P12), one pancreatic gastrinoma (P18) while a distal pancreatectomy was performed for a NF dpNET(P14) and a pancreatic gastrinoma (P7). Five patients were successfully treated with proton pump inhibitors for Zollinger-Ellison syndrome (ZES) at the time of the study (P4, P7, P10, P18, P19). In the remaining asymptomatic patients, systematic measurement of circulating gut hormones revealed an increased plasma concentration of pancreatic polypeptide in 2 patients (371 and 235 pmol/L, normal value < 100 pmol/L; P3 and P17 respectively). Clinical features of the 19 MEN1 patients are summarized in TABLE 1.

#### **<sup>68</sup>Ga-DOTA-TOC radiosynthesis**

Gallium-68 was obtained from a <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator (IASON®, Obninsk, Russia) and complexed with DOTA-TOC (ABX GmbH; ~50 µg, Garching, Germany) using microwaves (90°C, 5 minutes (min)) as previously described [14]. After sterile filtration, all radiopharmaceutical preparations were checked for activities [15], radiochemical purity, specific activity, volume and sterility. Care was taken that all radiopharmaceutical preparations contained 1.5MBq/kg and maximum 50µg of <sup>68</sup>Ga-DOTA-TOC for each patient. <sup>68</sup>Ga-DOTA-TOC preparations were obtained with radiochemical purities >95% and specific activities of 8.3±5.6 GBq/µmol. <sup>68</sup>Ga-DOTA-TOC was intravenously injected (mean 97.1±13.3 MBq, 20.9 µg; median 98.2 MBq, 20.5 µg; range 74.6 -124.3 MBq, 5.7 -34 µg).

#### **<sup>68</sup>Ga-DOTA-TOC PET/CT imaging**

All <sup>68</sup>Ga-DOTA-TOC examinations were performed on a dedicated scanner (Discovery RX, General Electric Medical System, Milwaukee, USA), 60 min after injection in 3D mode. Care-dose sureCT scans for attenuation correction were acquired (80 mA, 140 kV, a 256 x 256 matrix, 3-mm slice thickness). The PET imaging sequence encompassed multiple bed position whole-body scans from the top of the skull to the proximal thighs (180 s each bed position). Iterative reconstruction was performed with a scatter correction using the ordered



subset expectation maximization technique (OSEM) with 2 iterations and 21 subsets. Reconstruction of PET images used corrections for attenuation, dead-time, random events, and scatter.

## **SRS**

<sup>111</sup>In-pentetreotide was prepared with the commercially available kit (Octreoscan™, Covidien Imaging, Elancourt, France) according to manufacturer instructions. Mean injected activity was  $149.5 \pm 4.9$  MBq. Whole body imaging (speed 8cm/min) was performed at 6 hours after injection with a dual-detector scintillation camera (Symbia T2 Siemens, Erlangen, Germany or Discovery NM/CT 670 pro, General Electric Medical System, Milwaukee, USA) equipped with a medium-energy parallel-hole collimator. Two 15 min planar images were recorded at 24 hours, on cranial-thoracic and abdominal regions. Single photon emission computed tomography/computed tomography (SPECT/CT) images of the abdomen were routinely performed using the following parameters: rotation detection head, 2 x 180°; 2 x 64 projections; 50 seconds per projection; 128 x 128 matrix). Image reconstruction was performed by iterative flash 3D algorithm (14 iterations, 8 subsets) on data acquired with Symbia T2 system, and by iterative OSEM algorithm (2 iterations, 10 subsets) on data acquired with Discovery system. Reconstruction procedure included attenuation correction (based on the CT maps) and scatter correction.

## **CE-CT**

Helical CT images of the neck, thorax and abdomen were acquired with the Somatom Definition scanner (Siemens®) with the following parameters: tube current, 120 kV; tube voltage: with “care dose” adaptation; reconstruction orientation, transverse; reconstruction section thickness, 2 mm. Typically 2ml/kg iohexol contrast media (Omnipaque 300; GE Healthcare) were administered with scan delays of 30s for the arterial phase and 70s for the portal phase. Images were reconstructed with a soft-tissue kernel B20f for arterial phase and B30f for portal phase

## **Imaging analysis**

<sup>68</sup>Ga-DOTA-TOC PET/CT, SRS and CE-CT were performed within two months. Two experienced nuclear medicine physicians aware of the MEN1 diagnosis but blinded to the results of morphological imaging, interpreted separately <sup>68</sup>Ga-DOTA-TOC PET/CT and SRS SPECT/CT (non diagnosis CT for both nuclear imaging procedures) in a random fashion while an experienced radiologist performed blinded readings of

diagnosis CE-CT. Criteria for image interpretation of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT and SRS were based on visual analysis. In PET imaging, focally increased uptake, compared to that of the surrounding tissue, was read as positive. Diffuse uptake over the uncinatus process was considered physiological. For SRS analysis, increased uptake was assessed by comparison with uptake by liver tissue, according to the European Association of Nuclear Medicine recommendations[16].

Then, a collective and coincident unblinded analysis of the  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT, SRS and CE-CT was performed for each patient by the 3 physicians. When the results were discordant, complementary investigations by MRI, EUS,  $^{18}\text{F}$ -FDG PET or histology were performed on an individual basis to confirm (or not) the anatomical substratum of pathological findings on CE/CT or nuclear procedures. The combination of the unblinded analysis of the CE-CT with the complementary investigations results served as reference standard.

### **Statistical analyses**

Continuous data were expressed in mean  $\pm$ standard deviation. Categorical data were expressed in number and percentage. Sensitivity of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT, SRS and CE-CT for dpNETs detection were calculated on a per-lesion analysis. Chi-Square test, non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA and Mann-Whitney test were performed when indicated. A p value  $< 0.05$  was considered significant. Data analyses were performed using the Graph Pad software (La Jolla, CA).

## **RESULTS**

### **DETECTION OF DUODENOPANCREATIC NEUROENDOCRINE TUMORS (Table 2)**

Seventy-five dpNETS were diagnosed using the reference standard (see above imaging analysis paragraph)(size:  $10.4 \pm 7.3$  mm; range, 2-45 mm): 59 were located in the pancreas (size:  $10.7 \pm 7.7$  mm; range, 2-45 mm), 6 in the duodenum (size:  $3.0 \pm 3.5$  mm; range, 3-13 mm), 8 were lymph nodes (LN) on the lymphatic pathway of dpNETs (size:  $11.0 \pm 6.8$  mm; range, 2-25 mm) and 2 were liver metastases of 12 and 19 mm in size of a dpNET (P6).

In a per-lesion-analysis,  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT, SRS and CE-CT depicted 57, 17 and 47 lesions, respectively. Among the 57 images described using  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT, all were true positive (TP) (size:  $10.7 \pm 7.6$  mm; range, 2-45 mm). No false positives (FP) of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT were reported. Fifteen of

the 17 images described using SRS were TP (size:  $15.2 \pm 5.8$  mm; range, 6-25 mm) and 2 were FP, which corresponded to physiological uptake of the pancreatic uncus. Forty-five of 47 lesions identified by CE-CT were TP (size:  $11.9 \pm 8.2$  mm; range, 2-45 mm) and 2 were FP corresponding to intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN). Thus, the sensitivity of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT, SRS and CE-CT for the detection of dpNETs differed significantly (76%, 20% and 60% respectively,  $p < 0.0001$ ) (TABLE 2). The specificity of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT, SRS and CE-CT were 100%, 50% and 50% respectively ( $p < 0.01$ ) (Table 2).

### **Comparison of $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT and SRS**

Fifteen concordant lesions were TP identified with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT and SRS in 13 patients. Importantly, 42 dpNETs depicted in 18 patients by  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT were not seen using SRS (Figure 1). Conversely, all the TP of SRS were described with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT. The dpNETs identified with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT were smaller than those identified with SRS ( $10.7 \pm 7.6$  mm and  $15.2 \pm 5.9$  mm respectively,  $p < 0.03$ ). Incidentally, in patients treated by proton pump inhibitors,  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT identified 5 probable SRS negative gastrinomas located within the duodenum or periduodenal LN. The 2 FP of SRS were identified as physiological uptake of the pancreatic uncus with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT.

### **Comparison of $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT and CE-CT**

32 concordant TP dpNETs were identified with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT and CE-CT in 16 patients. Twenty-five dpNETs were identified with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT and not seen with CE-CT. Interestingly, unblinded re-analysis of CE-CT images guided by the results of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT disclosed 15 of the 25 dpNETs that were not identified during blinded analysis of CE-CT. These were 3 lesions of the pancreatic tail (3 to 24 mm in size), 4 lesions of the pancreatic body (3 to 11 mm in size), 2 lesions of the pancreatic head (each of 6 mm in size), 4 duodenal lesions (3 to 8 mm in size) and 2 peripancreatic LN (2 and 7 mm in size). The ten remaining lesions not seen with CE-CT were 4 lesions of the pancreatic head (4 to 5 mm), 4 lesions of the body (6 to 17 mm), and 2 lesions of the tail (5-17 mm).

Thirteen false negatives (FN) of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT were identified by CE-CT and corresponded to 10 pancreatic tumors (2 to 12 mm in size,  $5.3 \pm 1.0$  mm) in 11 patients, 1 peripancreatic metastatic LN of 25 mm in size and two liver metastases of a grade 3 pancreatic NET (P6). These 3 last lesions displayed intense uptake during  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT.

Complementary imaging performed to verify  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT images unseen with SRS and CE-CT, identified 5 additional lesions in P12 that were not seen with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT nor CE-CT. These included one lesion of the pancreatic head (5 mm in size), 2 rapidly growing lesions of the tail (8 and 16 mm in size) and 2 peripancreatic LN (12 and 13mm in size). These results warranted an evaluation with  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT that showed an intense uptake of the lesions of the pancreatic tail and associated LN (Figure 2). Three patients had confirmation of 3 lesions depicted by  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT: thymic confirmation in P2, well differentiated NET in P3 and typical carcinoid bronchial neuroendocrine tumor.

### **DETECTION OF EXTRA-ABDOMINAL MEN1 TUMORS**

The  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT detected 3 SRS negative meningiomas that were confirmed using complementary MRI (P6, P18, P19).  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT also depicted a 14 mm bronchial carcinoid that was not seen during unblinded analysis of CE-CT (P19) (Figure 3). A grade 3 thymic neuroendocrine carcinoma of 55 mm in size was identified with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT, SRS and CE-CT (P2).

### **DISCUSSION**

The penetrance of dpNETS in patients with MEN1 reaches 50% by the 5<sup>th</sup> decade [2, 3]. Among these, NF dpNETs are the most common, may become malignant and are important determinants of the prognosis of MEN1 [4, 5, 17]. The malignant potential is correlated with the size of dpNETS, a critical diameter of 15–20 mm significantly marking the malignancy risk [18]. Therefore, detection of dpNETS at an early stage, accurate size measurement and regular monitoring are essential for the management of MEN1.

Multiphase CE-CT and CE-MRI are commonly used to detect dpNETs in MEN1 patients with roughly similar diagnostic performances [3]. Their main drawbacks are their limitation in detecting very small lesions [19]. EUS is considered the most sensitive and precise imaging technique for measurement of dpNETs size [19]. However, EUS is more operator-dependent than cross-sectional imaging and may perform less well for the left portion of the pancreas [20]. Elsewhere, the pathological significance of NF lesions of less than 10 mm is debatable and, importantly, EUS is cumbersome and invasive because it requires general anesthesia. SRS has proved to be effective for visualizing dpNETs [3, 5, 21, 22] and, coupled to SPECT, has the advantage of whole body scanning, which allows detection of extra-abdominal lesions and metastases. In addition, SRS provides functional information about advanced disease that can help in the selection of candidates for treatment with radiolabeled somatostatin analogs [23, 24]. The main limitations of SRS are related to variable expression of

SST<sub>2</sub>R amongst dpNETs, hepato-biliary elimination of the tracer which interferes with the interpretation of abdominal images and size of tumors [8]. Due to the high energy of the  $\gamma$  rays of <sup>111</sup>In and partial volume effect in small tumors combined with the intrinsically low resolution of the gamma camera, small tumors (< 10 mm in size) are rarely detected by SRS. Otherwise, because of low resolution of SRS imaging, unicus physiological uptake is difficult to differentiate from pathological findings. In the last few years, studies using new high affinity somatostatin analogs radiolabeled with <sup>68</sup>Ga for PET/CT imaging have emerged. They shown a higher rate of lesion identification than is achieved with SRS [8-10, 25, 26]. However to date, limited information is available concerning the accuracy of these new functional imaging tools in the specific situation of MEN1. Two studies conducted with <sup>68</sup>Ga-DOTA-TOC PET/CT or <sup>68</sup>Ga-DOTA-NaI<sup>3</sup>-Octreotide (<sup>68</sup>Ga-DOTA-NOC) PET/CT in a very limited number of MEN-1 patients [11, 12] suffer from major limitations such as a retrospective design and lack of comparison with SRS and multiphase CE-CT. Only one prospective comparative study, assessing the performance and usefulness of <sup>68</sup>Ga-DOTA-TATE PET/CT in 26 MEN-1 patients, is currently available [13]. Therefore, the present work is the largest prospective and head-to-head comparative study assessing the accuracy of <sup>68</sup>Ga-DOTA-TOC PET/CT in MEN1 patients and should be of value.

Patients of our cohort were selected consecutively during regular follow-up and the distribution of dpNETs including a majority of NF dpNETs followed by gastrinomas, is representative of the MEN1 spectrum [3]. One limitation of our study is the absence of insulinoma, a tumor that frequently lacks significant SST<sub>2</sub>R [27]. Interestingly, dpNETs in our cohort exhibited small size ( $10.4 \pm 7.3$  mm) and only one patient (P6) was treated for a metastatic intermediate-grade pancreatic NET. Of note, the dpNETs phenotype of our cohort differs significantly from the prospective study of Sadowski *et al* [13] in which the majority of patients harbored a metastatic disease. Although our study does not enable the evaluation of <sup>68</sup>Ga-DOTA-TOCPET/CT accuracy for the staging of malignant dpNETs, a goal that was outside the scope of our study. However, it allows the assessment of the performance of imaging tools in a screening perspective for MEN1-related dpNETs.

Our results are in accordance with previous studies conducted in sporadic dpNETs and confirm that the diagnostic performance of <sup>68</sup>Ga-DOTA-TOCPET/CT is clearly superior to that of SRS [9, 10, 26]. Similar findings have recently been reported by Sadowski *et al* using <sup>68</sup>Ga-DOTA-TATE PET/CT [13]. More specifically, our study shows that <sup>68</sup>Ga-DOTA-TOC PET/CT is able to depict small lesions of less than 10 mm in size, which were not seen using SRS, enabling a more complete screening of dpNETs. The relatively poor performance of SRS in our cohort, as compared to a 50 to 100% sensitivity reported in the literature, is probably related to the limited size of most tumors [28]. Elsewhere, <sup>68</sup>Ga-DOTA-TOC PET/CT provided a better

characterization of the lesions unseen with cross-sectional imaging. Indeed 9 tumors > 10 mm in size and SRS negative were clearly visualized using  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT. Therefore, in such SRS negative cases, the improvement in tumor characterization provided by  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT may prevent the necessity of performing complementary investigations such as biopsy,  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT, or more frequent regular follow-up.

The sensitivity of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT also compares well with that of CE-CT (76% and 60% respectively in a per-lesion analysis). Interestingly,  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT helped to identify 15 dpNETs unseen with blinded analysis of CE-CT but depicted after unblinded re-analysis. Conversely, 13 dpNETs unseen with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT were identified by CE-CT. However, these FN corresponded to 10 small lesions < 12 mm in size, and to  $^{18}\text{F}$ -FDGPET/CT positive peripancreatic metastatic LN and liver metastases of a grade 3 pancreatic NET (P6). SST<sub>2</sub>R expression was described to decrease as the histological grade of dpNETs increases and there is evidence that, similarly to SRS, new somatostatin analog PET tracers are of limited value in intermediate and high-grade tumors while  $^{18}\text{F}$ -FDG PET is more appropriate [29-31]. Similar considerations may explain the negative findings in the patient P12, with  $^{18}\text{F}$ -FDG PET positive rapidly growing pancreatic lesions associated with LN.

Since EUS is considered to be the most sensitive imaging tool for detecting small dpNETs [3, 19] and not performed in a systematic fashion in all 19 patients, the true sensitivity of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT in our cohort may be overestimated. However, apart from patients with intermediate or advanced-grade dpNETs, the lesions missed by both  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT and CE-CT in asymptomatic individuals are probably of small size and of questionable clinical significance.

Importantly,  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT provided a complete mapping of the disease and identified several MEN1 extra-abdominal related tumors including 3 meningiomas unseen by SRS and a bronchial NET that was missed by blinded analysis of CE-CT.

As all  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT images were confirmed by unblinded analysis and complementary investigations, our study suggests the excellent specificity of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT. Indeed, no FP was recorded in our series. However, the very specific binding of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC may lead to misinterpretation of tracer accumulation, as described in previous studies, and should be correlated with anatomical imaging findings for accurate interpretation. Acquisition with contrast-enhanced perfusion for CT may also improve  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT to localize dpNETs [26, 32]. A clear limitation of our study to assess the specificity of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT is that only pathological examination of surgical specimens can confirm the diagnosis of dpNETs and provide accurate information concerning their real size and histological grade. However, and

similarly to the previously published studies in the specific context of MEN1 [11-13], this option was not possible in small lesions for ethical reasons in the context of the restricted surgical indications in MEN1 patients [3]. Interestingly, only few small LN identified with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT were recorded as false positives after histological examination [13].

In conclusion, in our series,  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT demonstrates excellent sensitivity and a real superiority compared to SRS. In addition,  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT proved to be helpful for complete mapping of MEN1 disease. Owing to its diagnostic superiority, improved convenience for the patient as one-day imaging, lower risk of accumulation of radiation in the kidneys compared to SRS [33] and potentially lower cost [34],  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT should replace SRS in the investigation of MEN1 patients. Further studies are needed to precisely evaluate its performance in case of insulinomas. Whether the slight difference between  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE and  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NOC binding affinity to  $\text{SST}_2\text{R}$  translates into clinical impact, following functional imaging is debatable [35]. Somatostatin agonist radiolabeled with long-lived positron emitters, such as  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-TATE [36], and high affinity somatostatin antagonists radiolabeled with  $^{68}\text{Ga}$  or  $^{177}\text{Lu}$  for radiopharmaceutical therapy ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11) are also subject of major interest [37]. Finally, other neuropeptides, such as radiolabeled glucagon-like peptide 1 (GLP-1) analogues, or glucose-dependent insulinotropic polypeptide analogues might also improve management of dpNETs that are somatostatin-receptor negative [38].

Our study was not designed to establish the ideal imaging strategy for dpNETs in MEN1 patients. However, as accurate measurement and functional characterization of all dpNETs are important goals in MEN1 management, we recommend the use of a combination of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET/CT and complementary sensitive morphological imaging such as EUS or MRI for the detection of MEN1 related dpNETs.

### **Ethical approval**

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

### **Acknowledgements**

We thank Dr Frédéric Debordeaux for participation in quality controls and preparation of  $^{111}\text{In}$ -pentetreotide and Mrs C. Blair for grammatical revision of the manuscript. This study has been funded by "La Ligue contre le Cancer". The authors declare that they have no conflict of interest.

## REFERENCES

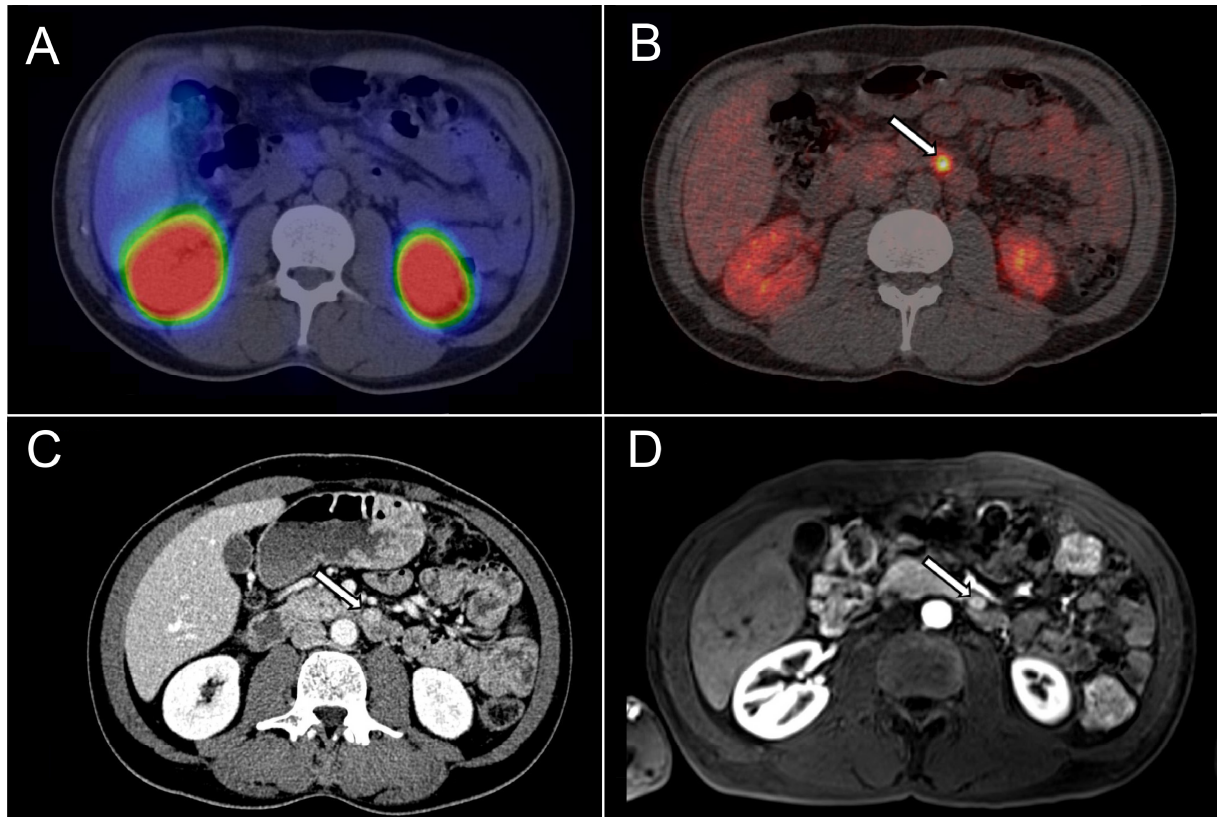
1. Chandrasekharappa SC, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Collins FS, Emmert-Buck MR et al. Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science*. 1997,276(5311):404-7.
2. Machens A, Schaaf L, Karges W, Frank-Raue K, Bartsch DK, Rothmund M et al. Age-related penetrance of endocrine tumours in multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): a multicentre study of 258 gene carriers. *Clin Endocrinol*. 2007,67(4):613-22.
3. Thakker RV, Newey PJ, Walls GV, Bilezikian J, Dralle H, Ebeling PR et al. Clinical Practice Guidelines for Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1). *J Clin Endocrinol Metab*. 2012,97(9):2990-3011.
4. Goudet P, Murat A, Binquet C, Cardot-Bauters C, Costa A, Ruzsniowski P et al. Risk Factors and Causes of Death in MEN1 Disease. A GTE (Groupe d'Etude des Tumeurs Endocrines) Cohort Study Among 758 Patients. *World J Surgery*. 2010,34(2):249-55.
5. Pieterman CRC, Conemans EB, Dreijerink KMA, de Laat JM, Timmers HTM, Vriens MR et al. Thoracic and duodenopancreatic neuroendocrine tumors in multiple endocrine neoplasia type 1: natural history and function of menin in tumorigenesis. *Endocr Relat Cancer*. 2014,21(3):R121-R42.
6. Öberg KE, Reubi JC, Kwekkeboom DJ, Krenning EP. Role of Somatostatins in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumor Development and Therapy. *Gastroenterology*. 2010,139(3):742-53.e1.
7. Johnbeck CB, Knigge U, Kjær A. PET tracers for somatostatin receptor imaging of neuroendocrine tumors: current status and review of the literature. *Future Oncol*. 2014,10(14):2259-77.
8. Kowalski J, Henze M, Schuhmacher J, Macke H, Hofmann M, Haberkorn U. Evaluation of positron emission tomography imaging using  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-DPhe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-octreotide in comparison to  $^{111}\text{In}$ -DTPAOC SPECT. First results in patients with neuroendocrine tumors. *Mol Imaging Biol*. 2003,5(1):42-8.
9. Buchmann I, Henze M, Engelbrecht S, Eisenhut M, Runz A, Schäfer M et al. Comparison of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC PET and  $^{111}\text{In}$ -DTPAOC (Octreoscan) SPECT in patients with neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007,34(10):1617-26.
10. Gabriel M, Decristoforo C, Kendler D, Dobrozemsky G, Heute D, Uprimny C et al.  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-Octreotide PET in Neuroendocrine Tumors: Comparison with Somatostatin Receptor Scintigraphy and CT. *J Nucl Med*. 2007,48(4):508-18.
11. Froeling V, Elgeti F, Maurer M, Scheurig-Muenkler C, Beck A, Kroencke T et al. Impact of Ga-68 DOTATOC PET/CT on the diagnosis and treatment of patients with multiple endocrine neoplasia. *Ann Nucl Med*. 2012,26(9):738-43.
12. Sharma P, Mukherjee A, Karunanithi S, Naswa N, Kumar R, Ammini AC et al. Accuracy of  $^{68}\text{Ga}$  DOTANOC PET/CT imaging in patients with multiple endocrine neoplasia syndromes. *Clin Nucl Med*. 2015,40(7):e351-6.
13. Sadowski SM, Millo C, Cottle-Delisle C, Merkel R, Yang LA, Herscovitch P et al. Results of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATATE PET/CT Scanning in Patients with Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *J Am Coll Surg*. 2015,221(2):509-17.
14. Velikyan I, Beyer GJ, Langstrom B. Microwave-supported preparation of  $^{68}\text{Ga}$  bioconjugates with high specific radioactivity. *Bioconjug Chem*. 2004,15(3):554-60.



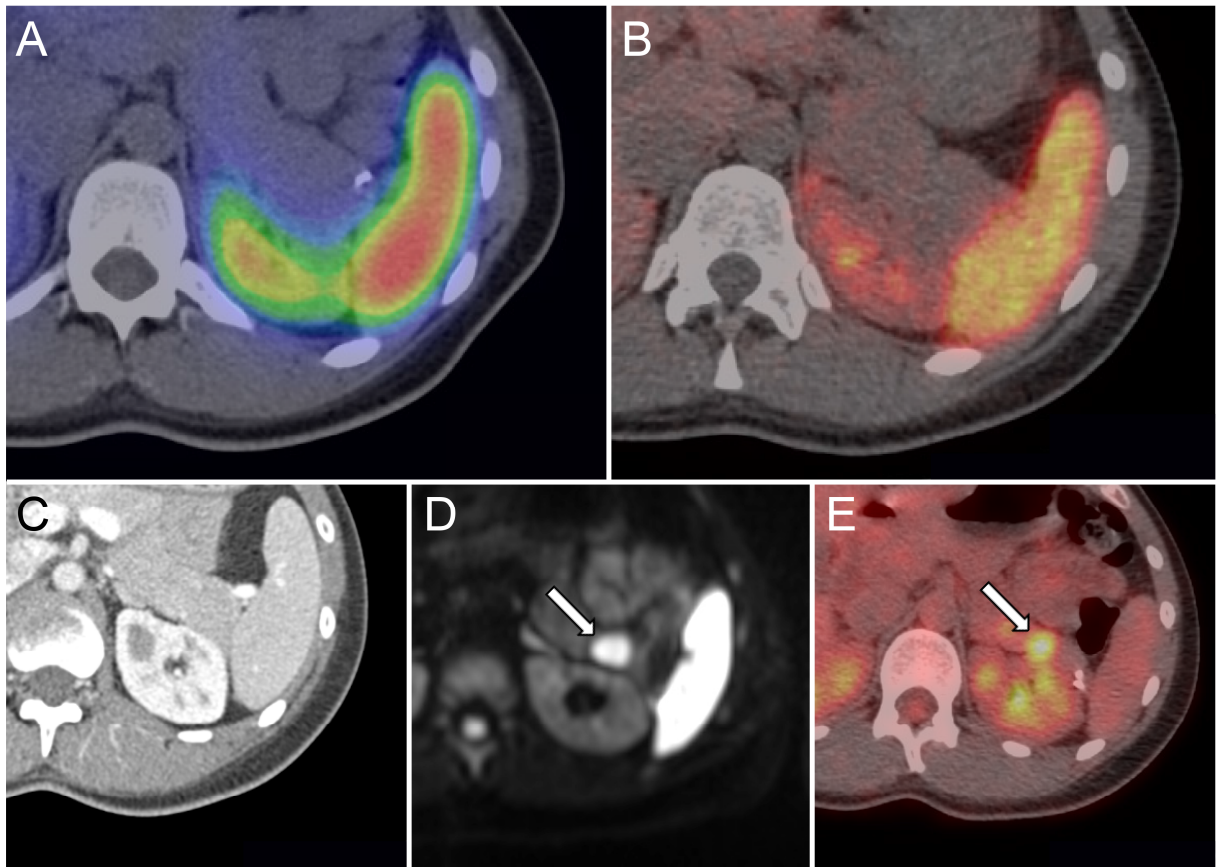
15. Morgat C, Mazère J, Fernandez P, Buj S, Vimont D, Schulz J et al. A phantom-based method to standardize dose-calibrators for new  $\beta^+$ -emitters. *Nucl Med Commun*. 2015,36(2):201-6.
16. Bombardieri E, Ambrosini V, Aktolun C, Baum R, Bishof-Delaloye A, Del Vecchio S et al.  $^{111}\text{In}$ -pentetreotide scintigraphy: procedure guidelines for tumour imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010,37(7):1441-8.
17. Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE et al. One Hundred Years After "Carcinoid": Epidemiology of and Prognostic Factors for Neuroendocrine Tumors in 35,825 Cases in the United States. *J Clin Oncol*. 2008,26(18):3063-72.
18. Triponez F, Dosseh D, Goudet P, Cougard P, Bauters C, Murat A et al. Epidemiology Data on 108 MEN 1 Patients From the GTE With Isolated Nonfunctioning Tumors of the Pancreas. *Ann Surg*. 2006,243(2):265-72.
19. van Asselt SJ, Brouwers AH, van Dullemen HM, van der Jagt EJ, Bongaerts AHH, Kema IP et al. EUS is superior for detection of pancreatic lesions compared with standard imaging in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Gastrointest Endosc*. 2015,81(1):159-67.e2.
20. Barbe C, Murat A, Dupas B, Ruzsniwski P, Tabarin A, Vullierme M-P et al. Magnetic resonance imaging versus endoscopic ultrasonography for the detection of pancreatic tumours in multiple endocrine neoplasia type 1. *Dig Liver Dis*. 2012,44(3):228-34.
21. Kwekkeboom DJ, Krenning EP, Scheidhauer K, Lewington V, Lebtahi R, Grossman A et al. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Somatostatin Receptor Imaging with  $^{111}\text{In}$ -Pentetreotide. *Neuroendocrinology*. 2009,90(2):184-9.
22. Krausz Y, Keidar Z, Kogan I, Even-Sapir E, Bar-Shalom R, Engel A et al. SPECT/CT hybrid imaging with  $^{111}\text{In}$ -pentetreotide in assessment of neuroendocrine tumours. *Clinical Endocrinol (Oxf)*. 2003,59(5):565-73.
23. van Essen M, Sundin A, Krenning EP, Kwekkeboom DJ. Neuroendocrine tumours: the role of imaging for diagnosis and therapy. *Nat Rev Endocrinol*. 2014,10(2):102-14.
24. Pavel M, Baudin E, Couvelard A, Krenning E, Öberg K, Steinmüller T et al. ENETS Consensus Guidelines for the Management of Patients with Liver and Other Distant Metastases from Neuroendocrine Neoplasms of Foregut, Midgut, Hindgut, and Unknown Primary. *Neuroendocrinology*. 2012,95(2):157-76.
25. Ambrosini V, Campana D, Tomassetti P, Fanti S.  $^{68}\text{Ga}$ -labelled peptides for diagnosis of gastroenteropancreatic NET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2012,39(S1):52-60.
26. Schreiter NF, Bartels A-M, Froeling V, Steffen I, Pape U-F, Beck A et al. Searching for primaries in patients with neuroendocrine tumors (NET) of unknown primary and clinically suspected NET: Evaluation of Ga-68 DOTATOC PET/CT and In-111 DTPA octreotide SPECT/CT. *Radiol Oncol*. 2014,48(4):339-47.
27. Bertherat J, Tenenbaum F, Perlemoine K, Videau C, Alberini JL, Richard B et al. Somatostatin Receptors 2 and 5 Are the Major Somatostatin Receptors in Insulinomas: An in Vivo and in Vitro Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003,88(11):5353-60.
28. Scarsbrook AF, Thakker RV, Wass JAH, Gleeson FV, Phillips RR. Multiple Endocrine Neoplasia: Spectrum of Radiologic Appearances and Discussion of a Multitechnique Imaging Approach. *RadioGraphics*. 2006,26(2):433-51.
29. Abgral R, Leboulleux S, Déandreis D, Aupérin A, Lumbroso J, Dromain C et al. Performance of  $^{18}\text{F}$ Fluorodeoxyglucose-Positron Emission Tomography and Somatostatin Receptor Scintigraphy for High Ki67 ( $\geq 10\%$ ) Well-Differentiated Endocrine Carcinoma Staging. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011,96(3):665-71.
30. Squires M, III, Volkan Adsay N, Schuster D, Russell M, Cardona K, Delman K et al. Octreoscan Versus FDG-PET for Neuroendocrine Tumor Staging: A Biological Approach. *Ann Surg Oncol*. 2015,22(7):2295-301.

31. Garin E, Le Jeune F, Devillers A, Cuggia M, de Lajarte-Thirouard A-S, Bouriel C et al. Predictive Value of  $^{18}\text{F}$ -FDG PET and Somatostatin Receptor Scintigraphy in Patients with Metastatic Endocrine Tumors. *J Nucl Med.* 2009,50(6):858-64.
32. Ruf J, Schiefer J, Furth C, Kosiek O, Kropf S, Heuck F et al.  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC PET/CT of Neuroendocrine Tumors: Spotlight on the CT Phases of a Triple-Phase Protocol. *J Nucl Med.* 2011,52(5):697-704.
33. Eberlein U, Lassmann M. Dosimetry of  $^{68}\text{Ga}$ -labeled compounds. *Appl Radiat Isot.* 2013,76:70-4.
34. Schreiter N, Brenner W, Nogami M, Buchert R, Huppertz A, Pape U-F et al. Cost comparison of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-octreotide scintigraphy and  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC PET/CT for staging enteropancreatic neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2012,39(1):72-82.
35. Yang J, Kan Y, Ge BH, Yuan L, Li C, Zhao W. Diagnostic role of Gallium-68 DOTATOC and Gallium-68 DOTATATE PET in patients with neuroendocrine tumors: a meta-analysis. *Acta Radiologica.* 2014,55(4):389-98.
36. Pfeifer A, Knigge U, Binderup T, Mortensen J, Oturai P, Loft A et al.  $^{64}\text{Cu}$ -DOTATATE PET for Neuroendocrine Tumors: A Prospective Head-to-Head Comparison with  $^{111}\text{In}$ -DTPA-Octreotide in 112 Patients. *J Nucl Med.* 2015,56(6):847-54.
37. Wild D, Fani M, Fischer R, Del Pozzo L, Kaul F, Krebs S et al. Comparison of somatostatin receptor agonist and antagonist for peptide receptor radionuclide therapy: A pilot study. *J Nucl Med.* 2014,24(114):138834.
38. Morgat C, Mishra AK, Varshney R, Allard M, Fernandez P, Hindie E. Targeting Neuropeptide Receptors for Cancer Imaging and Therapy: Perspectives with Bombesin, Neurotensin, and Neuropeptide-Y Receptors. *J Nucl Med.* 2014,55:1650-7.

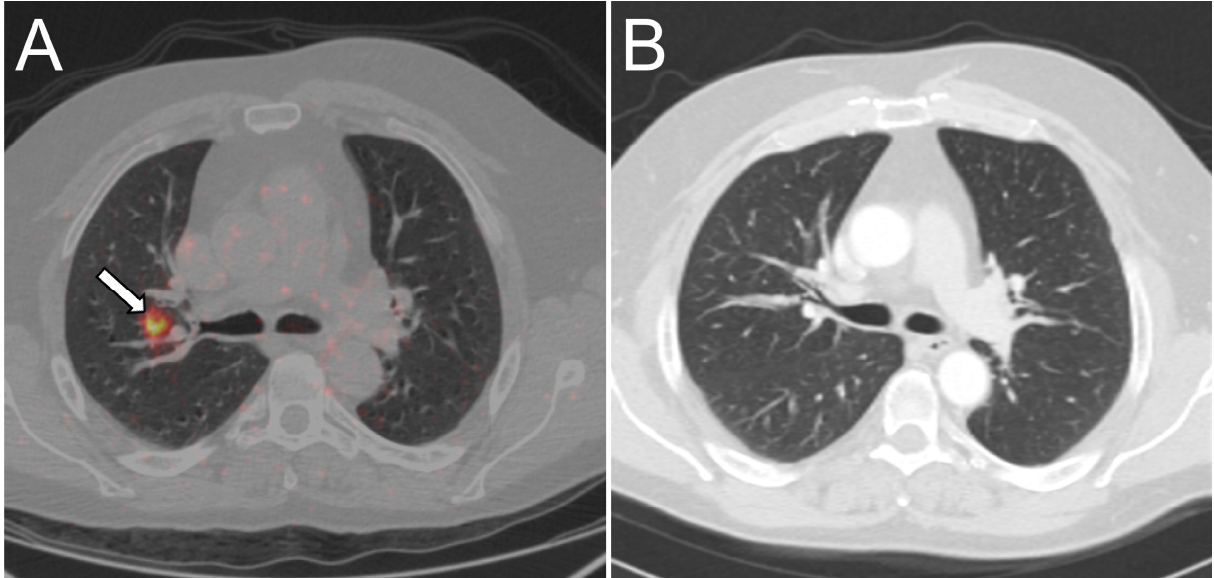
**FIGURE**



**Figure 1** Neuroendocrine tumor of the pancreatic tail unseen by  $^{111}\text{In}$ -pentetreotide Single-photon emission computed tomography/computed tomography (A: axial image) but depicted (arrows) with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC positron emission tomography/computed tomography (B: axial image), with contrast-enhanced computed tomography (C: axial image in arterial phase) and magnetic resonance imaging (D: T1-weighted image after gadolinium injection in arterial phase)



**Figure 2** Rapidly growing neuroendocrine tumor of the pancreatic tail unseen with  $^{111}\text{In}$ -pentetreotide single-photon emission computed tomography/computed tomography (A: axial image) nor with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC positron emission tomography/computed tomography (B: axial image) and contrast-enhanced computed tomography (C: axial image in arterial phase) but depicted (arrows) by magnetic resonance imaging (D: diffusion-weighted image after gadolinium injection in arterial phase) with focal intense uptake of  $^{18}\text{F}$ -FDG positron emission tomography/computed tomography (E: axial image)



**Figure 3** Bronchial neuroendocrine tumor depicted by  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC positron emission tomography/computed tomography (A: axial image) but unseen with contrast-enhanced computed tomography (B: axial image in arterial phase)

**TABLE 1: Clinical features of MEN1 patients**

<b>Patients number</b>	<b>Sex</b>	<b>Age at diagnosis</b>	<b>Age at inclusion</b>	<b>Associated MEN1 lesions*</b>	<b>Previous pancreatic surgery</b>	<b>Complementary imaging</b>
P1	F	43	45	1	Yes (insulinoma)	Yes Abdominal MRI
P2	M	52	66	1,2	No	Yes Abdominal MRI, <sup>18</sup> F-FDG PET/CT
P3	M	22	30	1,3	No	Yes Abdominal MRI, EUS
P4	F	26	37	1	No	Yes Abdominal MRI, EUS
P5	F	29	40	1,2	No	Yes Abdominal MRI
P6	F	39	45	1,2,4	No	Yes Abdominal and brain MRI, <sup>18</sup> F-FDG PET/CT
P7	F	32	39	1,2,5	Yes (gastrinoma)	Yes Abdominal MRI, EUS
P8	M	58	64	1	No	Yes EUS
P9	F	48	55	1,2	No	No
P10	M	29	44	1,3	No	No
P11	F	15	52	1,2	No	Yes Abdominal MRI, EUS
P12	F	17	26	1	Yes (insulinoma)	Yes Abdominal MRI, EUS, <sup>18</sup> F-FDG PET/CT
P13	F	18	36	1,2	No	No
P14	F	55	58	1	Yes (NF)	No
P15	M	11	31	1,2	No	No
P16	F	50	63	1,2,4	No	No
P17	F	27	54	1,2,4	No	Yes Abdominal MRI
P18	M	55	70	1,2	Yes (gastrinoma)	Yes Abdominal MRI
P19	M	14	45	1,2	No	Yes Abdominal and brain MRI, EUS, Bronchial endoscopy

Abbreviations: P = patient; F = female; M = male; NF = Non-functioning

ZES =Zollinger-Ellison syndrome

\*1: primary hyperparathyroidism; 2: pituitary adenoma; 3: lung neuroendocrine tumor; 4: non-secreting adrenal nodules; 5: bilateral adrenal carcinoma

**TABLE2: Results of <sup>68</sup>Ga-DOTA-TOC PET/CT, SRS and CE-CT for the detection of dpNETs: per-lesion analysis**

	TP	TN	FP	FN	Sensitivity (%)	Specificity (%)
<sup>68</sup> Ga-DOTA-TOC PET/CT	57	4	0	18	76	100
SRS	15	2	2	60	20	50
CE-CT	45	2	2	30	60	50
<i>P</i> value					< 0.0001	< 0.01

Abbreviations: PET/CT= positron emission tomography/computed tomography; SRS = scintigraphy with <sup>111</sup>In-pentetreotide; CE-CT = contrast-enhanced computed tomography; TP = True Positive; TN = True Negative; FP = False Positive; FN = False Negative

**TABLE 3: Organ-related findings according to unblinded analysis of imaging procedures**

Lesion localization	<sup>68</sup> Ga-DOTA-TOC PET/CT	SRS	CE-CT
Pancreas lesions	46	11	37
- Head	11[2-22]*	4 [7-22]	9 [2-22]
- Isthmus	3 [7-18]	1 [18]	4 [5-18]
- Body	13 [9-25]	2 [22-25]	7 [6-25]
- Body/tail junction	4 [7-14]	2 [14]	4 [7-14]
- Tail	13 [3-45]	1 [23]	11 [3-45]
- Uncus	2 [11-12]	1 [12]	2 [11-12]
Lymph nodes	5 [2-14]	2 [8-14]	4 [8-25]
Duodenum	6 [3-13]	2 [6-13]	2 [9-13]
Lung	1	1	0
Thymus	1	1	1
Brain	3	0	NS
Liver metastasis	0	0	2
Total of positive lesions	62	17	46
Total of invaded organs	6	5	5

Abbreviation: NS = Non-Suitable; PET/CT = positron emission tomography/computed tomography; SRS = scintigraphy with <sup>111</sup>In-DTPA-pentetreotide; CE-CT = contrast-enhanced computed tomography

\*: In brackets: range size of the lesions (mm)



## Chapitre 3

---

### **Exploration d'autres tumeurs en vue d'élargir le champ d'application des analogues radiomarqués de la somatostatine**

Outre les tumeurs neuro-endocrines, les récepteurs de la somatostatine sont exprimés dans de nombreuses tumeurs humaines. Une publication récente, suivie d'un "case report", ont montré que les carcinomes naso-pharyngés exprimant le Virus Epstein-Barr (EBV) présentent également une captation importante d'analogues radiomarqués de la somatostatine (76,77). La question que nous a semblé soulever ces données préliminaires est: *L'expression des récepteurs de la somatostatine est-elle liée à l'infection virale à EBV?*

Pour répondre à cette problématique, une collaboration avec le service d'anatomopathologie de l'Hôpital Haut-Lévêque du CHU de Bordeaux a été mise en place (Dr Marie Parrens). Nous nous sommes concentrés sur les lymphomes de Hodgkin EBV-induits en raison de l'expertise de ce service et du bon recrutement de patients atteints de lymphomes.

Dans le lymphome de Hodgkin (LH), la masse tumorale est principalement constituée d'un infiltrât réactionnel de lymphocytes, éosinophiles, histiocytes et fibroblastes. Les cellules malignes « cellules de Reed-Sternberg » ne représentent qu'une faible proportion de la masse cliniquement décelable. La présence de l'EBV est relativement fréquente au sein des lymphomes de Hodgkin.

#### *Matériel et méthodes*

Nous avons recherché rétrospectivement l'expression du récepteur sst<sub>2A</sub> par immunohistochimie dans un groupe de 38 biopsies de lymphomes de Hodgkin dont 22 sont EBV-induits. Aucune récidive n'a été incluse dans cette étude. Parmi ces 38 lymphomes, l'âge moyen des patients est de 44,7 ans (médiane: 42,0 ans; min: 6 ans; max: 87 ans). Six patients ont moins de 18 ans et 28 patients sont des hommes.

#### Caractéristiques de l'anticorps

Pour ce travail nous avons utilisé un anticorps mis en œuvre en routine hospitalière pour la détection du récepteur sst<sub>2A</sub>. Il est donc validé et aucune mise au point n'a été nécessaire.

#### Evaluation de l'immunohistochimie

L'analyse semi-quantitative de la coloration de sst<sub>2A</sub> a été réalisée sous microscope à fond clair selon un score IRS (Immunoreactive score) proposé par Remmele et Stegner (78)

par un anatomopathologiste expérimenté (Dr Marie PARRENS). Nous avons également étudié rétrospectivement l'expression immunohistochimique de l'EBV-LMP (latent membrane protein) selon cette procédure. L'expression du CD15 et du CD30 sont disponibles pour tous les patients. Ce score considère l'intensité de la coloration mais également le pourcentage de cellules tumorales marquées. Pour plus de commodités, nous avons simplifié la gradation des cellules marquées. Un score IRS  $\geq 4$  pour sst<sub>2A</sub> est considéré comme positif. Un score IRS  $> 0$  est considéré comme positif pour l'EBV-LMP.

#### **Immunoréactivité et classification IRS**

<i>Pourcentage de cellules marquées</i>	<i>Intensité de marquage</i>	<i>Score IRS (0 - 9)</i>
0: pas de cellules positives	0: pas de coloration	0 - 1: négatif
1: rares cellules positives	1: coloration faible	2 - 3: faible
2: cellules modérément positives	2: coloration modérée	4 : modéré
3: nombreuses cellules positives	3: coloration intense	$\geq 6$ : fortement positif

#### Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc. Version 6.01). Un test exact de Fisher a été réalisé pour chaque paramètre clinico-biologique. Une différence statistique est significative si  $p < 0,05$ .

#### *Résultats*

Selon le score IRS défini plus haut, le marquage de sst<sub>2</sub> est absent dans 25 lymphomes, faible dans 4 tumeurs, modéré dans 1 tumeur et fort dans 8 tumeurs. Ainsi un marquage de sst<sub>2A</sub> modéré à fort est rencontré dans 9/38 (23,7 %) des lymphomes de Hodgkin étudiés. Le marquage obtenu est cytoplasmique avec un renforcement membranaire. Un marquage de type Golgien a également été observé. Les cellules tumorales, mais également certains centres germinatifs, plasmocytes et histiocytes, présentent une immunoréactivité vis à vis de sst<sub>2A</sub>.

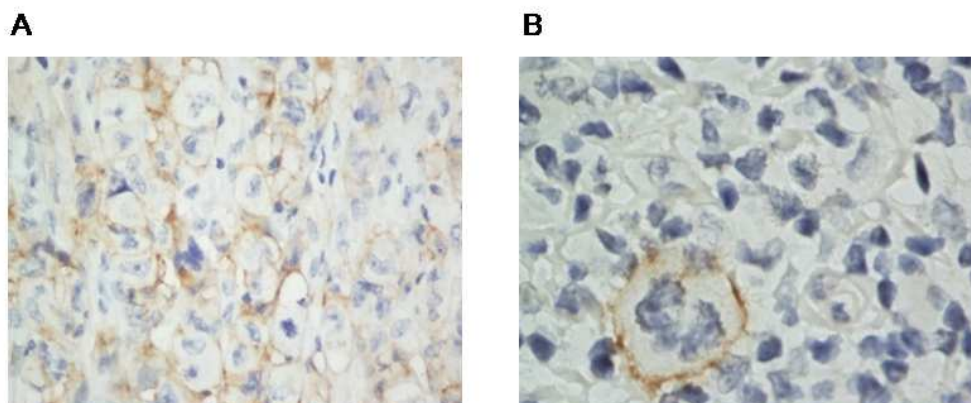


Figure 13: Immunomarquage de sst<sub>2A</sub> sur une coupe de lymphome de Hodgkin EBV-induit de type scléronodulaire. A: grossissement 20X. B: grossissement 40X.

Le **Tableau 3** montre les résultats de l'analyse univariée. Les patients de moins de 18 ans (enfants) expriment significativement plus ( $p < 0,0001$ )  $sst_{2A}$  que les patients de plus de 18 ans (adultes). Les lymphomes de Hodgkin CD15 positifs expriment significativement plus ( $p = 0,0163$ )  $sst_{2A}$  que les lymphomes de Hodgkin CD15 nul ou faible. Tous les lymphomes de Hodgkin exprimant  $sst_{2A}$  sont CD15 et CD30 positifs (données non présentées). Il n'y a pas de différence significative d'expression de  $sst_2$  en fonction du statut EBV des lymphomes de Hodgkin.

Caractéristiques	Immunoréactivité	
	$sst_{2A}$ Modéré - Fort	P
<b>Age</b>		<0,0001
< 18 ans (n=6)	6/6	
≥ 18 ans (n=32)	3/32	
<b>Sexe</b>		1,0000
Homme (n=28)	7/28	
Femme (n=10)	2/10	
<b>Epstein-Barr Virus</b>		0,4757
Pos (n=21)	6/21	
Neg (n=17)	3/17	
<b>Expression du CD15</b>		0,0163
Pos (n=26)	9/26	
Neg (n=12)	0/12	

Tableau 3: Données clinico-biologiques des lymphomes de Hodgkin étudiés

Nous avons étudié spécifiquement les populations pédiatriques et adultes quant à leur expression de  $sst_{2A}$  en fonction de leur statut EBV. Aucune différence significative n'est à signaler.

### Discussion

Dans notre travail, nous avons mis en évidence qu'environ 25% des lymphomes de Hodgkin expriment le récepteur  $sst_{2A}$ . Plus précisément, les patients jeunes expriment significativement plus  $sst_{2A}$  que les adultes  $p < 0,0001$ . En outre, tous les lymphomes exprimant  $sst_{2A}$  sont CD15+ et CD30+. Bien que notre hypothèse initiale ne soit pas confirmée, les résultats obtenus peuvent avoir des implications cliniques.

Les approches thérapeutiques actuelles sont généralement efficaces pour le traitement des lymphomes de Hodgkin chez les adultes et les enfants, avec plus de 90% de survie à long terme. Toutefois, certains patients présenteront une maladie réfractaire. De même, malgré le succès important des traitements actuels, les effets secondaires cardiaques, pulmonaires et endocrines, voire de tumeurs secondaires sont fréquents (79). Ainsi, l'identification de nouvelles cibles permettrait de proposer de nouvelles options thérapeutiques à cette population.

La présence des récepteurs à la somatostatine dans les lymphomes de Hodgkin a déjà été mise en évidence par autoradiographie sur une cohorte de 126 patients (80). Notre travail va plus loin en suggérant que l'expression de sst<sub>2A</sub> pourrait-être plus spécifique à la population pédiatrique. Nous avons choisi de nous concentrer sur sst<sub>2A</sub> car parmi les cinq sous-types de récepteurs de la somatostatine, il est de loin le plus exprimé dans les pathologies exprimant les récepteurs de la somatostatine (11).

La mise en évidence des sst<sub>2A</sub> dans cette population de lymphomes ouvre principalement la voie à l'utilisation d'analogues de la somatostatine comme nouvelle option thérapeutique pour la prise en charge de ces patients. L'expression des récepteurs de la somatostatine peut amener à des thérapies ciblées "froides" dirigées contre ces récepteurs comme cela été suggéré dans les lymphomes non Hodgkiniens (81,82). Ainsi, l'imagerie TEP/TDM au <sup>68</sup>Ga-DOTATATE (radiopharmaceutique spécifique sst<sub>2</sub>) des lymphomes de Hodgkin chez le sujet jeune permettrait de sélectionner les patients éligibles à une radiothérapie métabolique au <sup>177</sup>Lu-DOTATATE.

### *Conclusion*

Au cours de ce travail nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre l'expression de sst<sub>2A</sub> et l'infection virale à EBV. Il sera également intéressant d'étudier d'autres sous-types de récepteurs à la somatostatine. De façon intéressante, la population pédiatrique exprime fréquemment sst<sub>2A</sub>. Nous poursuivons nos travaux dans ce sens.

## Troisième partie

---

### **Une autre famille de neuropeptide innovante: la bombésine et ses récepteurs GRP-R et NMB-R**

Article 5: A new class of radiopeptide for PET imaging of bombesin receptors: <sup>68</sup>Ga-ranatensin analog. *Nucl Med Biol.* En révision.

**Clément Morgat**, Raunak Varshney, Delphine Vimont, Catherine Savona-Baron, Christel Chanseau, Sandrine Bertrand, Anil Kumar Mishra, Elif Hindié, Philippe Fernandez, Jürgen Schulz

L'utilisation *in vivo* d'antagonistes du GRP-R radiomarqués au  $^{68}\text{Ga}$ , au  $^{64}\text{Cu}$  ou au  $^{18}\text{F}$  a été récemment démontré dans le cancer de la prostate. Ceci a été possible grâce à la réalisation d'études immunohistochimiques solides sur un grand nombre d'échantillons bien caractérisés de cancer de la prostate.

Dans le **Chapitre 1**, après avoir validé en interne l'anticorps utilisé, nous avons souhaité étendre les applications du ciblage du GRP-R en étudiant l'expression de ce récepteur dans des phénotypes bien caractérisés de cancer du sein.

Dans le **Chapitre 2**, pour confirmer le fort potentiel translationnel du GRP-R, nous présentons une proposition de projet de recherche clinique innovant visant à introduire l'imagerie du GRP-R en France chez des patients atteints de cancer de la prostate.

Enfin, dans le **Chapitre 3**, nous nous sommes intéressés au développement pré-clinique d'une nouvelle classe de peptide radiomarqué qui n'a pas été encore explorée dans l'optique d'une détection exhaustive des cellules tumorales exprimant les récepteurs de la bombésine.

# Chapitre 1

## Recherche du GRP-R dans des phénotypes bien caractérisés de cancer du sein

Le cancer du sein est une pathologie hétérogène, qui peut être défini par ses caractéristiques moléculaires et donc divisée en plusieurs sous-groupes: luminal A et B, her-2 enrichi, basal-like, moléculaire apocrine, claudin low...(83). La prise en charge et le pronostic des cancers du sein dépend de plus en plus de cette classification. Les modalités d'imagerie actuelles (mammographie, IRM, ultrasons, <sup>99m</sup>Tc-sestamibi, <sup>18</sup>F-FDG) souffrent cruellement d'un manque de spécificité (84). La mise en évidence d'une surexpression de récepteurs de neuropeptides au sein d'un ou plusieurs sous-types de cancer du sein pourrait permettre de développer de nouveaux outils plus spécifiques des processus physiopathologiques. Certaines études ont documenté l'expression du GRP-R dans un pourcentage élevé de tumeurs du sein(32,85-87). Cependant, il apparaissait nécessaire d'obtenir des données sur un grand nombre de tumeurs mammaires bien caractérisées. L'objet de notre travail a été donc de préciser l'expression du GRP-R dans le cancer du sein en fonction du type histologique (carcinome canalaire invasif, carcinome lobulaire invasif...), du grade Scarff-Bloom-Richardson (SBR), de l'index de prolifération Ki-67, du phénotypage moléculaire (luminal A, luminal B, basal like, her2 enrichi, molecular apocrine, claudinlow, ...) ainsi que des marqueurs moléculaires (p53, FOXA1...). Il est également utile d'étudier l'expression du GRP-R en fonction de la stadification clinique T et N et pathologique (si la patiente a été opérée) et de l'évolution clinique des patientes.

### Matériels et Méthodes

L'anticorps anti-GRP-R utilisé dans ce projet a déjà été utilisé pour des études immunohistochimiques sur des TMA de cancer de la prostate fixés en formol et enrobés de paraffine (88). Des experts ont critiqué l'absence de validation de l'anticorps (89) mais ont par la suite validé les données obtenues avec cet anticorps par autoradiographie (90). Cet anticorps est donc validé pour son utilisation sur du matériel biologique fixé en formol et enrobé de paraffine. Les TMA de cancer du sein que possède l'Institut Bergonié, et que nous analysons au cours de ce projet, ont été fixé en Bouin de Hollande. Ainsi, nous devons valider à nouveau cet anticorps pour s'assurer de la pertinence des données obtenues. Pour cela nous avons suivi, autant que possible, les règles de validation récemment proposées par Reubi (91).

## Méthodologie

La méthodologie employée au cours de ce travail est la suivante: Western blot de lysats de lignées cellulaires de cancer du sein, immunochimie de ces lignées fixées et enrobées avec le même matériel que celui utilisé pour l'élaboration du TMA, localisation subcellulaire de l'immunomarquage, identification de tumeurs positives et négatives grâce à un TMA dédié et validation de l'évaluation visuelle de l'immunohistochimie par western blotting des tumeurs congelées correspondantes. Enfin, un TMA de 1482 tumeurs a été analysé.

## Caractéristiques de l'anticorps

Pour cette étude nous avons utilisé l'anticorps polyclonal de lapin anti-GRP-R SP4337P développé par Acris Antibodies®. Le peptide immunogénique utilisé est un peptide synthétique de 18 acides aminés correspondant à la deuxième boucle extracellulaire du GRP-R humain.

## Lignées cellulaires

Différentes lignées cellulaires de cancer du sein; MCF-7 (p6), MDA-MB-453 (p5), MDA-MB-468 (p10), SKBR3 (p5), T47D (p15) et ZR75.1 (p7) ont été cultivées à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub> dans du milieu RPMI 1640 (Gibco, France) supplémenté avec 10 % (v/v) SVF, 100 U/mL de pénicilline, et 100 µg/mL de streptomycine. Ces lignées cellulaires ont ensuite été utilisées en western blot ou fixées dans du Bouin de Hollande et enrobées de paraffine pour immunocytochimie. Les caractéristiques de ces lignées cellulaires sont résumées dans le tableau ci-dessous(92). Une attention particulière a été portée à la lignée MDA-MB-453 en raison de résultats de la littérature divergents quant à son profil moléculaire, notamment concernant her-2(93). Nous avons confirmé expérimentalement que notre lignée exprime la protéine her-2.

Phénotype moléculaire	Profil immunohistochimique	Autres caractéristiques	Lignées cellulaires
<i>Luminal A</i>	RE <sup>+</sup> , PR <sup>±</sup> , HER2 <sup>-</sup>	Ki67 faible, répondeur aux anti-hormonaux, réponse variable aux chimiothérapies	MCF-7, T47-D
<i>Luminal B</i>	RE <sup>+</sup> , PR <sup>±</sup> , HER2 <sup>±</sup>	Ki67 élevé, répondeur aux anti-hormonaux, réponse variable aux chimiothérapies. Réponse au trastuzumab (si HER2 <sup>+</sup> )	ZR75.1
<i>Basal</i>	RE <sup>-</sup> , PR <sup>-</sup> , HER2 <sup>-</sup>	EGFR <sup>+</sup> et/ou cytokératine 5/6 <sup>+</sup> , Ki67 élevé, résistant aux anti-hormonaux,	MDA-MB-468



		parfois répondeur aux chimiothérapies	
<i>HER2-enrichi</i>	RE <sup>-</sup> , PR <sup>-</sup> , HER2 <sup>+</sup>	Ki67 élevé, répondeurs aux chimiothérapies et au trastuzumab	SKBR3
<i>Apocrine</i>	RE <sup>-</sup> , PR <sup>-</sup> , HER2 <sup>+</sup> , RA <sup>+</sup>		MDA-MB-453

### *Echantillons de patients pour la validation de l'anticorps*

34 tumeurs primitives de cancer du sein fixées dans du Bouin de Hollande et enrobées de paraffine, ainsi que les tumeurs congelées correspondantes (min 35mg; moy 71,8mg; SD 15,3mg; médian 70mg) ont été obtenues de patientes opérées à l'Institut Bergonié. Pour les tumeurs congelées, une coloration HES a été réalisée, avant l'extraction des protéines, pour la détermination du pourcentage de cellules tumorales. Tous les échantillons avaient plus de 50% de cellules tumorales, moyenne 62,9%, SD 10,8% et médiane 60%. Les échantillons de tumeurs congelées ont été traités en Western Blot et les tumeurs fixées dans du Bouin de Hollande ont été analysées en immunohistochimie comme précédemment décrit. L'analyse visuelle de l'IHC a été comparée à la semi-quantification en Western Blot.

### *Western Blotting*

Les cellules ont été lysées en tampon RIPA supplémenté en inhibiteurs de protéases (EASYPack, Roche®). Les protéines membranaires ont été dénaturées à 85°C pendant 5 minutes avec du Laemmli buffer 4x. Des quantités équivalentes de protéines (20µg) ont été soumises à une électrophorèse à 130V pendant 90 minutes sur un gel de polyacrylamide SDS puis transférées sur une membrane de PVDF avec un courant constant de 200mA pendant 2 h. Les membranes ont été bloquées dans du PBS contenant 5% (m/v) de BSA pendant 1h puis incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire anti-GRP-R(1:500, SP4337P, Acris Antibodies) et l'anticorps primaire monoclonal de souris anti-GAPDH (1:10000, ab8245, Abcam). Le complexe antigène-anticorps est visualisé à l'aide d'anticorps secondaire adaptés: anticorps polyclonal de singe anti-lapin IRDye 680 (1:10000, 611-144-002, Rockland) et l'anticorps polyclonal de chèvre anti-souris and IRDye 800 (1:10000, 610-132-003, Rockland). Le signal est enregistré à l'aide d'un système Lycor. La semi-quantification du signal a été réalisée avec le logiciel ImageJ 1.45s (<http://imagej.nih.gov/ij>, National Institute of Health, USA)

### *Tissue Micro-Array*

Des échantillons de cancers mammaires de 1482 patientes ont été inclus dans cette étude. Les lames des TMA sont composées de 4 spots de 0,3µm de diamètre pour chaque tumeur fixée. Ce projet a en outre permis de compléter les données associées à ces TMA en

recherchant l'amplification du gène *HER2* en FISH pour les cas HER2 2+ en IHC (87 cas) et la protéine Ki-67 en IHC sur tous les échantillons. Après la réalisation des diverses techniques d'IHC et de FISH, 1438 tumeurs étaient exploitables.

### *Immunohistochimie*

Pour les immunomarquages, des coupes de 4 µm d'épaisseur ont été réalisées à partir de lignées cellulaires ou des TMA fixés en Bouin de Hollande et enrobés de paraffine puis montés sur lames. L'immunohistochimie a été réalisée sur un automate de marquage. L'automate Ventana Benchmark a été utilisé conformément aux procédures du fabricant. Le démasquage antigénique a été réalisé grâce à une solution de protéase (Protease-1, Ventana) L'anticorps primaire anti-GRP-R a été utilisé à la dilution 1/1400 et révélé par un kit de détection UltraView universal DAB.

### *Evaluation de l'immunohistochimie*

L'analyse semi-quantitative de la coloration a été réalisée sous microscope à fond clair selon un score IRS (Immunoreactive score) proposé par Remmele et Stegner (78). Ce score considère l'intensité de la coloration mais également le pourcentage de cellules tumorales marquées. Dans cette étude, les scores IRS  $\leq 3$  seront classés en expression faible et les scores IRS  $\geq 4$  seront regroupés en "expression forte".

#### **Immunoréactivité et classification IRS**

<i>Pourcentage de cellules marquées</i>	<i>Intensité de marquage</i>	<i>Score IRS (0 - 12)</i>	<i>Classification</i>
0: pas de cellules positives	0: pas de coloration	0 - 1: négatif	0-3 : expression faible
1: $\leq 10\%$ de cellules positives	1: coloration faible	2 - 3: faible	
2: 11 - 50% de cellules positives	2: coloration modérée	4 - 8: modéré	$\geq 4$ : expression forte
3: 51-80% cellules positives	3: coloration intense	9 - 12: fortement positif	
4: $> 80\%$ de cellules positives			

Tableau 4: Score IRS et classification IRS pour l'évaluation de l'immunohistochimie

### *Analyse statistique*

Les analyses statistiques définitives des lectures effectuées seront réalisées par le pôle biostatistiques de l'Institut Bergonié avant publication. Nous avons d'ores et déjà effectué les premières analyses statistiques à l'aide du logiciel GraphPadPrism (GraphPad Software, Inc. Version 6.0). Un test de Wilcoxon, un  $\chi^2$  et une corrélation de Pearson ont été également réalisés. Une différence statistique est significative si la valeur de  $p < 0,05$ .

## Résultats

En western blot, une seule bande au poids moléculaire attendu du GRP-R est visible. L'étude de l'expression du GRP-R en western blot sur différentes lignées cellulaires montre que l'expression du GRP-R est forte dans les lignées cellulaires MCF-7 et ZR75.1 et modérée dans la lignée SKBR3. Les lignées MDA-MB-453, MDA-MB-468 et T47-D n'expriment que faiblement le GRP-R. (**Figure 14**)

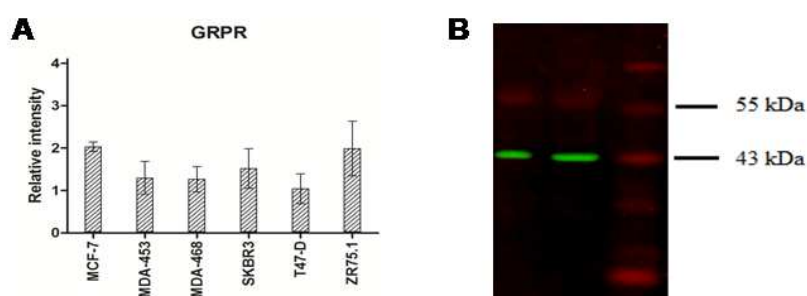


Figure 14: **A**: Expression relative du GRP-R dans différentes lignées cellulaires de cancer du sein. **B**: Western blot représentatif du GRP-R (réalisé à partir de lysats de tumeurs congelées). Une seule bande rouge au poids moléculaire attendu du GRP-R (43 - 64 kDa, donnée fournie par le fabricant) est visible confirmant la spécificité de l'anticorps utilisé. La bande verte est celle de la GAPDH.

L'analyse des lignées cellulaires révèle une bonne concordance entre le signal obtenu en WB et les immunomarquages des culots fixés au Bouin de Hollande, **Tableau 5**.

Lignées cellulaires	Expression GRP-R	
	WB	ICC Bouin Hollande
MCF-7	Pos	Pos/Faible
MDA-453	Faible	Faible
MDA-468	Faible	Faible
SKBR3	Mod	n.d
T47-D	Faible	Faible
ZR75.1	Pos	Pos
Contrôle positif (pancréas)	n.d	Pos +++
Pos: Positif		
Mod: Modéré		
n.d : non déterminé		
WB: Western Blot		
ICC: ImmunoCytoChimie		

Tableau 5: Comparaison des signaux obtenus en western blot et en immunocytochimie sur cellules fixées en Bouin de Hollande.

Pour valider l'évaluation visuelle de l'immunohistochimie, 34 échantillons de patientes ont été étudiés en western blot et en immunohistochimie. Les tumeurs "0" et "1+" en IHC ont une faible expression du GRP-R en western blot. Les tumeurs "2+" et "3+" présentent une expression du GRP-R plus importante. Pour les analyses statistiques, les tumeurs "0" et "1+" ont été regroupées en "low" et les tumeurs "2+" et "3+" en "high". Une différence fortement significative est mise en évidence entre les groupes "low" et "high" ( $p < 0,0001$ ).

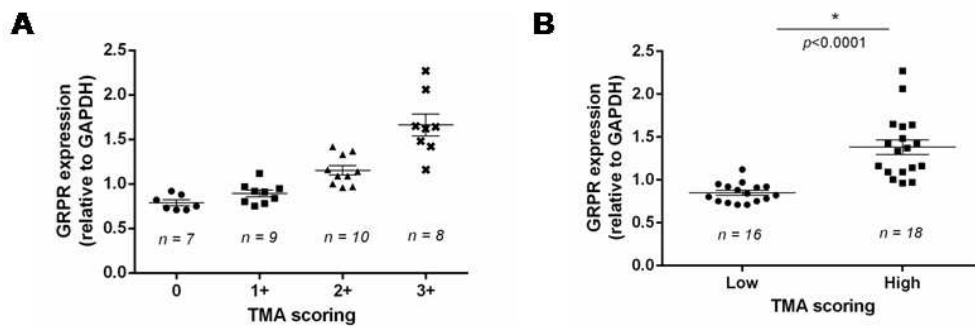


Figure 15: Concordance des signaux obtenus en western blot et en immunohistochimie. A: L'expression du GRP-R est quantifiée en 4 groupes (0, 1+, 2+ et 3+). B: Pour les statistiques, les groupes 0 et 1+ ont été regroupés en "low" et les groupes 2+ et 3+ en "high".

En IHC, le GRP-R montre une immunoréactivité cytoplasmique à renforcement membranaire sur les TMA étudiés **Figure 16**.

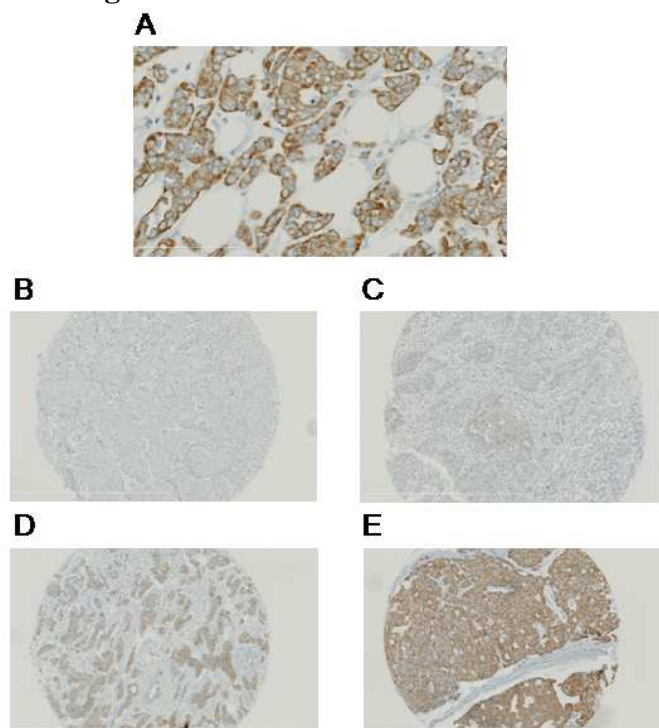


Figure 16: A: Immunomarquage cytoplasmique à renforcement membranaire du GRP-R (grossissement 20X). B: Exemple d'immunoréactivité négative (grossissement 10X). C: Exemple d'immunoréactivité faible (grossissement 10X). D: Exemple d'immunoréactivité modérée (grossissement 10X). E: Exemple d'immunoréactivité fortement positive (grossissement 10X).

Selon les critères définis pour l'évaluation des immunomarquages, le GRP-R est absent dans 146 tumeurs (10,2 %), faible dans 204 tumeurs (14,2 %), modéré pour 513 tumeurs (35,6 %) et fort dans 575 tumeurs (40,0 %).

Une corrélation inverse significative est mise en évidence entre les protéines GRP-R et HER2 d'une part (coefficient de corrélation (CC) = -0,08;  $P = 0,0023$ ) et GRP-R et Ki-67 d'autre part (CC = -0.288;  $P < 0,0001$ ).

Caractéristiques	IHC GRP-R		P
	Modéré+Fort	Faible+absent	
<b>Statut HER2</b>			0,0004
HER2 <sup>+</sup> (n=147)	93	54	
HER2 <sup>-</sup> (n=1291)	995	296	
<b>Statut tumoral</b>			<0,0001
pT1(n=1068)	840	228	
pT2(n=352)	237	115	
pT3(n=18)	11	7	
<b>Ki-67</b>			<0,0001
≥20%(n=320)	160	160	
<20%(n=1118)	928	190	

Tableau 6: Tableau de contingence entre l'expression du GRP-R et les données HER2, de statut tumoral et de Ki-67.

### Discussion

Pour la réalisation d'études immunohistochimiques solides pouvant avoir de futures implications cliniques, la pertinence des informations fournies par un anticorps est capitale. Dans cette optique, des recommandations ont récemment été émises (91). Les données *in vitro* que nous avons obtenues valident la méthodologie d'immunochimie ainsi que l'anticorps utilisé pour l'étude des *Tissue Micro-Array*.

L'analyse des TMA révèle qu'environ 90% des tumeurs sont positives pour le GRP-R et environ 75% présentent une immunoréactivité modérée à forte pour le GRP-R. Cette valeur confirme de précédentes études réalisées sur un nombre restreints d'échantillons dans lesquelles 96% des tumeurs étudiées expriment le GRP-R et 56-62% des tumeurs expriment fortement le GRP-R(32,94). Dans notre travail, nous avons démontré que le GRP-R est inversement corrélée à l'expression de HER2 et de l'index de prolifération Ki-67. Les cancers du sein du groupe luminal A ont généralement un bas grade histologique (SBR I), une activité mitotique faible, ne sur-expriment pas la protéine HER2 et comprennent des types histologiques particuliers (tubulaire, invasif, cribriforme, mucineux et lobulaire). Ce phénotype est également caractérisé par de hauts niveaux d'expression de RE et de faibles niveaux d'expression des gènes de prolifération. Ce phénotype exprime aussi des marqueurs luminaux comme les cytokératines 8 et 18, des gènes associés aux fonctions de RE tels que *LIVI*, *FOXA1*, *XBPI*, *GATA3*, *BCL2*, *erbB3* et *erbB4*. Les patientes atteintes de cancers du

sein luminal A ont un bon pronostic: le taux de rechute est significativement plus faible que dans les autres sous-types. Le traitement de ce phénotype est principalement basé sur les thérapies anti-hormonales car il répond peu aux chimiothérapies (95). Nos résultats, encore incomplets, suggèrent que le GRP-R pourrait être un des marqueurs moléculaires associés au phénotype luminal A. Ces données confirmeraient celles obtenues très récemment par Dalm *et al* qui ont montré, sur 684 échantillons de tumeurs mammaires humaines congelées, que le GRP-R est plus fréquemment exprimé dans les tumeurs RE et RP positives, de grade I, de faible taille pathologique mais n'exprimant pas HER2(33). Cependant, les auteurs se sont limités à étudier l'ARNm des différents marqueurs moléculaires (GRP-R, RE, RP et HER2) ce qui restreint la dimension clinique de ces informations. Il a déjà été montré que le GRP-R est un gène rapporteur de RE (86). Dalm *et al* ont ici démontré que le GRP-R est prédictif de l'efficacité du tamoxifène. L'imagerie TEP/TDM avec des analogues radiomarqués du GRP (<sup>68</sup>Ga-RM2 par exemple) permettrait de sélectionner et suivre les patientes bénéficiant de thérapies anti-hormonales. L'imagerie TEP/TDM des récepteurs aux œstrogènes avec le 16 $\alpha$ -<sup>18</sup>F-fluoro-17 $\beta$ -estradiol (<sup>18</sup>F-FES) peut également être utilisée dans cette indication(96). Des comparaisons entre ces deux radiopharmaceutiques pour l'imagerie des cancers du sein RE+ seront utiles.

En termes de survie, aucune corrélation significative n'a pu être démontrée entre l'expression du GRP-R et la survie sans rechute, la survie sans métastases et la survie globale. Ce résultat est surprenant car leurs données semblent indiquer que le GRP-R soit sur-exprimé dans le phénotype luminal A qui possède un bon pronostic. Dans cette même étude, les auteurs ont également démontré que l'ARNm de CXCR4 (récepteur aux chémokines) est sur-exprimé dans les tumeurs RE- mais est associé à un bon pronostic, ce qui constitue également un résultat très étonnant en raison du plus mauvais pronostic des tumeurs n'exprimant pas RE et pose donc la question de la pertinence de l'étude de l'ARNm.

### *Conclusion*

Lorsque nos données seront complètes, elles apporteront un éclairage nouveau, plus accès sur la faisabilité clinique d'un ciblage du GRP-R. L'étude statistique est en cours et l'interprétation des résultats sera terminée en décembre 2015. Si nous confirmons que le GRP-R est sur-exprimé dans le phénotype luminal A, cette information sera intéressante comme marqueur supplémentaire pour affiner l'évaluation pronostique et thérapeutique des patientes atteintes de cancers du sein luminaux A.

## Chapitre 2

### **Proposition d'un projet de recherche clinique innovant pour introduire l'imagerie du GRP-R en France chez des patients atteints de cancer de la prostate**

L'intérêt du ciblage du GRP-R dans le cancer de la prostate a été démontré en Suisse et aux Etats-Unis par deux études récentes en imagerie moléculaire TEP(53,54). C'est dans ce cadre que nous avons proposé un projet de recherche clinique utilisant un analogue radiomarqué du GRP (le  $^{68}\text{Ga-RM2}$ ) de façon à introduire cette nouvelle modalité d'imagerie en France. Ce projet d'imagerie clinique sera par la suite étendu au cancer du sein à la lumière des résultats obtenus quant à l'expression du GRP-R dans différents sous-types de cancer du sein.

Les données récentes de la littérature indiquent que les patients atteints d'un cancer de la prostate de bas grade et de faible risque peuvent être éligibles à une surveillance active ou à des traitements focaux en remplacement d'une prostatectomie totale sans diminution de la mortalité et avec une diminution de la morbidité et de son impact sur la qualité de vie. Les auteurs de ces études ont montré que deux tiers des hommes diagnostiqués avec un cancer de la prostate localisé ont une maladie à faible risque mais 90 % bénéficient d'une chirurgie (97,98). De plus, la prostatectomie totale possède des risques de complications urinaires et sexuelles ce qui diminue la qualité de vie de ces patients (99). Ainsi, le point fondamental pour la prise en charge du cancer de la prostate localisé est de disposer d'outils spécifiques et non invasifs pour sélectionner les patients éligibles à une surveillance active ou à des traitements focaux. La faible performance du médicament radiopharmaceutique de référence en oncologie nucléaire, le  $^{18}\text{F-FDG}$ , pour la détection du cancer de la prostate, est due à la faible activité glycolytique des cancers de la prostate bien différenciés. Ceci a stimulé le développement d'autres radiopharmaceutiques pour l'imagerie TEP/TDM, comme la  $^{18}\text{F-Fcholine}$ . Ce médicament radiopharmaceutique est aujourd'hui largement utilisé en pratique clinique mais ne permet pas de différencier une hyperplasie bénigne de cellules prostatiques d'un carcinome de la prostate ce qui limite sa valeur diagnostique (13,100). Ainsi, des efforts ont été réalisés pour développer de nouveaux radiopharmaceutiques plus sensibles et spécifiques pour l'imagerie TEP/TDM du cancer de la prostate avec notamment pour objectif la sélection des patients éligibles à une surveillance active ou à des traitements focaux. **C'est dans ce contexte que nous avons proposé un projet de recherche innovant "UROPET: Etude monocentrique, exploratoire comparant les performances diagnostiques de la TEP/TDM au  $^{68}\text{Ga-RM2}$  vs  $^{68}\text{Ga-PSMA}$  chez des patients atteints de cancer localisés candidats à une prostatectomie totale"** dans le cadre de l'Appel à Projet Interrégional Cancer 2015 (API-K) "Incitation à la Recherche en Oncologie". Le porteur du projet et radiopharmacien en charge de la conduite de l'étude est Clément Morgat et l'investigateur principal est le Dr Henri de Clermont-Gallerande, médecin nucléaire fortement impliqué dans l'imagerie nucléaire en urologie. Cette étude est réalisée en étroite

collaboration entre le service d'Urologie (Pr Grégoire Robert et Dr Gilles Pasticier), le service de Radiologie (Dr François Cornelis) et le service d'Anatomopathologie (Dr Mokrane Yacoub) de l'Hôpital Pellegrin du CHU de Bordeaux. Notre équipe est également très impliquée dans ce projet aussi bien concernant la radiochimie (Dr Jürgen Schulz et Delphine Vimont), que le traitement des images (Dr Frédéric Lamare) ainsi que l'interprétation des images (Dr Henri de Clermont-Gallerande, Pr Elif Hindié, Pr Philippe Fernandez). Enfin, nous avons établi une collaboration avec la société Piramal Imaging (filiale de Bayer) qui nous fournira gracieusement le précurseur (RM2), la référence froide ( $^{nat}\text{Ga-RM2}$ ), les données de toxicité et de dosimétrie, et nous fournira une aide pour le dépôt du dossier du médicament expérimental.

### ***Hypothèses de travail***

Parmi les nouveaux traceurs pour le cancer de la prostate l'analogue radiomarqué du gastrin-releasing-peptide ( $^{68}\text{Ga-RM2}$ ) pourrait permettre de bien cibler les foyers de cancer prostatique et semble offrir une très grande sensibilité, notamment pour les contingents bien différenciés (52,53). Néanmoins, la biopsie peut sous-estimer le grade tumoral (101). Le  $^{68}\text{Ga-PSMA}$  est un radiopharmaceutique très prometteur pour l'imagerie de cancers de la prostate de plus hauts risques (15,102-105) Ainsi, en raison des résultats récents obtenus avec ces deux traceurs très prometteurs et qui semblent offrir des informations complémentaires devant permettre de couvrir l'ensemble des contingents tumoraux, nous souhaitons proposer aux patients diagnostiqués avec un cancer de la prostate localisé (risques faible et intermédiaire), une double imagerie pour identifier les différentes populations cellulaires selon leurs risques métastatiques.

Notre projet permettra de fournir les premières données comparatives de ces deux médicaments radiopharmaceutiques chez des patients atteints de cancer de la prostate localisés et positionner le CHU de Bordeaux comme centre Français d'innovation dans l'imagerie nucléaire du cancer de la prostate.

### ***Schéma de la recherche***

Il s'agit d'une étude préliminaire, prospective, monocentrique, comparant les performances diagnostiques de la TEP/TDM au  $^{68}\text{Ga-PSMA}$  et au  $^{68}\text{Ga-RM2}$  dans une cohorte de 15 patients atteints de cancer de la prostate candidats à la prostatectomie par rapport à l'étalon or que représente l'anatomopathologie de la pièce opératoire et des éventuels ganglions.

Les patients diagnostiqués avec un cancer de la prostate localisé seront discutés en réunion de concertation pluridisciplinaire urologique pour la décision des options thérapeutiques après réalisation du bilan d'imagerie standard. Si la décision opératoire (prostatectomie totale) est prise, un consentement libre et éclairé est signé et les patients nous seront adressés pour la réalisation de l'étude.



- La TEP/TDM au <sup>68</sup>Ga-PSMA et la TEP/TDM au <sup>68</sup>Ga-RM2 seront réalisées dans un intervalle de 2 à 28 jours. Un délai de 6 semaines après les biopsies et l'imagerie par IRM sera respecté.
- La prostatectomie avec ou sans curage ganglionnaire est ensuite réalisée dans les 2 mois suivant la dernière imagerie TEP/TDM.
- Une interprétation centralisée des images TEP/TDM (en aveugle des résultats anatomopathologiques) sera réalisée. Un rapport complet sera envoyé au comité local pluridisciplinaire,
- Une analyse anatomopathologique (en aveugle des résultats des TEP/TDM) de la pièce opératoire et des éventuels ganglions sera réalisée,
- Analyse sur lame: la spécificité de la liaison des médicaments radiopharmaceutiques sera confirmée en comparant les données immunohistochimiques (à l'aide d'anticorps validés que nous possédons déjà) aux données obtenues en autoradiographie

### Calendrier prévisionnel d'exécution du projet

Le projet API-K "UROPET" se déroule sur 24 mois dont 13 mois de participation patient. Les pré-requis administratifs à l'utilisation du <sup>68</sup>Ga-RM2 et du <sup>68</sup>Ga-PSMA chez l'Homme sont l'accord du CPP et la rédaction et le dépôt des dossiers du médicament expérimental (DME) pour l'obtention de l'autorisation d'essai clinique de l'ANSM. Ceci sera réalisé lors des 3 premiers trimestres de ce projet.

A la suite de la dernière TEP/TDM le patient sort de l'étude et bénéficie dans un délai de 2 mois de la prostatectomie. Le projet UROPET ré-intervient après la prostatectomie sous forme d'expériences *in vitro* sur lames (pas de participation patient).

Le diagramme de GANTT ci-dessous résume le calendrier prévisionnel de ce projet

	Trimestres							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Accord CPP et rédaction et dépôt des dossiers du médicament expérimental								
TEP/TDM au <sup>68</sup> Ga-RM2 et au <sup>68</sup> Ga-PSMA (durée participation patients)								
Prostatectomie (Soin courant)								
Etudes sur lames								

Figure 17: Diagramme de GANTT du projet UROPET

## Chapitre 3

### Développer de nouveaux analogues de la bombésine à Bordeaux

Bien que les efforts fournis dans le développement d'analogues du GRP aient abouti à la faisabilité d'une détection *in vivo* du GRP-R chez l'Homme, une voie encore non explorée est celle de la ranatensine. Ce peptide possède une forte affinité pour les deux sous-types de récepteurs humains de la bombésine NMB-R et GRP-R(106). Nous nous sommes donc intéressés à l'utilisation de la ranatensine de façon à obtenir un ciblage des récepteurs de la bombésine pour une détection exhaustive des cancers exprimant cette famille de récepteur.

Le dérivé de laranatensine (Aib-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe-Met-CONH<sub>2</sub>, RV\_15) a été synthétisé et conjugué avec de bons rendements au macrocyle DOTA. Ce chélate est particulièrement pertinent pour le radiomarquage au <sup>68</sup>Ga. La pureté radiochimique, l'hydrophilie, la stabilité, le profil pharmacologique, les affinités et la biodistribution sur souris normales strain-A et souris nudexéno-greffées avec une tumeur PC-3 ont été étudiés dans ce travail. La pureté radiochimique du <sup>68</sup>Ga-DOTA-RV\_15 est toujours > 99 %. L'analogue non radioactif, <sup>nat</sup>Ga-DOTA-RV\_15 est hydrophile et se comporte comme un agoniste vis à vis du GRP-R et de NMB-R sur les lignées cellulaires CHO et HEK. De plus, il possède des concentrations inhibitrices (CI<sub>50</sub>) de l'ordre du micro à nanomolaire (30 ± 11 nM pour le NMB-R humain et 300 ± 100 nM pour le GRP-R humain). Le <sup>68</sup>Ga-DOTA-RV\_15 a également démontré une clairance rapide *via* les reins et une captation spécifique dans le pancréas (*via* les GRP-R et NMB-R murins) sur des souris normales. Enfin, la captation tumorale du <sup>68</sup>Ga-DOTA-RV\_15 est de 1,15 % ID/g à 2 h post-injection. En conclusion, nous avons développé une nouvelle classe de radiopeptide pour l'imagerie moléculaire des récepteurs de la bombésine.

Le travail fourni par l'équipe a été valorisé par une communication affichée au congrès 2014 de l'Association Européenne de Médecine Nucléaire à Gothenburg en Suède, une communication orale au congrès mondial "Theranostics" 2015 à Baltimore aux Etats-Unis ainsi qu'à un article soumis. Par ailleurs au cours de ce projet, j'ai été lauréat du programme de mobilité "Raman-Charpak fellowship 2014" du Centre Franco-Indien pour la Promotion de la Recherche Avancée (CEFIPRA). Ce programme soutient la mobilité d'étudiants en Thèse hautement qualifiés pour qu'ils puissent réaliser une partie de leur doctorat en Inde (ou en France pour les étudiants Indiens). C'est dans ce cadre que j'ai pu effectuer un séjour de 2 mois à l'Institute of Nuclear Medicine and Allied Sciences de New Delhi en Inde (INMAS ; Pr A. K. Mishra) au cours duquel j'ai réalisé les expériences de biodistribution en collaboration avec des chercheurs Indiens expérimentés.

Il sera maintenant intéressant de réaliser l'imagerie  $\mu$ TEP du <sup>68</sup>Ga-DOTA-RV\_15 sur un modèle NMB-R<sup>+</sup>/GRP-R<sup>-</sup> ou NMB-R<sup>+</sup>/GRP-R<sup>+</sup> (l'affinité modeste du Ga-DOTA-RV\_15 pour le GRP-R risque de provoquer une augmentation notable du bruit de fond sans pour autant améliorer la captation tumorale) bien qu'à l'heure actuelle aucun modèle cellulaire exprimant spécifiquement NMB-R n'ait été développé (seules des lignées transfectées sont

actuellement utilisables). Nous nous sommes procuré un anticorps anti-NMB-R déjà utilisé par une autre équipe (107,108) en vue d'étudier nos lignées cellulaires et coupes tissulaires afin d'en identifier une pertinente pour l'évaluation d'analogues de la ranatensine. Un résultat préliminaire intéressant est la constatation d'une expression de NMB-R par des cellules tumorales de cancer du sein triple négatifs. Des analogues radiomarqués ciblant NMB-R pourraient trouver ici leur place si ce résultat préliminaire est confirmé. L'étude de NMB-R dans le cancer du sein mérite des études plus approfondies.

Article 5: A new class of radiopeptide for PET imaging of bombesin receptors:  
<sup>68</sup>Ga-ranatensin analog. *Nucl Med Biol.* En révision.

**Clément Morgat**, Raunak Varshney, Delphine Vimont, Catherine Savona-Baron, Christel Chanseau, Sandrine Bertrand, Anil Kumar Mishra, Elif Hindié, Philippe Fernandez, Jürgen Schulz

# **A new class of radiopeptide for PET imaging of bombesin receptors: <sup>68</sup>Ga-ranatensin analog**

C. Morgat<sup>a,b,c</sup>, R. Varshney<sup>d</sup>, D. Vimont<sup>b,c</sup>, C. Savona-Baron<sup>b,c</sup>, C. Riès<sup>b,c</sup>, C. Chanseau<sup>e</sup>, S. S. Bertrand<sup>b,c</sup>, A. K. Mishra<sup>d</sup>, E. Hindié<sup>a,b,c</sup>, P. Fernandez<sup>a,b,c</sup>, J. Schulz<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> *CHU de Bordeaux, Service de Médecine Nucléaire, F-33076 Bordeaux, France.*

<sup>b</sup> *Univ. Bordeaux, INCIA, UMR 5287, F-33400 Talence, France.*

<sup>c</sup> *CNRS, INCIA, UMR 5287, F-33400 Talence, France.*

<sup>d</sup> *Division of Cyclotron and Radiopharmaceutical Sciences, Institute of Nuclear Medicine and Allied Sciences, New Delhi, India 110052.*

<sup>e</sup> *Institut de bio-imagerie, UMS 3428, F-33400 Talence, France.*

CM and RV contributed equally to this work

Short running title: <sup>68</sup>Ga-ranatensin analog for PET molecular imaging

Key words: <sup>68</sup>Ga, bombesin receptors, ranatensin, PET, prostate cancer, breast cancer

Corresponding author:

Clément Morgat

University Hospital of Bordeaux, Nuclear Medicine Department, Place Amélie Raba Léon,  
33000 Bordeaux, France.

e-mail address: clement.morgat@chu-bordeaux.fr

Telephone number: 05-56-79-55-40

Fax number: 05-56-79-61-79

## ABSTRACT

**Introduction:** Gastrin-releasing peptide receptor (GRP-R) and neuromedin B receptors (NMB-R) are overexpressed in a large variety of cancers notably breast and prostate cancer. Dual-targeting of these two receptors may be of great value. We here report on the development of the first  $^{68}\text{Ga}$ -ranatensin analog for Positron Emission Tomography (PET).

**Methods:** The ranatensin derivative (Aib-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe-Met-CONH<sub>2</sub>, RV\_15) was synthesized and conjugated with good yield to the DOTA macrocycle. This chelator is particularly suitable for  $^{68}\text{Ga}$  ( $T_{1/2} = 67.71$  min,  $\beta^+$  branching = 89.14%) radiolabeling. Radiochemical purity, hydrophilicity, stability, pharmacological properties, inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) and biodistribution in normal strain-A mice were investigated.

**Results:** Radiochemical purity of the  $^{68}\text{Ga}$ -ranatensin analog was always > 97%. The non-radioactive analog, [<sup>nat</sup>Ga]Ga-DOTA-RV\_15, was found to be hydrophilic and behaves like an agonist as regard to NMB-R and GRP-R (EC<sub>50</sub> values are  $5.7 \cdot 10^{-9}\text{M}$  and  $2.4 \cdot 10^{-9}\text{M}$  respectively). Moreover, it showed micro- to nano-molar binding inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub> values were  $3.0 \pm 1.1 \cdot 10^{-8}\text{M}$  for human NMB-R and  $3.2 \pm 1.2 \cdot 10^{-7}\text{M}$  for human GRP-R) in a competitive binding assay. [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-RV\_15 is stable in plasma up to 45 minutes. Finally, this  $^{68}\text{Ga}$ -ranatensin agonist demonstrated rapid blood clearance via the kidneys and NMB-R/GRP-R-specific uptake in the pancreas in normal mice. **Conclusions and Advances in Knowledge:** : In conclusion, we have developed a novel class of radiopeptide aiming for targeting NMB-R and/or GRP-R. This compound may thus be considered as a potential PET radiopeptide for bombesin receptors molecular imaging.

## INTRODUCTION

The bombesin-like peptides (BNLP's) consist of a large number of peptides found in amphibians and mammals, including human.[1-3] The tetradecapeptide bombesin (BBN) was the first[4] to be discovered. Two BLNP are present in human: Gastrin-Releasing Peptide (GRP)[5] related to bombesin, and neuromedin B (NMB)[6] related to amphibian ranatensin and litorin.[2] GRP is a 27 amino acid peptide while NMB exists in two forms, a short (10 amino acids) and a long (32 amino acids) peptide. GRP shares with BBN the same decapeptide carboxyl-terminal sequence, except for one amino acid.[5] Neuromedin B holds a phenylalanine in the penultimate position from the C terminus, instead of the leucine found in bombesin and GRP. The bombesin receptor (BBN-R) superfamily includes four different subtypes, three of them being expressed in human: GRP-R (BB2), neuromedin B receptor (NMB-R or BB1) and BB3 (an orphan receptor).[7-9] The findings of BBN-R overexpression in various human tumors, such as breast, prostate, lung, colon, ovarian, and pancreatic cancers provide opportunities for tumor imaging by designing molecular imaging agents.[10]

GRP-R is significantly up-regulated in primary prostate carcinomas in comparison with benign tissues. However, there is loss of expression in aggressive prostate cancer with significant inverse correlation found between GRP-R expression and high prostate specific antigen (PSA) value, greater tumor size, and higher Gleason scores. Moreover, high GRP-R expression (low grade prostate cancer) was significantly correlated with androgen receptor expression.[11, 12] In breast cancer, the presence of GRP-R has been reported in more than 60% of invasive breast carcinomas, often with high density and heterogeneous distribution. Moreover metastases from patients with GRP-R-positive primary tumors were also GRP-R-positives.[13, 14] A recent study has detailed this pattern of expression and authors found a higher GRP-R expression in lymph nodes metastases than in primary tumors.[15] Survival analysis showed that patients with high GRP-R expression have a poorer prognosis than those

who showed low GRP-R expression. Finally, GRP-R mRNA was found to be correlated with estrogen receptor expression.[16]

An interesting finding is the recent discovery of the involvement of the NMB-R subtype in breast cancer. NMB-R has been identified at high levels in specific breast cancer cell lines including ER-positive cells.[17, 18] Among 63 breast cancers samples, 86% expressed NMB-R.[18] Co-targeting of GRP-R and NMB-R in ER-positive breast cancer may thus be of great value. NMB-R expression in prostate cancer has been less investigated but, approximately 15% of prostate cancers co-express GRP-R and NMB-R.[19] Other malignancies express also both NMB-R and GRP-R such as colon cancer.[20]

Therefore, targeting GRP-R and/or NMB-R in selected cancers deserves further studies as radiolabeled BBN analogs targeting both GRP-R and NMB-R might offer enhanced detection of prostate cancer lesions compared to pure (selective) GRP analogs. It is important to mention that these two receptors have limited expression in normal healthy human tissues (smooth muscle of the gastro-intestinal tract, a few scattered areas in the uterus and low-to-moderate expression in some lobules and ducts in normal breast). Several agonist radiopeptides, analogs of bombesin[14, 21-24] have been developed for this purpose with encouraging results for imaging and radionuclide therapy when investigated in mice with xenografts of GRP-R positive tumors. The most studied, AMBA and PESIN, shares the same BBN[7-14]NH<sub>2</sub> sequence.[25]

We here report on the development of ranatensin analog, a new class of radiolabeled peptides for PET molecular imaging of bombesin receptor. The novel, DOTA-Aib-substituted ranatensin analog (RV\_15), suitable for <sup>68</sup>Ga Positron Emission Tomography (PET) imaging



of GRP-R/NMB-R positive tumors, was synthesized, radiolabeled and investigated *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

A widely used approach for the development of peptide-based agent is the designing of conformationally constrained bioactive peptide derivatives. The  $\alpha$ -aminoisobutyric acid (Aib) in the peptide sequence restrict the rotation of  $\phi$ ,  $\psi$  angles within the molecule and induce conformational constraint in the peptide backbone, thereby stabilizing a desired peptide conformation. Aib has been shown to induce  $\beta$ -turn in small peptides and a helical conformation in larger peptides.[26] Aib has been incorporated into the peptide sequence to design analogs of different bioactive peptides *i.e.* chemotactic peptide,[27, 28] somatostatin,[29] GnRH,[30] parathyroid hormone,[31] and bombesin.[32]

### Material

All chemicals, unless otherwise stated, were used without further purification. Peptide synthesis was carried out using Rink-Amide AM resin (200-400 mesh, 0.71 mmol/g) from Merck. All protected amino acids (Fmoc-Aib-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Phe-OH and Fmoc-Met-OH) were L-amino acid residues and HBTU (*O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate) were purchased from Merck. DIEA (*N,N'*-diisopropylethylamine) and DMF used during coupling reaction were purchased from Sigma-Aldrich. Piperine, HOBt (1-hydroxybenzotriazole), TFA (trifluoroacetic acid), triisopropylsilane, and phenol used during deprotection and cleavage steps were purchased from Sigma-Aldrich. DOTA-NHS ester (2,2',2''-(10-(2-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy))-2-

oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid) was purchased from CheMatech.  $^{nat}\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  used to synthesize the reference peptide was purchased from Strem chemicals.  $^{68}\text{Ga}$  ( $T_{1/2} = 67.71$  min,  $\beta^+ = 89.14$  %) was obtained from a  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generator (IASON®, nominal activity 1480 MBq, Cyclotron Co., Ltd, Obninsk, Russia) as previously described.[33] 5 M Sodium chloride solution, sodium acetate buffer (pH 4.6) and phosphate buffered saline used for the radiolabeling were purchased from Sigma-Aldrich. Ultrapure 30 % HCl, deionized water and ethanol were purchased from Merck. Bombesin (H-2155) was purchased from Bachem.

High-performance liquid chromatography (HPLC) analyses were performed using a Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm, 5 μm, 1 mL/min) and the indicated conditions. Analytical HPLC system used was a JASCO system with ChromNAV software, a PU-2089 Plus quaternary gradient pump, a MD-2018 Plus photodiode array detector and a Raytest Gabi Star detector. Semi-preparative HPLC purifications were carried out using a semipreparative Phenomenex Luna C<sub>18</sub> column (250 × 10 mm, 5 μm, 5 mL/min) and the indicated conditions. Semipreparative HPLC system used was a JASCO system equipped with two PU-2086 pumps and a UV-2075 multiwavelength detector.

Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) time-of-flight (TOF) mass spectrometry (MS) was performed on a Voyager mass spectrometer (Applied Biosystems) equipped with a pulsed N<sub>2</sub> laser (337 nm) and a time-delayed extracted ion source.

## **Chemical and Radiopharmaceutical Synthesis**

### *Solid Phase Peptide Synthesis*

The ranatensin derivative (Aib-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe-Met-CONH<sub>2</sub> (RV<sub>15</sub>))

was synthesized by solid-phase synthesis onto a Liberty 1 (CEM) microwave peptide synthesizer using a Rink-Amide AM resin (200-400 mesh), applying the standard 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) strategy.[34] The resin was allowed to expand 30 min in DMF (10 mL) before synthesis. The peptide synthesis was performed at a 0.25 mmol scale starting with 352 mg of the resin.

#### *Fmoc-Deprotection (General Procedure)*

The resin-bound Fmoc peptide was treated twice with 10 mL of 20% piperidine w/ 0.1 M HOBT in DMF for 180 seconds at 70°C (45 Watts). Then the resin was washed with DMF (3 x 10 mL).

#### *HBTU/DIEA Coupling (General Procedure)*

Fmoc-Amino acid (5 equiv, 5 mL) in DMF was added to the reactor. Then, HBTU (5 equiv, 2 mL) followed by DIEA (5 equiv, 1 mL) in DMF were successively added in the reactor and the reaction mixture was heated at 70°C (45 watts) for 300 seconds. Then the resin was washed with DMF (3 x 10 mL).

#### *HBTU/DIEA Coupling (His Coupling)*

Fmoc-His-OH (5 equiv, 5 mL) in DMF was added to the reactor. Then, HBTU (5 equiv, 2 mL) and DIEA (5 equiv, 1 mL) in DMF were successively added in the reactor and the reaction mixture was heated at 50°C without microwave for 120 seconds and then under microwave at 50°C (30 Watts) for 240 seconds. The resin then was washed with DMF (3 x 10 mL).

#### *DOTA Conjugation and Final Cleavage/Deprotection*

The resin-bound, side chain protected peptide was suspended in dry DMF (20 mL). DOTA-NHS ester (476 mg, 0.625 mmol, 2.5 equiv) was added to the reaction mixture followed by triethylamine (348  $\mu$ L, 2.5 mmol, 10 equiv). The reaction mixture was heated at 50 °C for 2 days and then the resin was filtered and washed with DMF. Subsequent treatment of the resin with 2 mL TFA/water/triisopropylsilane/phenol (88:5:5:2) afforded the fully deprotected DOTA-peptide, which was precipitated and washed with cold diethyl ether. The crude product was dried *in vacuo*, purified by semipreparative HPLC. The DOTA-RV\_15 was eluted with 90% A (0.1% TFA in water) and 10% B (0.1% TFA in acetonitrile) for 2 min and 90% B gradient at 25 min. The purified fractions were collected and then lyophilized to afford DOTA-RV\_15 (198 mg, 55 %). The product was analyzed by MALDI-TOF-MS:  $m/z$   $[M + H]^+$  calcd.: 1445.7 found: 1445.6.

#### *Labeling of DOTA-RV\_15 with <sup>nat</sup>Ga (Reference Compound)*

DOTA-RV\_15 (15.5 mg, 10  $\mu$ mol) was dissolved in 1 mL of acetate buffer (pH 4.5). <sup>nat</sup>Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O (5 mg, 12  $\mu$ mol, 1.2 equiv) was added and the reaction mixture was heated at 80°C for 20 min under microwave in a Biotage Initiator Classic. The crude mixture was purified similarly to the procedure described above for DOTA-RV\_15 to give <sup>nat</sup>Ga-DOTA-RV\_15 (14 mg, 93 %) after lyophilisation. MALDI-TOF-MS:  $m/z$   $[M + H]^+$  calcd.: 1511.6 found: 1511.4.

#### *Radiolabeling of DOTA-RV\_15 with <sup>68</sup>Ga*

A fully automatic, radiopharmaceutical synthesis device (GE FastLab, GE Healthcare, GEMS Benelux, Belgium) was used for all elution and radiolabeling steps. <sup>68</sup>Ga was eluted from the <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator with 0.1 M HCl and purified/concentrated by solid phase extraction onto a Chromafix 30 PS-HCO<sub>3</sub> cartridge (Macherey-Nagel). Concentrated <sup>68</sup>Ga

(200  $\mu\text{L}$ ) was added to the reactor vial containing DOTA-RV\_15 (50, 75 or 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in 1.5 mL acetate buffer (pH 4.6). The reaction mixture was incubated at 95°C for 5 min with microwaves. The crude [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-RV\_15 was purified using a C18 cartridge (Sep-Pak Light C<sub>18</sub>, WAT023501 Waters). The purified product was eluted with 1 mL of absolute ethanol and formulated to 10 mL with phosphate-buffered saline, water sodium chloride 0.9 % (pH 7.4) and ascorbic acid 0.3 mM. The resulting solution was passed through a 0.22  $\mu\text{m}$  filter into a sterile injection vial to determine radiochemical, radionucleidic purities and pH. Specific radioactivity (SRA) was determined by the ratio between the radioactivity measured in the calibrated ionization chamber[35] and the amount of [ $^{\text{nat}}\text{Ga}$ ]-DOTA-RV\_15. The amount of the radiolabeled product was confirmed by HPLC analysis of the reference [ $^{\text{nat}}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-RV\_15. The radiochemical purity (RCP) of [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-RV\_15 was determined by HPLC and confirmed by TLC analysis. The applied gradient was 90% A (0.1% TFA in water) and 10% B (acetonitrile) for 5 min, 90% B at 26 min. and 10% B at 28 min. For TLC analysis, RCP was determined by using ITLC/SG strips (8 cm x 1 cm) and ammonium acetate (77 g/L): methanol (1:1 v/v) (free  $^{68}\text{Ga}$   $R_f \leq 0.1$  and bound  $^{68}\text{Ga}$   $R_f \geq 0.8$ ) as running buffer. Samples were also tested for endotoxins (Charles Rivers) and sterility.

## **Pharmacological Characterisation**

### *Octanol/Water Partition Coefficient*

To an eppendorf tube filled with 0.5 mL of the [ $^{\text{nat}}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-RV\_15, 0.5 mL of octanol was added. The tube was vigorously stirred by a vortex for 2 min at room temperature and the 2 layers were separated by centrifugation (4000 rpm, 3 min). Samples of 20  $\mu\text{L}$  were taken from each layer and the amount of [ $^{\text{nat}}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-RV\_15 in each layer was determined. Then  $\text{Log}P$  values were calculated.

### *Ex vivo metabolic stability*

The stability of [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-RV\_15 was investigated in human plasma at various incubation times (0, 2, 30 and 45 min) at 37 °C. PBS was used as a control. After incubation, the serum was passed through a Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge, washed with 0.5 mL PBS buffer, and then eluted with 0.5 mL ACN containing 0.1 % TFA. The PBS control was diluted with 0.5 mL acetonitrile. The elution fractions and the PBS control were analyzed by radio-HPLC. Data are expressed in percentage of initial activity and were corrected for <sup>68</sup>Ga-decay.

### *Calcium imaging*

Calcium imaging experiments have been performed as previously described on transfected cell line expressing GRP-R or NMB-R.[36] CHO cells expressing hNMB-R and HEK 293 cells expressing hGRP-R were incubated in presence of increasing concentration of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-DOTA-RV\_15 (from 3.10<sup>-10</sup> M to 3.10<sup>-5</sup> M). Control response has been determined by using NMB (10 nM) or GRP (3 nM).

### *Competitive cell binding assay*

Binding assay has been performed as previously described.[37, 38] Briefly, IC<sub>50</sub> values of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-DOTA-RV\_15 were determined by using human recombinant CHO cells transfected with human NMB-R and human recombinant HEK293 cells transfected with human GRP-R. The radioligand used was <sup>125</sup>I-Tyr<sup>4</sup>-bombesin (0.1 nM; Kd<sub>NMBR</sub> = 0.1 nM; Kd<sub>GRPR</sub> = 0.04 nM) and non specific binding was evaluated using neuromedin B (1 μM) and GRP (1 μM) respectively.

### *Normal biodistribution*

All animal experiments/protocols were performed in accordance with the guidelines of INMAS animal ethics committee (Regn. No: 8/GO/a/99/CPCSEA). Animals were sacrificed using cervical dislocation method.

To investigate the normal biodistribution of [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-RV\_15, Strain-A mice were studied. Groups of three mice per data points were used.

The labeled compound [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-RV\_15, was diluted in sterile sodium ascorbate at a concentration of (3.3 MBq /100 μL) before being distributed into syringes where radioactivity was determined before and after injection. A volume of 0.1 mL (3.7 MBq) of solution was injected into a lateral tail vein of each animal. The study of [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-RV\_15, was performed in three groups of six mice and sacrificed at 1 h and 2 h after administration. The first group was injected with 0.9 pmol of [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-RV\_15. To test the *in vivo* binding specificity, two other groups of animals were injected 62 nmol of bombesin (Bachem®) or 88 nmol of neuromedin B (Bachem®) 15 minutes before injection of the radiolabeled peptide. The mice were euthanized at 1 h *p.i.* Blood was collected by cardiac puncture.

Blood and other tissues (liver, kidney, pancreas, lungs, heart, bone, intestines and muscles) were removed from each animal and weighed before radioactivity was measured in a gamma counter and compared with the standard. The results were expressed as percentage of injected dose per gram (% ID/g) of tissue.

### **Statistical analyses**

All mean values are given as ± SD. Non linear regression of curves were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc. Version 6.01).

## RESULTS

### Radiopharmaceutical Synthesis

#### *Peptide Synthesis and Preparation of the Reference Compound [<sup>nat</sup>Ga]Ga-DOTA-RV\_15)*

Peptide synthesis was carried out using Rink-Amide AM resin following standard Fmoc strategy.[34] This peptide was synthesized onto a fully automated peptide synthesizer. Coupling of the resin-bound peptide with the activated ester of DOTA (DOTA-NHS) and cleavage were achieved in DMF at 50°C with a chemical yield of 55%. Structure of unlabeled peptide is presented in **Figure 1**. The reference compound <sup>nat</sup>Ga-DOTA-RV\_15 was obtained after HPLC purification with a yield of 93%.

#### *Radiolabeling of DOTA-RV\_15 with <sup>68</sup>Ga*

The highest non-decay corrected radiolabeling yield of <sup>68</sup>Ga ( $27.53 \pm 4.20\%$ ) with a specific activity of 2-4 GBq/μmol at 30 min after the end of the radiolabeling was obtained with 50 μg/ml of DOTA-RV\_15. The overall preparation time including quality controls was 60 min. HPLC and TLC analysis indicated that the radiochemical purity of the [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-RV\_15 preparations always exceeded 97%. Radio-HPLC chromatogram of [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-RV\_15 is shown in **Figure 2**. <sup>68</sup>Ga-DOTA-RV\_15 has a retention time of 14.7 min and was sterile and pyrogen-free (< 2EU/mL).

### Radiopharmaceutical and pharmacological properties

#### *Octanol/Water Partition Coefficient*

To establish lipophilicity of the [<sup>nat</sup>Ga]Ga-DOTA-RV\_15, octanol/water partition coefficient was determined. The compound was hydrophilic with a Log *P* value of  $-3.04 \pm 0.33$ .



### *Ex vivo metabolic stability*

[<sup>68</sup>Ga]-DOTA-RV\_15 was tested for stability in human plasma at 37°C. No significant degradation was observed within 45 minutes (**Figure 3**). After incubation in human plasma during 2, 30 and 45 min the percentage of intact peptide were respectively:  $94.2 \pm 2.8\%$ ;  $93.3 \pm 1.4\%$  and  $93.3 \pm 1.1\%$ .

### *Calcium imaging*

The effects of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-DOTA-RV\_15 on calcium release were evaluated in NMB-R transfected CHO cells and GRP-R transfected HEK293 cells. As shown in **Figure 4**, <sup>nat</sup>Ga-DOTA-RV\_15 is able to induce full control agonist response, even at low concentration ( $3.10^{-10}$  M). Non linear regression of dose-response curves, provided EC<sub>50</sub> values of  $5.7.10^{-9}$  M and  $2.4.10^{-9}$  M for NMB-R and GRP-R respectively.

### **Competitive cell binding assay**

Bombesin receptors affinities of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-DOTA-RV\_15 were determined using <sup>125</sup>I-Tyr<sup>4</sup>-bombesin as radioligand. On the human NMB-R, the IC<sub>50</sub> was  $3.0 \pm 1.1 10^{-8}$  M and on the human GRP-R, the IC<sub>50</sub> value was  $3.2 \pm 1.2 10^{-7}$  M. **Figure 5**.

### **Normal biodistribution**

A biodistribution study was performed in strain-A mice to determine cross reactivity with murine GRP-R in normal organs and to assess their blood and whole body clearance. [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-RV\_15 shows rapid blood clearance. Very high uptake was seen in the pancreas ( $25.0 \pm 6.8$  %ID/g) and the kidneys ( $42.6 \pm 8.0$  %ID/g) at 1h. The liver uptake was low and low level of radioactivity was found in other organs ( $< 3$  %ID/g). Pre-injection of bombesin reduced uptake in the pancreas ( $9.6 \pm 3.5$  %ID/g) and the kidneys ( $7.5 \pm 1.5$  %ID/g)

at 1h. Similarly, pre-injection of neuromedin B decreased uptake in pancreas ( $6.1 \pm 1.0$  %ID/g) and the kidneys ( $9.5 \pm 4.5$  %ID/g). The radioactivity wash-out was fast: the radioactivity concentration in the pancreas decreased more than 3 fold between 1 h and 2 h.

**Figure 6.**

## DISCUSSION

In this study, we synthesized the DOTA-conjugated ranatensin antagonist Aib-Gln-Trp-Ala-Gly-Val-His-Phe-Met-CONH<sub>2</sub> (RV\_15). The modified peptide bear the ranatensin Ran[7-14]-NH<sub>2</sub> sequence which shares the similar biological activity with BBN[7-14]-NH<sub>2</sub> sequence. The BBN sequence is commonly used in various radiolabeled GRP-R analogs [39, 40]. The similar biological effect of the two sequences can be explained by the high similarity in structure, with only one variation at 13 amino acid position.[7] The  $\alpha$ -aminoisobutyric acid (Aib) was used both as a hydrophilic linker and to stabilize the structure of the DOTA conjugated peptide. Aib is a naturally occurring amino acid produced by microbial sources that belongs to the class of  $\alpha,\alpha$ -disubstituted amino acids but is non proteinogenic in humans. Adding to the overall hydrophilicity, Aib is also expected to provide favorable pharmacokinetic properties such as a stronger resistance to proteases *in vivo*. Since it has been reported that BBN adopts a helical structure in the region [Asn<sup>6</sup> - Met<sup>14</sup>] [41], we incorporated the conformationally restricted Aib-amino acid, in the ranatensin sequence, aiming that it would stabilize the conformation and possibly enhance its activity. This finding is in line with a previous study showing that a rigid linker improves tumor uptake and retention.[21]

The DOTA chelate will be suitable for labeling with many radionuclides, such as <sup>68</sup>Ga or <sup>64</sup>Cu for PET imaging or <sup>177</sup>Lu, <sup>67</sup>Cu or <sup>213</sup>Bi for peptide receptor radionuclide therapy. <sup>68</sup>Ga is attractive due to its easy production through a <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator and its short half-life suitable for pharmacokinetic of many peptides.[42]

The peptide was therefore radiolabeled with  $^{68}\text{Ga}$ , with high labeling yield and specific radioactivity, which permitted the use of the radiolabeled conjugate both *in vitro* and *in vivo* experiments. No free  $^{68}\text{Ga}$  was detected after purification. The retention time of DOTA-RV\_15 increases when  $\text{Ga}^{3+}$  ion is added, most probably due to the change in geometry and overall charge of the DOTA chelator upon complexation.

The  $\text{Log}P$  value was consistent with the expected hydrophilicity. Data reveals a hydrophilic compound pointing that it should show rapid blood clearance, preferential renal excretion and low hepatobiliary excretion. For instance, it has been recently demonstrated that a marked hydrophilicity confers advantageous biodistribution of BBN analogs.[43]

Another important prerequisite for a radiopeptide designed for tumor targeting and/or therapy is its high metabolic stability in human plasma since it is mandatory for the radiolabeled peptide to reach its target intact. Moreover, a high tumor-to background ratio could be also expected if radiometabolites are as low as possible. Our results are in agreement with the expected low enzymatic degradation by plasma proteases provided by the incorporation of Aib in the ranatensin sequence.

The bombesin receptor subtype binding profile of [ $^{nat}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-RV\_15 demonstrated good to moderate binding affinities to NMB-R ( $\text{IC}_{50} = 3.1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ ) and GRP-R ( $\text{IC}_{50} = 3.4 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ) which make our ranatensin analog a non selective NMB-R/GRP-R-agonist. NMB-R affinity value is comparable with those published with other non selective analogues: AMBA[21] and DOTA-PESIN.[22] Introduction of DOTA-Aib moiety and gallium labeling might have decreased GRP-R affinity.

In this study, cell calcium imaging experiments demonstrated that [ $^{nat}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-RV\_15 is a NMB-R agonist as it induced full neuromedin B response with good  $\text{EC}_{50}$ . With respect to GRP-R, [ $^{nat}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-RV\_15 behaves also as an agonist with a similar  $\text{EC}_{50}$

although GRP-R affinity is lower than NMB-R (**Figure 4**). These data suggested that our ranatensin analog is a NMB-R/GRP-R agonist.

After administration in normal mice, [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-RV\_15 showed urinary excretion and high specific uptake is seen in pancreas (bombesin receptors-rich organ). High uptake in kidneys is blocked by co-injection of unlabeled bombesin as shown with other non selective bombesin analogs,[22, 44] suggesting that both bombesin receptor GRP-R and NMB-R might be involved in kidneys uptake. This is of great importance when considering therapeutic applications of this radiopeptide as kidney uptake represents the major issue when using high activities in order to provide a better benefit for patients. One can imagine that pre injection of bombesin or neuromedin B in patients may allow monitoring of kidneys irradiation during peptide receptor radionuclide therapy as performed with somatostatin analogs.[45] Uptake in other organs remains low (<3%ID/g) suggesting that a good tumor/non tumor ratio could be obtained. The increased uptake in lungs may be caused by the presence of traces of uncomplexed <sup>68</sup>Ga. Rapid wash-out from NMB-R/GRP-R rich organs is seen between 1 h and 2 h suggesting a rapid pharmacokinetic of the peptide **Figure 6**. This finding is important to obtain a low absorbed dose during [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-RV\_15 PET imaging.

Taken together, our results suggest that our ranatensin agonist could be helpful for imaging and therapy of NMB-R/GRP-R-expressing tumors. Moreover, in tumors that express not only BB2 but also BB1, [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-RV\_15 might offer higher sensitivity than selective GRP analogs.

In prostate cancer, first clinical results suggest that non-invasive GRP-R PET molecular imaging is very promising.[39, 40]

In breast cancer, GRP-R mRNA has been recently correlated with ER protein expression.[16] If GRP-R over-expression in ER-positive breast cancers (~70% of breast

cancers) is confirmed in larger studies, the potential of PET molecular imaging using  $^{68}\text{Ga}$ -radiolabeled DOTA-conjugated ranatensin agonist and further  $\beta$ - or  $\alpha$ -therapy of these tumors and related metastases is tremendous. To date, preclinical studies have been conducted for GRP-R imaging in breast cancer with good results.[46] First clinical results obtained with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -bombesin are also encouraging.[47]

No analog have yet been designed for specific NMB-R targeting. The discovery of NMB-R in human tumors will stimulate their development

The relevance of dual NMB-R/GRP-R targeting has been illustrated with  $^{68}\text{Ga}$ -AMBA which is superior to [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG and useful to monitor the response to hormone treatment in an ER-positive breast cancer model.[48] [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-AMBA or [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PESIN have also great promise for peptide receptor radionuclide therapy of human tumors expressing bombesin receptor.[14, 21, 22] Finally,  $\alpha$ -therapy might be more efficacious than usual  $\beta$ -therapy for treatment of bombesin receptor positive tumors.[23] Targeting NMB-R and GRP-R with ranatensin analogs have therefore a bright future.

## CONCLUSION

To the best of our knowledge, we have synthesised and radiolabeled with  $^{68}\text{Ga}$ , the first ranatensin analog. [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-RV\_15 is hydrophilic *in vitro* and metabolically stable *ex vivo*.  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-RV\_15 exhibits agonistic properties with respect to NMB-R and GRP-R. NMB-R and GRP-R mediated uptake is shown in the pancreas and the kidneys. Finally, [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-RV\_15 exhibits a urinary excretion. Ranatensin analogs might therefore be suitable for PET molecular imaging and radiopharmaceutical therapy of NMB-R-expressing tumors, GRP-R-expressing tumors or those expressing both receptors.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was supported by a public grant from the French National Research Agency within the context of the Investments for the Future Program, referenced ANR-10-LABX-57 and named TRAIL

## REFERENCES

- [1] Schally AV. Hypothalamic hormones: from neuroendocrinology to cancer therapy. *Anticancer Drugs*. 1994;5:115-30.
- [2] Spindel ER, Giladi E, Segerson TP, and Nagalla S. Bombesin-like peptides: of ligands and receptors. *Recent Prog Horm Res*. 1993;48:365-91.
- [3] Sunday ME, Kaplan LM, Motoyama E, Chin WW, and Spindel ER. Gastrin-releasing peptide (mammalian bombesin) gene expression in health and disease. *Lab Invest*. 1988;59:5-24.
- [4] Erspamer V, Erspamer GF, Inselvini M, and Negri L. Occurrence of bombesin and alytesin in extracts of the skin of three European discoglossid frogs and pharmacological actions of bombesin on extravascular smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1972;45:333-48.
- [5] McDonald TJ, Jornvall H, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, et al. Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 1979;90:227-33.
- [6] Minamino N, Kangawa K, and Matsuo H. Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983;114:541-8.
- [7] Varshney R, Hazari P, Fernandez P, Schulz J, Allard M, and Mishra AK. <sup>68</sup>Ga-labelled Bombesin Analogues for Receptor Mediated Imaging. *Theranostics, Gallium-68 and other Radionuclides Springer*; 2012, p. 221-56.
- [8] Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, and Benya RV. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian Bombesin Receptors: Nomenclature, distribution, pharmacology, signaling and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev* 2008;60:1-42.
- [9] Alexander SP, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Spedding M, et al. The concise guide to PHARMACOLOGY 2013/14: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol*. 2013;170:1459-581.
- [10] Morgat C, Mishra AK, Varshney R, Allard M, Fernandez P, and Hindie E. Targeting Neuropeptide Receptors for Cancer Imaging and Therapy: Perspectives with Bombesin, Neurotensin, and Neuropeptide-Y Receptors. *J Nucl Med* 2014;55:1650-7.
- [11] Beer M, Montani M, Gerhardt J, Wild PJ, Hany TF, Hermanns T, et al. Profiling gastrin-releasing peptide receptor in prostate tissues: clinical implications and molecular correlates. *The Prostate* 2012;72:318-25.
- [12] Korner M, Waser B, Rehmann R, and Reubi JC. Early over-expression of GRP receptors in prostatic carcinogenesis. *The Prostate* 2013;22:22743.
- [13] Gugger M and Reubi C. Gastrin-Releasing peptide Receptors in Non-Neoplastic and Neoplastic Human Breast. *Am J Pathol* 1999;155:2067-76.
- [14] Thomas R, Chen J, Roudier MM, Vessella RL, Lantry LE, and Nunn AD. In vitro binding of <sup>177</sup>Lu-AMBA, a novel <sup>177</sup>Lu-labeled GRP-R agonist for systemic radiotherapy in human tissues. *Clin Exp Metastasis* 2009;26:105-19.
- [15] Ni C, Zhao X, Sun T, Liu Y, Gu Q, and Sun B. Role of gastrin-releasing peptides in breast cancer metastasis. *Hum Pathol* 2012;43:2342-7.
- [16] Dalm S, Sieuwerts A, Look M, Melis M, van Deurzen C, Foekens J, et al. Clinical relevance of targeting the gastrin releasing peptide receptor, somatostatin receptor 2 or chemokine c-x-c motif 4 in breast cancer for imaging and therapy. *J Nucl Med* 2015;[Epub ahead of print].
- [17] Park H-J, Kim M-K, Kim S-R, Bae S-K, and Bae M-K. Hypoxia regulates the expression of the neuromedin B receptor through a mechanism dependent on hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *PLoS One* 2013;8:e82868.

- [18] Park H-J, Kim S-R, Kim M-K, Choi K-S, Jang H-O, Yun I, et al. Neuromedin B receptor antagonist suppresses tumor angiogenesis and tumor growth in vitro and in vivo. *Cancer Letters* 2011;312:117-27.
- [19] Sun B, Halmos G, Schally AV, Wang X, and Martinez M. Presence of receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide and mRNA for three subtypes in human prostate cancers. *Prostate* 2000;42:295-303.
- [20] Matusiak D, Glover S, Nathaniel R, Matkowskyj K, Yang J, and Benya RV. Neuromedin B and its receptor are mitogens in both normal and malignant epithelial cells lining the colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G718-28.
- [21] Lantry LE, Cappelletti E, Maddalena ME, Fox JS, Feng W, Chen J, et al. <sup>177</sup>Lu-AMBA: Synthesis and characterization of a selective <sup>177</sup>Lu-labeled GRP-R agonist for systemic radiotherapy of prostate cancer. *J Nucl Med* 2006;47:1144-52.
- [22] Zhang H, Schuhmacher J, Waser B, Wild D, Eisenhut M, Reubi JC, et al. DOTA-PESIN, a DOTA-conjugated bombesin derivative designed for the imaging and targeted radionuclide treatment of bombesin receptor-positive tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007;34:1198-208.
- [23] Wild D, Frischknecht M, Zhang H, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Boisclair J, et al. Alpha- versus beta-particle radiopeptide therapy in a human prostate cancer model (<sup>213</sup>Bi-DOTA-PESIN and <sup>213</sup>Bi-AMBA versus <sup>177</sup>Lu-DOTA-PESIN). *Cancer Res*. 2011;71:1009-18.
- [24] Boswell CA, Zhang H, Abiraj K, Thorek DLJ, Waser B, Smith-Jones PM, et al. Evolution of Bombesin Conjugates for Targeted PET Imaging of Tumors. *PLoS One* 2012;7:e44046.
- [25] Baum R, Prasad V, Mutloka N, Frischknecht M, Maecke H, and Reubi J. Molecular imaging of bombesin receptors in various tumors by Ga-68 AMBA PET/CT: First results. *J Nucl Med* 2007;48:79P.
- [26] Karle IL and Balaram P. Structural characteristics of alpha-helical peptide molecules containing Aib residues. *Biochemistry*. 1990;29:6747-56.
- [27] Toniolo C, Crisma M, Valle G, Bonora GM, Polinelli S, Becker EL, et al. Conformationally restricted formyl methionyl tripeptide chemoattractants: a three-dimensional structure-activity study of analogs incorporating a C  $\alpha$ ,  $\alpha$ -dialkylated glycine at position 2. *Pept Res*. 1989;2:275-81.
- [28] Prasad S, Rao RB, Bergstrand H, Lundquist B, Becker EL, and Balaram P. Conformation-activity correlations for chemotactic tripeptide analogs incorporating dialkyl residues with linear and cyclic alkyl sidechains at position 2. *Int J Pept Protein Res*. 1996;48:312-8.
- [29] Prasad S, Mathur A, Sharma R, Gupta N, Ahuja R, Jaggi M, et al. Octapeptide Analogs of Somatostatin Containing  $\alpha$ , $\alpha$ -Dialkylated Amino Acids with Potent Anticancer Activity. *Int J Pept Res Ther* 2006;12:179-85.
- [30] Zompra AA, Magafa V, Lamari FN, Nikolopoulou A, Nock B, Maina T, et al. GnRH analogues containing conformationally restricted amino acids in positions 3 and 6: differential impact on pituitary binding affinity and direct antiproliferative effect on breast cancer cells. *J Pept Res*. 2005;66:57-64.
- [31] Shimizu N, Guo J, and Gardella TJ. Parathyroid hormone (PTH)-(1-14) and -(1-11) analogs conformationally constrained by alpha-aminoisobutyric acid mediate full agonist responses via the juxtamembrane region of the PTH-1 receptor. *J Biol Chem*. 2001;276:49003-12.
- [32] Prasad S, Mathur A, Gupta N, Jaggi M, Singh AT, Rajendran P, et al. Bombesin analogs containing  $\alpha$ -aminoisobutyric acid with potent anticancer activity. *J Pept Sci* 2007;13:54-62.
- [33] Velikyan I, Beyer GJ, and Langstrom B. Microwave-supported preparation of <sup>68</sup>Ga bioconjugates with high specific radioactivity. *Bioconjug Chem*. 2004;15:554-60.



- [34] Fields G and Noble R. Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-fluoromethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res* 1990;35:161-214.
- [35] Morgat C, Mazère J, Fernandez P, Buj S, Vimont D, Schulz J, et al. A phantom-based method to standardize dose-calibrators for new  $\beta^+$ -emitters. *Nucl Med Commun*. 2015;36:201-6.
- [36] Mason S, Smart D, Marshall IC, Mcknight A, Skepper JN, and McNulty S. Identification and characterisation of functional bombesin receptor in human astrocytes. *Eur J Pharmacol* 2002;438:25-34.
- [37] Ryan RR, Katsuno T, Mantey SA, Pradhan TK, Weber HC, Coy DH, et al. Comparative pharmacology of the non peptide neuromedin B receptor antagonist PD 168368. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;290:1202-11.
- [38] Ashwood V, Brownhill V, Higginbottom M, Horwell DC, Hughes J, Lewthwaite RA, et al. PD 176252--the first high affinity non-peptide gastrin releasing peptide (BB2) receptor antagonist. *Bioorg Med Chem Lett*. 1998;22:2589-94.
- [39] Kahkonen E, Jambor I, Kempainen J, Lehtio K, Gronroos TJ, Kuisma A, et al. In vivo imaging of prostate cancer using [ $^{68}\text{Ga}$ ]-labeled bombesin analog BAY86-7548. *Clin Cancer Res* 2013;19:5434-43.
- [40] Wieser G, Mansi R, Grosu AL, Schultze-Seeman W, Dumont-Walter RA, Meyer PT, et al. Positron emission tomography (PET) imaging of prostate cancer with a gastrin releasing peptide receptor antagonist - from mice to men. *Theranostics* 2014;4:412-9.
- [41] Carver JA and Collins JG. NMR identification of a partial helical conformation for bombesin in solution. *Eur J Biochem*. 1990;187:645-50.
- [42] Morgat C, Hindié E, Mishra AK, Allard M, and Fernandez P. Gallium-68: Chemistry and radiolabeled peptides exploring different oncogenic pathways. *Cancer Biother Radiopharm* 2013;28:85-97.
- [43] Chatalic KLS, Franssen GM, Van Weerden WM, McBride WJ, Laverman P, De Blois E, et al. Preclinical comparison of Al $^{18}\text{F}$ - and  $^{68}\text{Ga}$ -labeled gastrin-releasing peptide receptor antagonists for PET imaging of prostate cancer. *J Nucl Med* 2014;55:2050-56.
- [44] Zhang X, Cai W, Cao F, Schreiber E, Wu Y, Wu JC, et al.  $^{18}\text{F}$ -labeled bombesin analogs for targeting GRP receptor-expressing prostate cancer. *J Nucl Med*. 2006;47:492-501.
- [45] Rolleman EJ, Kooij PPM, de Herder WW, Valkema R, Krenning EP, and de Jong M. Somatostatin receptor subtype 2-mediated uptake of radiolabelled somatostatin analogues in the human kidney. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007;34:1854-60.
- [46] Varasteh Z, Rosenström U, Velikyan I, Mitran B, Altai M, Honarvar H, et al. The Effect of Mini-PEG-Based Spacer Length on Binding and Pharmacokinetic Properties of a  $^{68}\text{Ga}$ -Labeled NOTA-Conjugated Antagonistic Analog of Bombesin. *Molecules* 2014;19:10455.
- [47] Shariati F, Aryana K, Fattahi A, Forghani MN, Azarian A, Zakavi SR, et al. Diagnostic value of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -bombesin scintigraphy for differentiation of malignant from benign breast lesions. *Nucl Med Commun*. 2014;35:620-5.
- [48] Prignon A, Nataf V, Provost C, Cagnolini A, Montravers F, Gruaz-Guyon A, et al.  $^{68}\text{Ga}$ -AMBA and  $^{18}\text{F}$ -FDG for preclinical PET imaging of breast cancer: effect of tamoxifen treatment on tracer uptake by tumor. *Nucl Med Biol* 2014;42:92-8.

## Figures

Figure 1

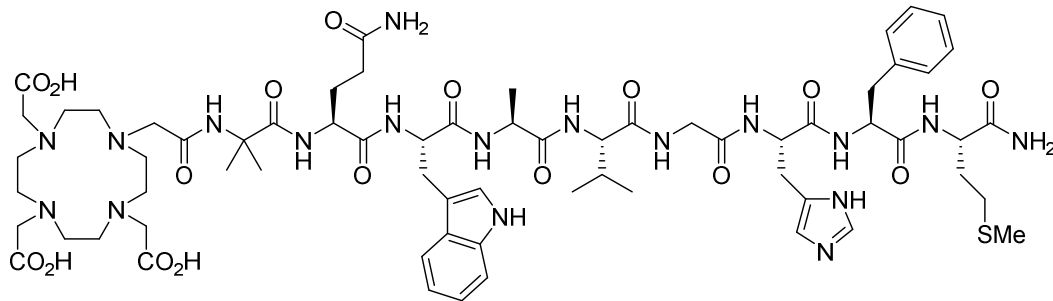


Figure 2

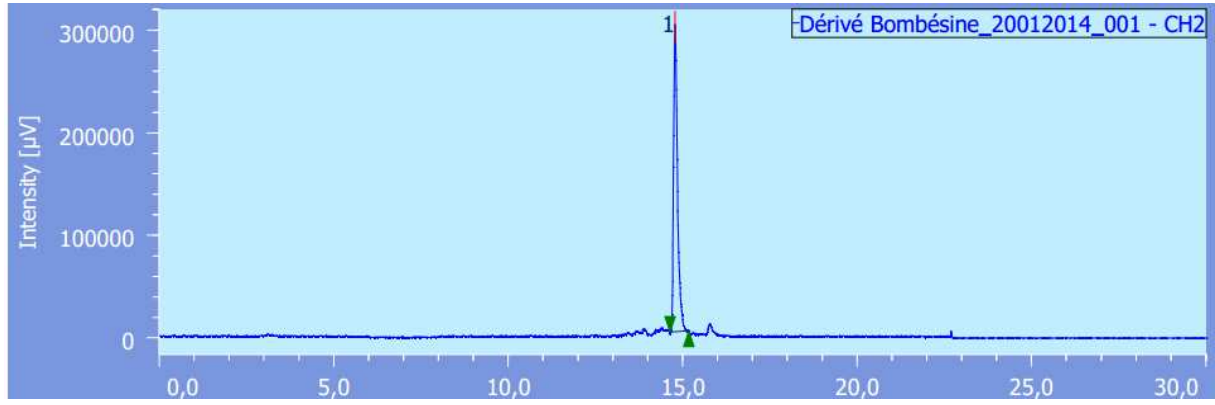


Figure 3

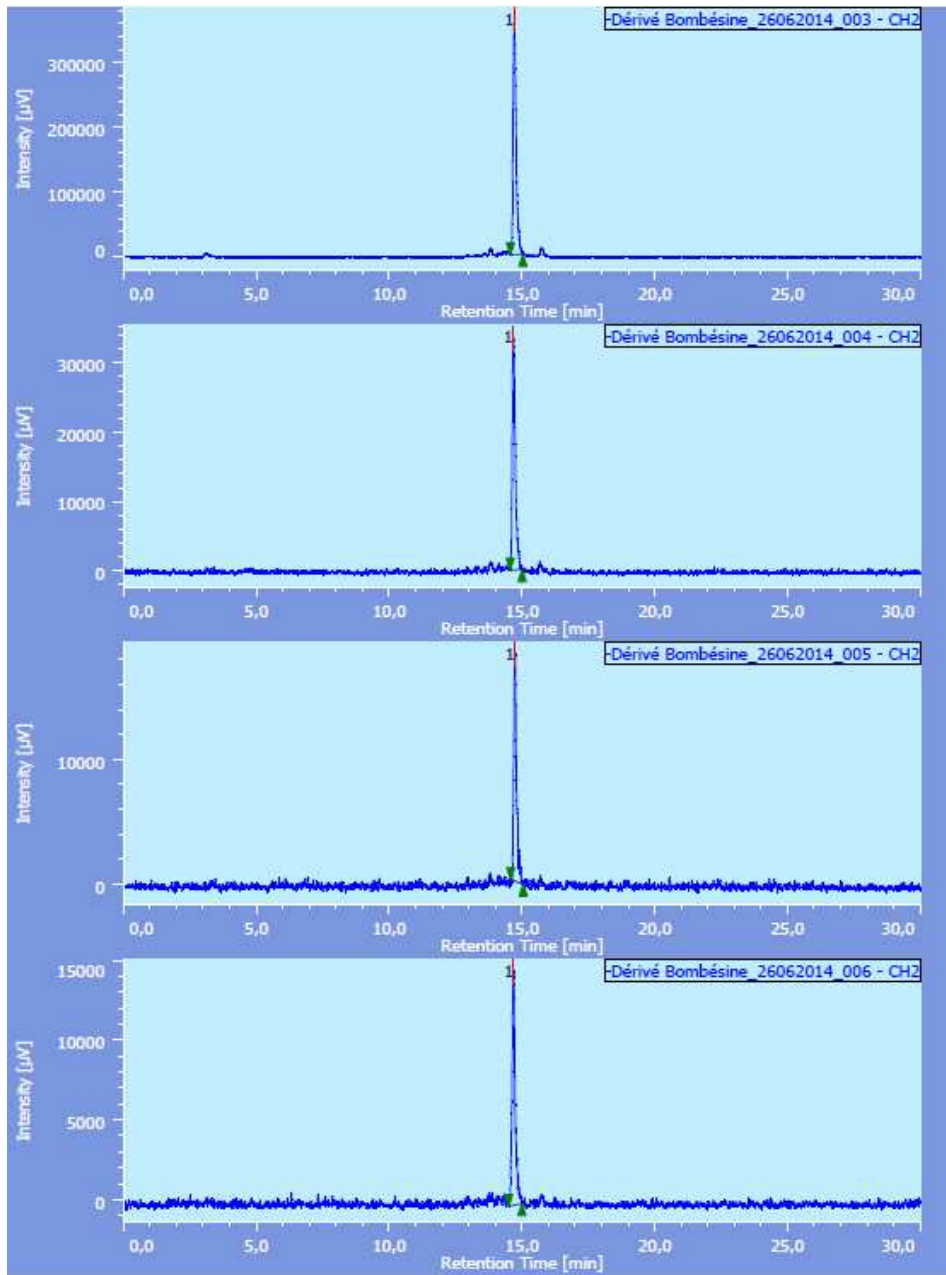


Figure 4

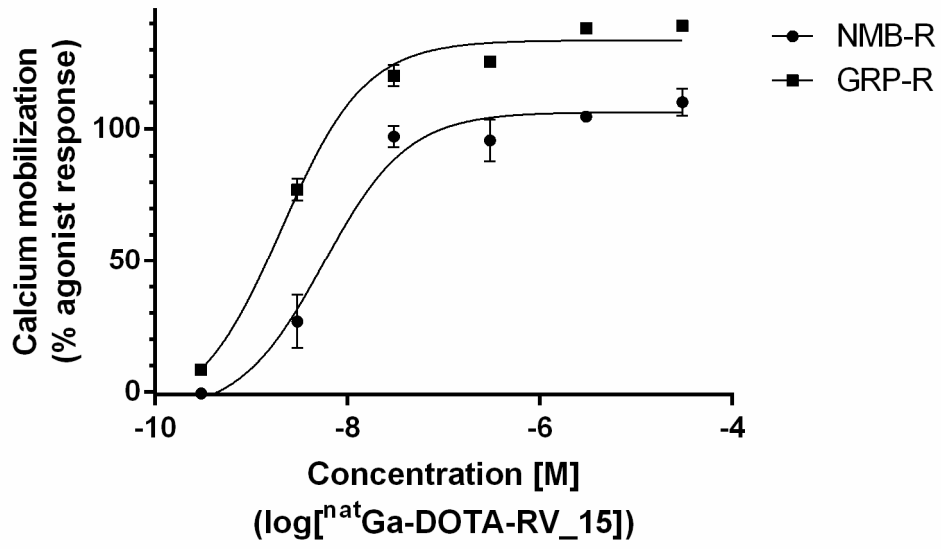


Figure 5

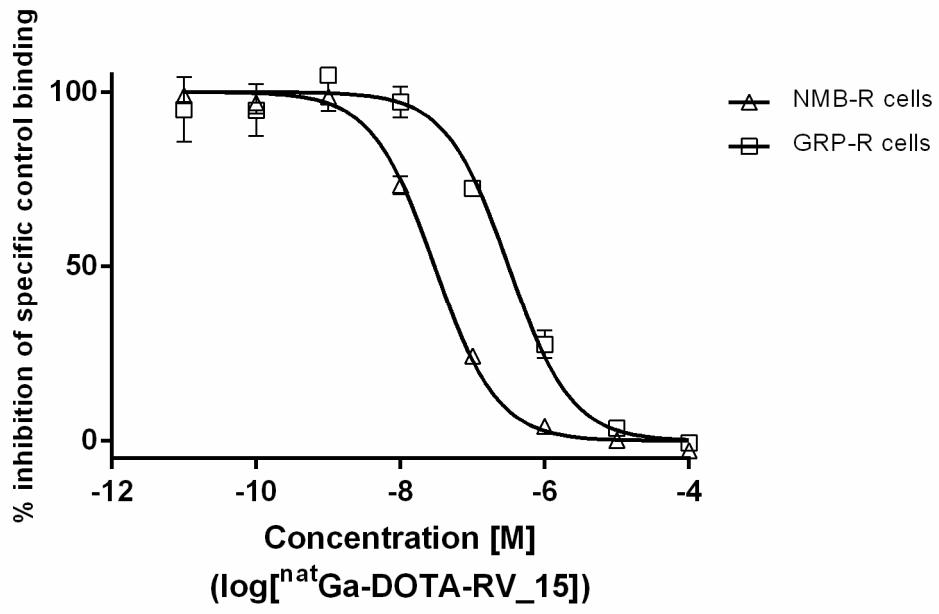
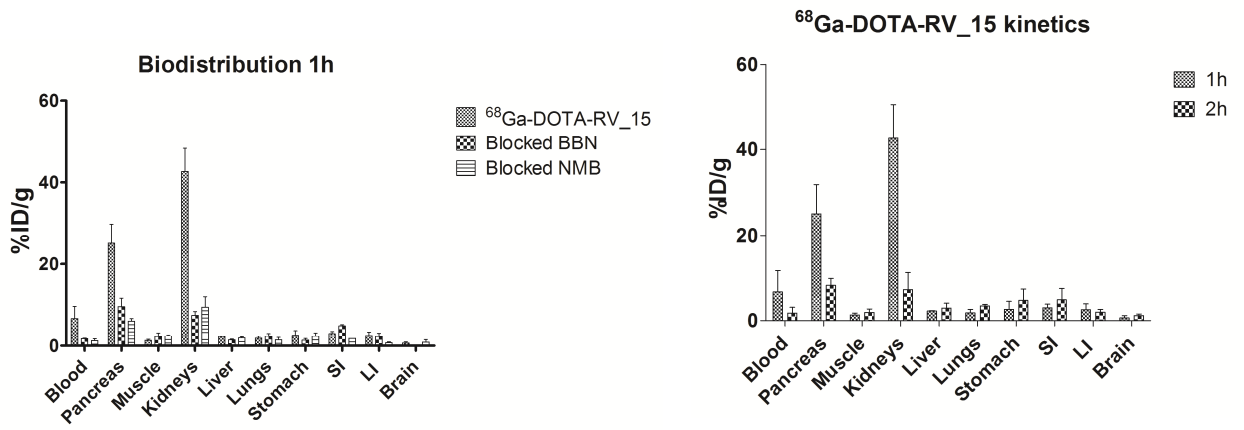


Figure 6



## FIGURE LEGENDS

**Figure 1:** Structure of unlabeled peptide chelator conjugate DOTA-RV\_15

**Figure 2:** Radio-HPLC chromatogram of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-RV\_15

**Figure 3 :** *Ex vivo* stability of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-RV\_15 in human plasma. From top to bottom are presented radio-HPLC chromatograms of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-RV\_15 incubated in human plasma during 0, 2, 30 and 45 minutes at 37°C.

**Figure 4: Pharmacological profiling of  $^{nat}\text{Ga}$ -DOTA-RV\_15.** Calcium imaging experiments with demonstration of calcium release by  $^{nat}\text{Ga}$ -DOTA-RV\_15. CHO cells expressing hNMB-R and HEK 293 cells expressing hGRP-R were incubated in presence of increasing concentration of  $^{nat}\text{Ga}$ -DOTA-RV\_15 (from  $3.10^{-10}$  M to  $3.10^{-5}$  M). Values are the mean  $\pm$  SD of 2 independent experiments.

**Figure 5:** Competition binding curves. CHO cells expressing hNMB-R and HEK 293 cells expressing hGRP-R were incubated in presence of 0.1 nM of  $^{125}\text{I}$ -Tyr<sup>4</sup>-bombesin and increasing amount of  $^{nat}\text{Ga}$ -DOTA-RV\_15. IC<sub>50</sub> values were  $3.0 \pm 1.1 \cdot 10^{-8}$  M for hNMB-R and  $3.2 \pm 1.2 \cdot 10^{-7}$  M for hGRP-R.

**Figure 6:** Normal biodistribution, blocking experiments and kinetic of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-RV\_15 injected in normal mice (n=3 for each experiment). A: Normal biodistribution at 1h and NMBR and GRPR blocking reveal urinary excretion and specific uptake in pancreas and kidneys. B:  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-RV\_15 kinetic shows fast clearance from pancreas and kidneys between 1 h and 2 h. Data are expressed as percentage of injected dose per gram of tissue (%ID/g).



## Quatrième partie

---

### **Etudes préliminaires d'autres récepteurs de neuropeptides pour le développement de nouvelles armes thérapeutiques**

Comme nous l'avons dit précédemment, outre les récepteurs de la somatostatine et de la bombésine, d'autres familles de neuropeptides pourraient avoir un intérêt en oncologie. Les données de la littérature semblent indiquer que les familles de la neurotensine et du neuropeptide-Y auront un rôle dans la prise en charge thérapeutique dans des cancers où les stratégies thérapeutiques sont limitées. Néanmoins ces données sont encore limitées et la réalisation d'autres études, seraient un atout majeur pour stimuler le développement de ces deux classes de neuropeptides.

Dans le **Chapitre 1**, nous exposons les travaux préliminaires sur le récepteur NTR<sub>1</sub> qui sont en cours dans notre laboratoire et qui doivent fournir les premiers arguments pour la mise en place d'études de plus grandes envergures;

Dans le **Chapitre 2**, nous présentons un consortium que nous avons établi avec d'autres équipes Françaises pour le développement d'une nouvelle génération d'analogues radiomarqués de la neurotensine.

Enfin, dans le **Chapitre 3**, nous démontrons l'intérêt que nous portons au système du neuropeptide Y par des résultats très préliminaires, encourageants, mais qui nécessitent encore d'être validés.

# Chapitre 1

## Recherche de NTR<sub>1</sub> dans diverses tumeurs

Il n'existe pas à l'heure actuelle d'applications cliniques du ciblage de ce récepteur pour deux raisons principales: le manque d'études détaillant l'expression de NTR<sub>1</sub> dans diverses tumeurs humaines et l'absence de radiopeptides présentant des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques optimisées. L'objectif de cette partie fondamentale, est d'identifier des tumeurs humaines pertinentes pour le développement d'analogues radiomarqués de la neurotensine.

### *Matériel et méthodes*

#### Caractéristiques de l'anticorps anti-NTR<sub>1</sub>

La principale difficulté pour la recherche de NTR<sub>1</sub> réside dans l'existence de variants de ce récepteur (NTR<sub>1α</sub>, NTR<sub>1β</sub>, NTR<sub>1γ</sub> et NTR<sub>1δ</sub>) qui ont été mis en évidence sur des lignées cellulaires prostatiques (109) et sur des tumeurs gynécologiques humaines (110). Pour nos travaux, nous avons utilisé l'anticorps polyclonal de chèvre anti-NTR<sub>1</sub> (C-20)<sub>sc</sub>-7596 développé par Santa Cruz Biotechnology®. L'épitope de cet anticorps est d'environ 15-25 acides aminés de long. Cet épitope est situé dans les 50 derniers acides aminés de la région C-terminale, dans la région des acides aminés 370 à 420 de la protéine NTR<sub>1</sub> d'origine humaine (données fournies par Santa Cruz Biotechnology®). Ainsi, l'anticorps utilisé dans ce travail ne reconnaît que la forme native du récepteur. Les données obtenues en cristallographie, sur la structure du site de liaison du fragment minimal actif de la neurotensine (NT(8-13))(111) indiquent que seule la forme native et le variant NTR<sub>1δ</sub> peuvent lier la NT(8-13). Ainsi, à l'aide de cet anticorps nous ne mettons en évidence que la forme native de NTR<sub>1</sub>, capable de lier la NT(8-13) et par extension ses analogues. Enfin, cet anticorps a été validé et utilisé par de nombreuses équipes pour la recherche de NTR<sub>1</sub> dans diverses lignées cellulaires et tumeurs humaines (25,29,112-119).

#### Lignées cellulaires

##### **Cancer de la prostate**

Les lignées cellulaires LNCaP, DU-145 et PC-3 nous ont été gracieusement fournies sous forme de coupes fixées en formol et enrobées de paraffine par le service d'anatomopathologie de l'Institut Bergonié. La lignée PC-3a été étudiée sous forme de xénogreffe fixée en formol et enrobée de paraffine. Les caractéristiques moléculaires sont issues de la littérature (120).

<i>Lignées cellulaires</i>	<i>Phénotype</i>	<i>Caractéristiques moléculaires</i>
LNCaP	Androgéno-dépendant	RA <sup>+</sup> , RE <sup>+</sup> , PSA <sup>+</sup> , p53 <sup>wt</sup>
DU-145	Androgéno-indépendant	RA <sup>-</sup> , PSA <sup>-</sup> , p53 <sup>m</sup>
PC-3	Androgéno-indépendant	RA <sup>-</sup> , PSA <sup>-</sup> , p53 <sup>del</sup>

Tableau 7: Caractéristiques phénotypiques et moléculaires des lignées cellulaires utilisées dans cette étude. +: positif; -: négatif; wt: sauvage; m: muté; del: délété.

## Cancer du sein

Les lignées cellulaires MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-468, SKBR3, T47D et ZR75.1 nous ont été gracieusement fournies sous forme de coupes fixées en formol et enrobées de paraffine par le service d'anatomopathologie de l'Institut Bergonié.

### Immunocytochimie

Des coupes de lignées cellulaires déparaffinées et réhydratées ont été démasquées par chauffage d'une solution à base de tampon citrate (pH6, H3300, Vector Laboratories, Inc). Après saturation par du sérum de cheval 2,5%, les coupes ont été mises à incuber avec l'anticorps primaire (anti-NTR<sub>1</sub>, 1/100) pendant 1h à température ambiante en chambre humide à l'abri de la lumière. L'anticorps secondaire anti-chèvre (pré-dilué, MP-7405, Vector Laboratories, Inc) couplé une à peroxydase a ensuite été appliqué sur les coupes pendant 30 minutes. Le signal a été révélé par la méthode de la diaminobenzidine (SK-4100, Vector Laboratories, Inc) conformément aux instructions du fournisseur. Les coupes ont ensuite été contre-colorées avec de l'hématoxyline (S3309, Dako).

### Immunohistochimie

## Cancer de la prostate

Guidé par l'intérêt grandissant de NTR<sub>1</sub> dans des cancers de hauts grades, nous avons souhaité réaliser une étude préliminaire sur 10 échantillons de prostatectomie d'adénocarcinomes prostatiques obtenus *via* le CHU de Toulouse. Aucun patient n'a reçu de traitement hormonal, de chimiothérapie ou de radiothérapie avant la chirurgie. Quatre patients avaient 64 ans ou plus. Cinq patients avaient une valeur de prostate specific antigen (PSA) sérique  $\geq 10$  ng/mL. Cinq patients étaient classés N<sub>0</sub> ou N<sub>x</sub>. Deux tumeurs étaient de score de Gleason 8 et huit tumeurs étaient de score de Gleason 9; neufs patients avaient des marges négatives.

## Evaluation de l'immunohistochimie

L'analyse semi-quantitative de la coloration de NTR<sub>1</sub> a été réalisée sous microscope à fond clair selon un score IRS par un anatomopathologiste expérimenté (Dr Mokhrane YACOUB). Un score IRS  $\geq 4$  pour NTR<sub>1</sub> est considéré comme positif.

<i>Pourcentage de cellules marquées</i>	<i>Intensité de la coloration</i>	<i>Score IRS (0 - 9)</i>
0: pas de cellules marquées	0: Absent	0 - 1: Absent
1: < 10% de cellules marquées	1: Faible	2 - 3: Faible
2: 10 - 49% de cellules marquées	2: Modéré	4: Modéré
3: 50 - 100% de cellules marquées	3: Fort	$\geq 6$ : Fort

### 1. Cancer de la prostate

#### *Résultats*

Les lignées cellulaires LNCaP et DU-145 ne présentent pas d'immunoréactivité vis à vis de la protéine NTR<sub>1</sub>. La lignée PC3 exprime NTR<sub>1</sub>. Le marquage obtenu est principalement cytoplasmique et finement granulaire.

Selon le score IRS défini plus haut, le marquage de NTR<sub>1</sub> est absent dans 5 tumeurs, faible dans 3 tumeurs, modéré dans 1 tumeur et fort dans 1 tumeur. Ainsi un marquage de NTR<sub>1</sub> modéré à fort est rencontré dans 2/10 (20%) des adénocarcinomes prostatiques étudiés. Le marquage obtenu est hétérogène principalement cytoplasmique et finement granulaire **Figure 18**. Les cellules tumorales, mais également les cellules ganglionnaires nerveuses présentent une immunoréactivité vis à vis de NTR<sub>1</sub>.

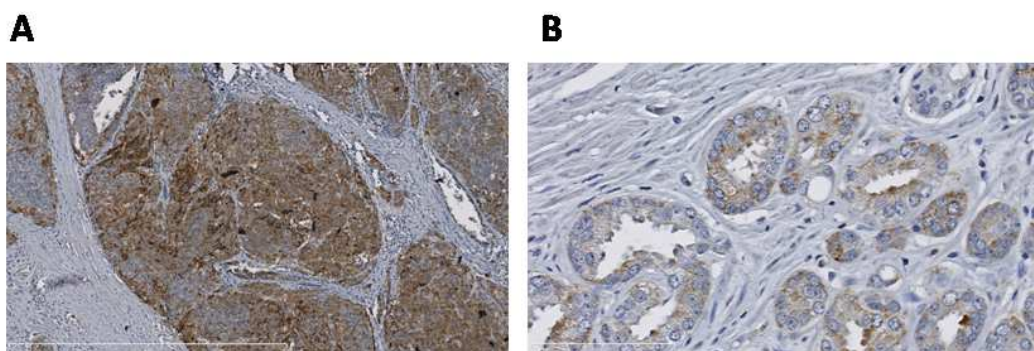


Figure 18: **A:** Forte expression de NTR<sub>1</sub> (grossissement 20X). **B:** Localisation subcellulaire de l'immunomarquage (grossissement 40X)

## Discussion

L'objectif de ce travail est de fournir aux équipes travaillant sur les récepteurs de neuropeptides, des données justifiant le ciblage de NTR<sub>1</sub> dans le cancer de la prostate. Les résultats préliminaires obtenus sur lignées cellulaires suggèrent que l'expression de NTR<sub>1</sub> n'est pas directement liée à l'expression de RA et/ou du PSA. Par ailleurs, Swift *et al* ont montré l'absence d'une régulation directe de NTR<sub>1</sub> par les androgènes (22) et Seghal *et al* ont proposé que ce soit le peptide neurotensine qui est surexprimé en l'absence d'androgènes et représenterait donc un signal de croissance alternatif (121). Hashimoto et ses collaborateurs ont affiné ces données en démontrant, sur lignées cellulaires, que l'expression de NTR<sub>1</sub> est directement régulée par la concentration en peptide neurotensine sécrété par les cellules neuro-endocrines prostatiques (25). Ce mécanisme a été initialement mis en évidence dans le cancer du sein où une exposition prolongée à la neurotensine peut activer le gène NTR<sub>1</sub> (122). Dans ces conditions, NTR<sub>1</sub> est accumulé dans le compartiment de recyclage périnucléaire puis adressé à la membrane. Dans cette hypothèse, la synthèse *de novo* et le recyclage permanent du récepteur assureraient une sensibilité continue à la neurotensine, qui augmente la prolifération tissulaire. Cette situation est également rencontrée dans les adénomes du colon où NTR<sub>1</sub> présente également une localisation périnucléaire suggérant une stimulation intense par la neurotensine (123). Ainsi, NTR<sub>1</sub> pourrait être une protéine clé recrutée lors de la carcinogénèse suite à une libération intense de neurotensine. Une autre donnée intéressante est le statut p53 des lignées cellulaires étudiées; LNCaP exprime le phénotype sauvage de p53, DU-145 présente 2 mutations de p53 (V274F et A175H) et PC-3 possède une délétion d'une cytosine sur le codon 138 qui introduit un codon stop prématuré (120). Le phénotype sauvage de p53 et certaines mutations, dont A175H, inhibe la voie de signalisation Wnt (124). Or il a été montré que la sécrétion du peptide neurotensine est directement induite par l'activation de la voie Wnt (125). De même, le gène NTR<sub>1</sub> est directement activé par la voie oncogénique Wnt/APC connectée à la  $\beta$ -caténine/Tcf (123). Ainsi, un mécanisme possible d'action pourrait être que NT et NTR<sub>1</sub> soient libérés et recrutés consécutivement à des altérations de p53 activant Wnt. Un autre argument en faveur de cette hypothèse est que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est inactive dans les lignées LNCaP et DU-145 alors qu'elle est activée dans la lignée PC-3 (124). Ceci rejoint le profil d'expression de NTR<sub>1</sub> dans les lignées cellulaires étudiées. Cette donnée a été récemment confirmée expérimentalement par la mise en évidence d'une corrélation positive entre l'expression de NTR<sub>1</sub> et la translocation nucléaire (activation) de la  $\beta$ -caténine sur des échantillons humains de cancer gastrique (126). Par ailleurs, la sécrétion de NT entraîne à nouveau un fort recrutement de NTR<sub>1</sub>. Enfin, certaines mutations de p53 permettent aux cellules prostatiques de croître en l'absence d'androgènes (127). Cette hypothèse mérite des études plus approfondies.

Les données obtenues sur coupes tissulaires suggèrent que, dans notre étude, 20% des cancers de la prostate de hauts grades expriment modérément à fortement NTR<sub>1</sub>. Cette donnée est concordante avec celles obtenues dans le cancer du sein où 20% des tumeurs étudiées expriment fortement NTR<sub>1</sub> (le nombre d'échantillons étudiés est bien plus important) (29). Ceci rejoint les résultats obtenus sur lignées cellulaires où certaines cellules de haut grade expriment NTR<sub>1</sub> (PC-3) et d'autres non (DU-145). La clonalité tumorale pourrait expliquer cette différence d'expression.

Nos données préliminaires sont à prendre avec précaution en raison du faible nombre d'échantillons étudiés, de l'absence d'autres échantillons représentant l'évolution de la maladie ainsi que l'absence d'analyse statistique solide.

### *Conclusion*

NTR<sub>1</sub> pourrait être une nouvelle cible moléculaire intéressante à certains stades de l'évolutivité du cancer de la prostate. Notre mise au point de l'étude immunocytochimique de la distribution du récepteur NTR<sub>1</sub> dans des lignées cellulaires du cancer de la prostate et les données initiales obtenues sur coupes de prostatectomie est un prélude à une étude plus large grâce au screening des TMA du CHU de Bordeaux (convention en cours d'élaboration) avec analyse des tumeurs primaires et des lésions ganglionnaires chez les patients N+, mais aussi de métastases osseuses, afin d'apprécier l'expression de ce récepteur en fonction du stade tumoral et de l'évolution de la maladie. En effet, il faut considérer que les patients atteints de cancer de la prostate de haut grade bénéficieront d'une prostatectomie en première intention et la présence de NTR<sub>1</sub> dans les métastases ganglionnaires et osseuses est le paramètre clé pour envisager des applications thérapeutiques des analogues de la neurotensine. Ce travail se poursuit après la Thèse. Des collaborations ont été établies dans ce sens.

## **2. Cancer du sein**

### *Résultats*

Parmi les lignées cellulaires étudiées, les lignées MDA-MB-468, MDA-MB-453 et ZR75.1 expriment NTR<sub>1</sub>. Les lignées MCF-7, T47D et SKBR3 expriment peu ou pas NTR<sub>1</sub>. Quelques coupes de cancers du sein de phénotype triple négatif ont été étudiées. NTR<sub>1</sub> est fortement exprimé par un grand nombre de cellules tumorales **Figure 19A**. Le marquage obtenu est finement granulaire, péri-nucléaire et cytoplasmique. Le stroma ne présente pas de marquage **Figure 19B**.

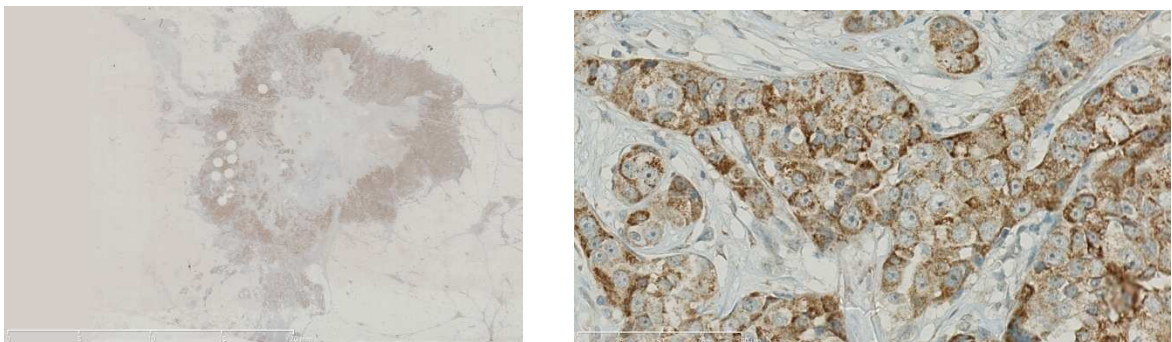


Figure 19:A: Expression de NTR<sub>1</sub> sur une coupe de cancer du sein triple négatif. **B**: Localisation subcellulaire de NTR<sub>1</sub> sur la même coupe (grossissement 40X).

## *Discussion*

Les données de la littérature montrent que NTR<sub>1</sub> est corrélé à un mauvais pronostic et à l'absence de RE. Pour cette raison nous avons choisi de nous intéresser à la recherche de NTR<sub>1</sub> dans les cancers du sein triple négatif. NTR<sub>1</sub> est une protéine d'autant plus intéressante car elle n'est pas exprimée dans les tissus mammaires sains(113). Les données obtenues sur lignées cellulaires sont en accord avec la forte expression de NTR<sub>1</sub> qui a été corrélée à la faible expression de REα (112). Nos données concernant l'expression de NTR<sub>1</sub> dans les phénotypes agressifs de cancers du sein sont encore très préliminaires et méritent d'être validées. Néanmoins, l'identification de NTR<sub>1</sub> dans les phénotypes triple négatifs et/ou basaux aurait une importance clinique puisque ces phénotypes manquent cruellement de thérapies ciblées et le pronostic des patientes est actuellement mauvais.

### **3. Autres tumeurs**

#### *Cancer de la vessie*

Des données très préliminaires, que nous avons obtenues récemment, montrent que l'épithélium normal de vessie ne présente pas d'immunoréactivité vis à vis de NTR<sub>1</sub> et que les carcinomes *in situ* ont un immunomarquage faible de NTR<sub>1</sub>. Par contre, les cancers papillaires de hauts grades marquent fortement NTR<sub>1</sub>, et plus spécifiquement au niveau de la zone superficielle. Une étude caractérisant précisément l'expression de NTR<sub>1</sub> comme une potentielle nouvelle cible dans le cancer de la vessie serait très utile (128).

#### *Mélanome*

NTR<sub>1</sub> pourrait être une cible intéressante dans le mélanome. En effet, nos premiers résultats ont montré que des échantillons de peau saine présentent un marquage de NTR<sub>1</sub> limité à certaines cellules du derme. Par contre, certains prélèvements de mélanomes nodulaires et de métastases ganglionnaires présentent de grandes plages immunoréactives à NTR<sub>1</sub>. Une seule étude a, à ce jour, documenté l'expression de NTR<sub>1</sub> sur une lignée cellulaire de mélanome(129) mais aucune étude n'a encore été conduite sur des échantillons de peau saine ni sur des coupes humaines de mélanomes et ganglions.

## *Conclusion*

Dans cette partie fondamentale du travail de Thèse, nous nous sommes attachés à réaliser des études préliminaires visant à identifier des tumeurs d'intérêts pour un ciblage à l'aide d'analogues radiomarqués de la neurotensine. Nos données sont encore incomplètes mais nous continuons ces travaux qui se poursuivront après la Thèse.



## Chapitre 2

### Collaboration avec des chimistes pour améliorer la stabilité de la neurotensine

Une des limitations actuelles avec les analogues radiomarqués de la neurotensine est leur faible stabilité métabolique en raison de peptidases clivant spécifiquement la neurotensine aux positions Arg<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup> et Pro<sup>10</sup>-Tyr<sup>11</sup>. En raison de l'intérêt majeur que tiendra NTR<sub>1</sub> dans un futur relativement proche, notre équipe a initié une collaboration avec le Laboratoire des Aminoacides, Peptides et Protéines (LAPP) de l'Institut des Biomolécules Max Rousseron (Pr Jean Martinez et Dr Florine Cavelier, Université de Montpellier II) qui possède une grande expérience dans le développement d'analogues de la neurotensine. L'originalité de leurs analogues réside dans l'introduction de motifs silylés qui permettent un marquage direct au <sup>18</sup>F en une étape. Ils sont également capables de produire des analogues pertinents pour le radiomarquage au <sup>68</sup>Ga. Ce consortium a également été élargi avec l'entrée d'une équipe dijonnaise "Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne" (Pr S. Jugé, UMR6302) spécialisée dans la synthèse de motifs boronates, qui, lorsqu'intégrés à une structure peptidique, permettront également le radiomarquage sélectif au <sup>18</sup>F en une seule étape. Nous avons déposés, à ce jour, deux lettres d'intention pour un projet ANR, deux lettres d'intention pour un projet INCA, un projet SIRIC BRIO et un projet émergent au canceropôle GSO sur la synthèse, le radiomarquage et l'évaluation *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* d'analogues radiomarqués de la neurotensine avec ces motifs silylés ou boronates. Ces acides aminés non-naturels (à base de Si ou B) sont des solutions innovantes pour s'affranchir des brevets existants sur la thématique "analogues de la neurotensine" qui témoignent de l'intérêt actuel de cet axe de recherche: brevet d'Anne Gruaz-Guyon n° WO2011006985 A1 concernant le développement d'analogues de la neurotensine pour le ciblage par radio-isotope de tumeurs positives aux récepteurs de la neurotensine" et brevet de la société 3B Pharmaceuticals GmbH EP 2740726 A1 sur le développement d'antagonistes de la neurotensine.

## Chapitre 3

### Les récepteurs du neuropeptide-Y ( $Y_1$ et $Y_5$ )

L'implication des récepteurs du neuropeptide-Y dans les processus oncologiques est aujourd'hui largement méconnu. L'absence d'utilisation d'analogues radiomarqués chez l'Homme renforce cette situation. Les données présentées ci-dessous sont très préliminaires et nécessitent encore un haut niveau de validation. Néanmoins, pour signaler l'intérêt que nous portons à ces récepteurs nous les présentons ici.

#### Matériels et méthodes

##### Western Blot sur lignées cellulaires

Les protéines membranaires sont dénaturées par chauffage à 85°C pendant 5 minutes en utilisant un tampon de Laemmli 4X. Les échantillons, contenant des quantités équivalentes de protéines (10µg) obtenues à partir des lysats cellulaires (MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-468, SKBR3, T47-D, ZR75.1, PC-3), sont ensuite soumis à électrophorèse sur un gel SDS-polyacrylamide et ensuite transférées sur une membrane de PVDF en tampon Tris-Glycine pendant 2h à 300mA (tension constante de 10V). La membrane est ensuite saturée par une solution de TBST/lait (5%) pendant 1h à température ambiante puis mise à incuber avec l'anticorps primaire (anti- $Y_1$ , PAB12299, Abnova ou anti- $Y_5$ , E11-412G) toute une nuit à 4°C. L'anticorps lié est visualisé en utilisant un anticorps secondaire anti-lapin couplé à une peroxydase, et le signal obtenu est enregistré sur un film autoradiographique (Autoradiographic film ECL). Les signaux obtenus sont normalisés par la quantité de  $\beta$ -actine.

#### Résultats- Discussion

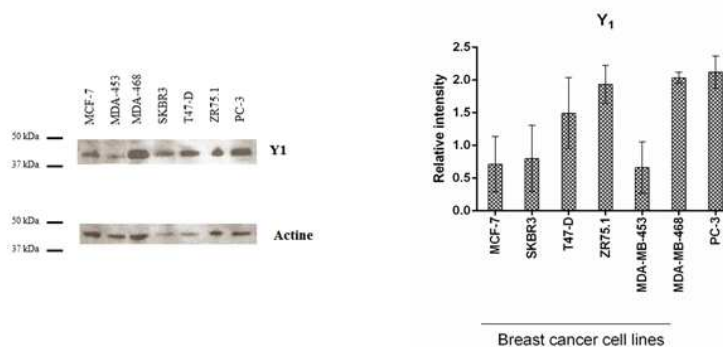


Figure 20: Western blot d' $Y_1$  sur lignées cellulaires mammaires et prostatiques.

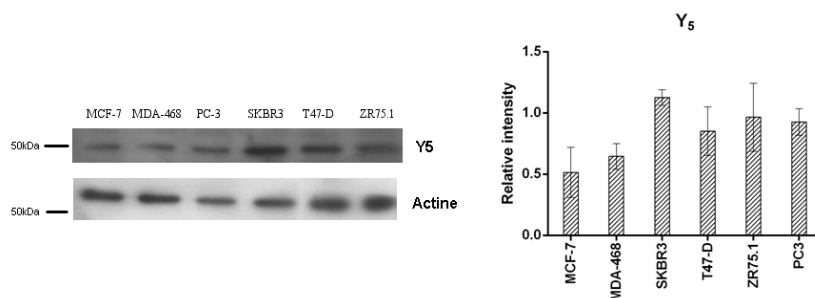


Figure 21: Western Blot d' $Y_5$  sur différentes lignées cellulaires mammaires et prostatiques

## Cancer du sein

### $Y_1$

Les lignées MDA-MB-468 et ZR75.1 ont une forte densité de récepteur  $Y_1$  alors que les autres lignées cellulaires mammaires (MCF-7, MDA-MB-453 et SKBR3) ont une expression plus faible. Il est intéressant de remarquer une variation de l'expression d' $Y_1$  en fonction des lignées cellulaires étudiées. Des résultats obtenus par d'autres équipes ont également retrouvé une faible expression d' $Y_1$  dans la lignée MCF-7. Memminger *et al* ont généré des variants de la lignée MCF-7 possédant différents niveaux d'expression de RE. Une faible expression d' $Y_1$  est retrouvée dans le phénotype sauvage exprimant fortement RE (130). Les données obtenues avec les lignées MDA-MB-453 et SKBR3 (faible expression d' $Y_1$ ) méritent des études plus approfondies.

### $Y_5$

La lignée cellulaire SKBR3 possède la plus grande quantité de protéine  $Y_5$ . Les lignées ZR75.1 et T47D possèdent également des niveaux importants d' $Y_5$ . Les autres lignées cellulaires étudiées (MCF-7 et MDA-MB-468) expriment faiblement  $Y_5$ . Les résultats obtenus avec la lignée T47D sont conformes à ceux obtenus avec d'autres récepteurs de neuropeptides étudiés dans ce travail de Thèse (GRP-R et  $Y_1$ ), c'est à dire que son profil d'expression n'est pas identique à celui de MCF-7 bien que ces deux lignées soient classifiées "luminales A". Le phénotype luminal A pourrait regrouper deux sous-groupes différents en leur expression des récepteurs de neuropeptides. Peu de données, concernant l'expression d' $Y_5$  sur des lignées cellulaires mammaires humaines, sont disponibles dans la littérature pour confronter nos résultats. Une seule étude a rapporté l'expression de la protéine  $Y_5$  dans des lignées cellulaires mammaires, MCF-7, T47D, MDA-MB-468 et BT549 (phénotype triple négatif). Les auteurs ont montré que les lignées MCF-7 et T47D expriment significativement plus  $Y_5$  que la lignée BT549. Les lignées MCF-7 et T47D n'expriment pas les mêmes quantités de protéines  $Y_5$ . Ces résultats ne sont pas totalement en accord avec nos données mais les auteurs ont mis en évidence, grâce à des expériences de "binding", l'existence de deux sites de liaison sur  $Y_5$  (131) chacun pouvant être reconnu par un anticorps différent. Aucune lignée exprimant HER2 n'a été étudié dans la littérature.

## **Cancer de la prostate**

### Y<sub>1</sub>

Les données préliminaires obtenues en western blot suggèrent une forte expression dans le cancer de la prostate. Une seule étude a décrit l'expression d'Y<sub>1</sub> dans la lignée PC-3(132). Il serait néanmoins utile d'étudier différents grades de cancer de la prostate.

### Y<sub>5</sub>

Les immunoblots révèlent que la lignée PC-3 exprime modérément à fortement Y<sub>5</sub>. Aucune étude n'a, à ce jour, rapporté l'expression d'Y<sub>5</sub> dans des lignées cellulaires prostatiques ou sur tissu tumoral.

### *Conclusion*

Nos données, si elles sont validées et confirmées, apporteront ainsi un éclairage nouveau quant à l'implication des récepteurs du neuropeptide-Y dans la physiopathologie du cancer du sein. Y<sub>1</sub> serait impliqué dans les cancers du sein hormono-indépendants ou triple-négatifs et Y<sub>5</sub> pourrait participer à la physiopathologie des cancers du sein HER2+. Le potentiel d'Y<sub>1</sub> et d'Y<sub>5</sub> dans le cancer de la prostate reste à découvrir.

## Cinquième partie

---

### **Simulation Monte-Carlo pour la sélection de radio-isotopes pertinents pour la radiothérapie métabolique**

Article 6: Dose deposits from  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  and  $^{111}\text{In}$  in micrometastases of various sizes: Implications for radiopharmaceutical therapy. *J Nucl Med.* Soumis.

Elif Hindié, Paolo Zanotti-Fregonara, Michèle A. Quinto, **Clément Morgat**, Christophe Champion

Article 7: Terbium-161 is a promising isotope for targeted radionuclide therapy: Assessment with the Monte Carlo code CELLDOSE. *Theranostics.* Soumis.

Christophe Champion, Michèle A. Quinto, **Clément Morgat**, Paolo Zanotti-Fregonara, Elif Hindié.

Le concept de "théranostic", c'est à dire l'indissociabilité des modalités d'imagerie diagnostique pour la planification de la radiothérapie interne vectorisée, est aujourd'hui largement répandu. La radiothérapie métabolique, traditionnellement limitée à des fins palliatives, est de plus en plus utilisée à des stades précoces en thérapie adjuvante ou de consolidation. Ainsi, nous avons voulu comparer l'efficacité de l' $^{90}\text{Y}$ , du  $^{177}\text{Lu}$  et de l' $^{111}\text{In}$  pour l'irradiation de micrométastases. En effet, un avantage majeur de la radiothérapie interne vectorisée par rapport à la thérapie systémique classique est sa capacité à cibler les cellules et micro-métastases qui sont trop petites pour être imagées et échappent ainsi à la chirurgie ou la radiothérapie. L' $^{90}\text{Y}$  et le  $^{177}\text{Lu}$  sont des émetteurs  $\beta^-$  largement utilisés. L' $^{111}\text{In}$  émet des photons  $\gamma$  et des électrons Auger et de conversion.

Nous avons utilisé, en partenariat avec des physiciens, le code Monte Carlo "CELLDOSE" pour déterminer les doses déposées par l' $^{90}\text{Y}$ , le  $^{177}\text{Lu}$  et l' $^{111}\text{In}$  dans des sphères de diamètres allant de 10 mm (taille maximale d'une micro-métastase) à 10  $\mu\text{m}$  (représentant une cellule tumorale isolée). Comme ces radio-isotopes diffèrent dans l'énergie des électrons libérés par désintégration, les doses déposées ont été comparées après standardisation à 1 MeV libéré par  $\mu\text{m}^3$ , ce qui représente 160 Gy si toute l'énergie est absorbée.

Nos données montrent que la dose déposée par l' $^{90}\text{Y}$  diminue de manière rapide. Dans des sphères de 10 mm, les doses déposées sont de 96,5 Gy pour l' $^{90}\text{Y}$ , 152 Gy pour le  $^{177}\text{Lu}$  et 153 Gy pour l' $^{111}\text{In}$ . Par contre pour des sphères de 100  $\mu\text{m}$ , la dose déposée par l' $^{90}\text{Y}$  n'est que de 1,36 Gy contre 24,5 Gy pour le  $^{177}\text{Lu}$  et 38,9 Gy pour l' $^{111}\text{In}$ . Enfin, pour des sphères représentant des cellules tumorales isolées, les doses délivrées par l' $^{111}\text{In}$  sont bien supérieures à celles du  $^{177}\text{Lu}$ . Par exemple, pour des cellules de 10  $\mu\text{m}$ , l' $^{111}\text{In}$  dépose 22,8 Gy alors que le  $^{177}\text{Lu}$  ne dépose que 3,92 Gy. Les électrons Auger sont responsables de 96% de la dose déposée par l' $^{111}\text{In}$  dans ce cas.

Pour la radiothérapie métabolique, le choix du radioisotope est un paramètre clé. L'émetteur  $\beta^-$  de haute énergie,  $^{90}\text{Y}$ , est bien adapté pour l'irradiation de macrométastases hétérogènes, mais il est moins efficace pour des micrométastases. Bien que des radiopharmaceutiques marqués à l' $^{90}\text{Y}$  soient aujourd'hui utilisés pour la destruction de maladies résiduelles, des émetteurs  $\beta^-$  de moyenne ou faible énergie, comme le  $^{177}\text{Lu}$  ou l' $^{111}\text{In}$ , paraissent plus adaptés.

Outre le  $^{177}\text{Lu}$ , le terbium-161 ( $^{161}\text{Tb}$ ) est un autre émetteur  $\beta^-$  de moyenne énergie, qui apparaît comme prometteur pour le radiomarquage de radiopharmaceutiques. Il offre également la possibilité d'une imagerie pré-thérapeutique grâce à une paire  $\beta^-/\beta^+$  (133). L'énergie déposée par ces deux radioéléments a donc été étudiée au cours d'un deuxième travail. Pour une sphère de 10 mm, les deux radio-isotopes déposent la même énergie (151-153 Gy). Cette énergie diminue avec la taille de la sphère, soulignant la difficulté de l'irradiation de micro-métastases. Cependant, le  $^{161}\text{Tb}$  dépose une dose supérieure par rapport au  $^{177}\text{Lu}$ : pour une sphère de 100  $\mu\text{m}$ , l'énergie déposée est de 24,5 Gy pour le  $^{177}\text{Lu}$  et 44,5 Gy pour le  $^{161}\text{Tb}$ . Les électrons Auger et de conversion représentent 71% de la dose déposée par le  $^{161}\text{Tb}$ . Cette différence est encore plus grande pour une cellule isolée de 10  $\mu\text{m}$ : les doses délivrées par le  $^{177}\text{Lu}$ , et le  $^{161}\text{Tb}$  sont de 3,9 Gy et 14,1 Gy, respectivement.

En conclusion, le  $^{161}\text{Tb}$  peut cibler efficacement des micrométastases et des cellules isolées grâce à un spectre riche en électrons de conversion de faible énergie et d'électrons

Auger. Ces résultats sont en accord avec des études récentes sur xénogreffes démontrant la supériorité du  $^{161}\text{Tb}$  par rapport au  $^{177}\text{Lu}$  (134,135).

Article 6: Dose deposits from  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  and  $^{111}\text{In}$  in micrometastases of various sizes: Implications for radiopharmaceutical therapy. *J Nucl Med.* Soumis

Elif Hindié, Paolo Zanotti-Fregonara, Michèle A. Quinto, **Clément Morgat**, Christophe  
Champion



**Dose deposits from  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  and  $^{111}\text{In}$  in micrometastases of various sizes:  
Implications for radiopharmaceutical therapy**

**Elif Hindié<sup>1</sup>, Paolo Zanotti-Fregonara<sup>1</sup>, Michele A. Quinto<sup>2</sup>, Clément Morgat<sup>1</sup>,  
Christophe Champion<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>CHU de Bordeaux, Service de Médecine Nucléaire, CNRS-UMR 5287, LabEx TRAIL,  
Université de Bordeaux, France.*

*<sup>2</sup>Université de Bordeaux, CNRS/IN2P3, Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux  
Gradignan (CENBG), France*

**Corresponding authors:**

- Pr Elif Hindié, MD, PhD

Service de Médecine Nucléaire, Hôpital Haut-Lévêque,

CHU de Bordeaux, 33604 Pessac, France.

Tel: +(33)557656838; Fax: +(33)557656839

e-mail: [elif.hindie@chu-bordeaux.fr](mailto:elif.hindie@chu-bordeaux.fr)

- Pr Christophe Champion

e-mail: [champion@cenbg.in2p3.fr](mailto:champion@cenbg.in2p3.fr)

**Financial support:** This work was funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) under contract PhysiCancer “MICRONAUTE project” and by the French Investment for the Future program within LabEx TRAIL “Translational and Advanced Imaging Laboratory”.

**Total word count: 5000**

**Running foot line: Dose deposits in micrometastases**

## ABSTRACT

Radiopharmaceutical therapy, traditionally limited to palliative settings, is increasingly used at earlier stages for adjuvant or consolidation therapy. The aim of this study was to compare the effectiveness of yttrium-90, lutetium-177 and indium-111 to irradiate “micrometastases”.  $^{90}\text{Y}$  and  $^{177}\text{Lu}$  are widely used  $\beta^-$  emitting radionuclides.  $^{111}\text{In}$  emits  $\gamma$  photons, conversion and Auger electrons.

**METHODS:** We used the Monte Carlo code CELLDOSE to assess electron doses from a uniform distribution of  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  or  $^{111}\text{In}$  in spheres with diameters ranging from a 10-mm metastasis down to a 10- $\mu\text{m}$  single cell. As these isotopes differ in electron energy per decay, doses were compared assuming 1 MeV released per  $\mu\text{m}^3$ , which would result in 160 Gy if totally absorbed.

**RESULTS:** When size decreased, the doses from  $^{90}\text{Y}$  dropped abruptly. In 10-mm spheres, doses were 96.5 Gy for  $^{90}\text{Y}$ , 152 Gy for  $^{177}\text{Lu}$ , 153 Gy for  $^{111}\text{In}$ . By contrast, in a 100- $\mu\text{m}$  metastasis, the dose from  $^{90}\text{Y}$  was only 1.36 Gy vs. 24.5 Gy for  $^{177}\text{Lu}$  and 38.9 Gy for  $^{111}\text{In}$ . In spheres of single-cell dimensions, the doses delivered by  $^{111}\text{In}$  were higher than those from  $^{177}\text{Lu}$ . For instance, in a 10- $\mu\text{m}$  cell,  $^{177}\text{Lu}$  deposited 3.92 Gy while  $^{111}\text{In}$  deposited 22.8 Gy. Auger electrons were responsible for 96% of this dose.

**CONCLUSION:** Choosing the appropriate isotope is an important issue in radiopharmaceutical therapy. The high-energy isotope  $^{90}\text{Y}$  is well suited for large and heterogeneous metastases, but it is less effective at irradiating micrometastases. Although  $^{90}\text{Y}$ -labeled radiopharmaceuticals are currently used in situations of minimal residual disease, medium- or low-energy isotopes, such as  $^{177}\text{Lu}$  or  $^{111}\text{In}$ , would be more appropriate.

**Key words:** Radiopharmaceutical therapy, dosimetry, yttrium-90, lutetium-177, indium-111

## INTRODUCTION

The main advantage of radiopharmaceutical therapy over conventional external beam radiotherapy is the ability to reach metastases and tumor cells scattered in multiple body locations (1). Decades of clinical experience with iodine-131 in differentiated thyroid cancer have shown that radionuclide therapy can prevent recurrence by targeting occult residual disease and often effectively treat small-sized pulmonary or bone metastases (2, 3). Cure rates are considerably lower when tumors are bulky (3, 4). In addition to hypoxia, which increases resistance to radiation, large metastases often present areas of lower expression of the target due to dedifferentiation, or to the presence of stromal, fibrous, or necrotic tissues. This results in non-uniform irradiation. In recent years, radionuclide therapy has diversified to include a wide array of tumor-targeting radiopharmaceuticals, such as  $^{131}\text{I}$ -MIBG in neural crest-derived tumors, anti-CD20 antibodies  $^{131}\text{I}$ -tositumomab and  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomab tiuxetan in lymphoma (5, 6) and the somatostatin analogs  $^{111}\text{In}$ -pentetrotide,  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC and  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE in neuroendocrine tumors (4, 7, 8). Many other molecules are undergoing clinical development (9-12). Moreover, from purely palliative therapy, clinical applications and trials are now expanding to include early treatment of metastatic disease, adjuvant therapy, or consolidation after remission (13-15).

Prognosis in many cancers is linked to metastatic relapse, which may occur years after primary surgery (16). The risk can be assessed from various parameters, such as initial locoregional extension, tumor grade, various biological factors, elevation of tumor markers, or the quality of response to neoadjuvant treatment (17). Moreover, several means for detecting a metastatic spread at a very early stage are now available, for example by detecting tumor cells in the bone marrow or blood (18, 19). Therefore, radiopharmaceutical therapy may find an important role as a systemic therapy for occult micrometastases in high-risk patients.

The majority of recently developed radiopharmaceuticals were labeled with either yttrium-90 (6, 7, 9) or lutetium-177 (8, 10, 12) and were usually tested first in patients with

refractory disease. Indeed,  $\beta$ -emitters with high energy such as  $^{90}\text{Y}$  (or  $^{188}\text{Re}$ ), or at least intermediate energy such as  $^{177}\text{Lu}$  (or  $^{131}\text{I}$ ), can better compensate for the heterogeneity of radiopharmaceutical distribution within the tumor mass. Indeed, the rate of partial response with these isotopes is higher than with indium-111, which emits conversion electrons and Auger electrons (4, 20). It is, however, unclear which isotopes would be more appropriate for adjuvant or consolidation therapy, where tumor lesions are presumably very small (< 5-10mm diameter and down to isolated tumor cells) and undetectable by radiological examinations. Although  $^{90}\text{Y}$  showed encouraging results in treating “occult” residual disease following remission in ovarian cancer and lymphoma (14, 15), isotopes with lower energy might be a better choice.

In the present work, we used the Monte Carlo code “CELLDOSE” to assess electron dose from a homogeneous distribution of  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  or  $^{111}\text{In}$  in spheres with diameters ranging from 10mm down to 10 $\mu\text{m}$ , representing micrometastases of various sizes and single tumor cells.

## MATERIAL AND METHODS

Decay characteristics of  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  and  $^{111}\text{In}$  are provided in Table-1. For assessment of electron dose deposit, the full data on electron emissions were obtained from ICRP-07 (21). Photons were neglected.  $\beta$ -spectra are contained in the ICRP-07.Bet file and conversion electrons (CE) and Auger electrons (including Coster-Kronig electrons) in the ICRP-07.Rad file (21). Figure-1 shows electron emissions used for Monte Carlo simulation.  $^{90}\text{Y}$  is essentially represented by a single  $\beta$ -spectrum. For  $^{177}\text{Lu}$ , we considered the integral of the 4  $\beta$ -spectra (total yield = 1), 15 Auger (and Coster-Kronig) electrons and 16 CE. Conversion electrons with probability <0.0001 were neglected (21). For  $^{111}\text{In}$ , we considered 12 Auger electrons and the 12 CE (Fig-1).

CELLDOSE is based on electron-water molecule interaction cross sections and takes into account all ionization, excitation and elastic scattering processes in order to produce an event-by-event electron track simulation (22). The full slowing-down histories

for primary and secondary electrons are described until an energy value of 7.4 eV (electronic excitation threshold of the water molecule) (23). Below this cut-off, residual energy was considered to be absorbed locally. As compared to analytic methods (24, 25), Monte Carlo codes can provide a 3D cartography of microscopic distribution of the dose and can be adapted to complex geometries (26, 27). Figure-2 shows energy deposits along the path of 1 CE and 2 Auger electrons from  $^{111}\text{In}$ .

S-values from a homogeneous distribution of  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  or  $^{111}\text{In}$  in spheres of water density with diameters from 10mm to 10 $\mu\text{m}$ , were simulated with CELLDOSE and the results were compared with available data from the literature. (*S-values for spheres of subcellular dimensions down to 0.1 $\mu\text{m}$  are also provided but will not be discussed further*). We then assessed the fraction of energy retained and the relative contribution of  $\beta^-$  particles, CE and Auger electrons.

In addition to the dose resulting from a single decay in spheres of various sizes (S-values), we calculated the doses deriving from a uniform concentration (1 decay per  $\mu\text{m}^3$ ). Moreover, because  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  and  $^{111}\text{In}$  differ in the emitted electron energy per decay, the doses were compared after normalization, by considering a fixed amount of electron energy released per unit volume (1 MeV per  $\mu\text{m}^3$ ), which would result in 160 Gy if totally absorbed. This quantity served as referential for all comparisons.

Finally, to assess the ability of each isotope to deliver a cross-dose outside labeled structures, we studied the spatial profile of dose and energy deposit around a point source.

## RESULTS

### S Values for $^{90}\text{Y}$ , $^{177}\text{Lu}$ and $^{111}\text{In}$ in Spheres of Various Sizes

S-values assessed with CELLDOSE (Table-2) are in good agreement (differences <10% in most cases) with results from analytic methods using scaled dose point kernel (24) or range-energy expressions for electrons (25). The largest difference was found for  $^{90}\text{Y}$  in

the 5000 $\mu\text{m}$  sphere: S-value from Goddu was 11% lower, and that reported by Bardiès 5.4% higher, than our measured value (Table-2). Results from Cai (MCNP code) for  $^{111}\text{In}$  in spheres of cell dimension also showed excellent agreement with our data (27).

### **Energy Retained in the Spheres and Contribution of the Different Electronic Emissions.**

The fraction of electron energy retained decreases along with sphere size (Table-3). For  $^{111}\text{In}$  and  $^{177}\text{Lu}$ , Auger contribution to the dose increases as the spheres got smaller. For  $^{111}\text{In}$ , it reached 96% in the sphere of 10 $\mu\text{m}$  diameter (Table-3).

### **Electron Dose Deposits Before and After Normalization.**

Table-4 shows, for each isotope and sphere, the dose from 1 decay (S-value), the dose for 1 decay occurring per  $\mu\text{m}^3$  and the dose for 1 MeV released per  $\mu\text{m}^3$  (normalization for differences in electron energy per decay).

When 1 MeV is released in every  $\mu\text{m}^3$ , the absorbed dose for a metastasis of 10mm is 96.5 Gy with  $^{90}\text{Y}$ , 152 Gy with  $^{177}\text{Lu}$  and 153 Gy with  $^{111}\text{In}$ . However, when considering a metastasis of 1mm diameter, the dose delivered by  $^{90}\text{Y}$  falls to 13.3 Gy as compared to 104 Gy for  $^{177}\text{Lu}$  and 118 Gy for  $^{111}\text{In}$ . For a micrometastasis of 100 $\mu\text{m}$  diameter, the dose is only 1.36 Gy for  $^{90}\text{Y}$ , but 24.5 Gy for  $^{177}\text{Lu}$  and 38.9 Gy for  $^{111}\text{In}$  (Table-4 and Fig-3).

$^{111}\text{In}$  delivers a higher dose than  $^{177}\text{Lu}$  in the smaller spheres ( $\leq 100 \mu\text{m}$ ). For instance, in a homogeneously labeled single cell of 10 $\mu\text{m}$  diameter, the dose from  $^{111}\text{In}$  (22.8 Gy) is about 6 times higher than that from  $^{177}\text{Lu}$  (3.92 Gy) (Table-4, Fig-3).

### **Dose and Energy Deposit Around a Point source**

The profile of dose deposit is shown in Fig-4. Energy deposit is shown in Fig-5A. The residual energy is close to zero at 10mm for  $^{90}\text{Y}$ , 1.6 mm for  $^{177}\text{Lu}$ , 0.62mm for  $^{111}\text{In}$ . The distance within which 90% of emitted energy is deposited (R90) is 5.82 mm for  $^{90}\text{Y}$ , 0.62 mm for  $^{177}\text{Lu}$  and 0.37 mm for  $^{111}\text{In}$ .

Fig-5B shows energy deposit after normalization. At a distance beyond 0.8mm from a point source,  $^{90}\text{Y}$  deposits more energy (per MeV released) than  $^{177}\text{Lu}$ .

<sup>111</sup>In has a complex profile of energy deposit with a high peak (four times higher than that of <sup>177</sup>Lu) in the first shell of 10µm thickness around the point source (Fig-5C), which underscores the importance of cellular internalization for Auger-emitting radioisotopes.

## DISCUSSION

The aim of this study was to compare the effectiveness of <sup>90</sup>Y (high-energy β<sup>-</sup>), <sup>177</sup>Lu (medium-energy β<sup>-</sup>) and <sup>111</sup>In (conversion and Auger electrons) to irradiate micrometastases. These radiometals can be efficiently linked, via chelators, to various peptides and antibodies for radiopharmaceutical therapy (4, 6-12, 20).

Many radiopharmaceuticals were initially designed to be used in patients with advanced metastatic disease and the choice of the radionuclide had been made accordingly. These same radiopharmaceuticals were however directly applied to other clinical settings. For example, anti-CD20 antibodies, labeled with <sup>90</sup>Y, have been used to treat relapsed lymphoma (6), but are now also used for consolidation after successful chemotherapy (15). The same isotope may however not be equally effective to treat both large tumor masses in refractory patients and minimal residual disease. In radionuclide therapy, there is an “optimal tumor size for cure” which differs from one radionuclide to another (28, 29). Our results clearly suggest that <sup>90</sup>Y is not an adequate isotope for eradicating “micrometastases”, because most of the energy is deposited outside the tumor (Table-3). This may reduce efficacy and increase toxicity.

To facilitate comparisons between isotopes, whose electron energy per decay differ, we assumed an amount of energy released of 1 MeV per µm<sup>3</sup>. If totally absorbed, this energy would always yield 160 Gy. This dose is within the range of doses measured in macrometastases from solid tumors that responded to radionuclide therapy (30). For example, doses associated with objective response to <sup>90</sup>Y-DOTATOC in neuroendocrine tumors averaged 232Gy and doses >80Gy were required in thyroid cancer metastases (30). Smaller tumors are less heterogeneous and should respond to lower doses, but it is important to make sure that even occult micrometastases are targeted with a dose high

enough to avoid relapse. Thus normalized, the dose from  $^{90}\text{Y}$  in a 1cm-metastasis was 96Gy (vs. 152 Gy with  $^{177}\text{Lu}$ ). However, the dose delivered by  $^{90}\text{Y}$  steeply decreased with decreasing sphere size (Table-4 & fig-3B). In a 1mm metastasis, the dose from  $^{90}\text{Y}$  fell to 13.3Gy (vs.104Gy with  $^{177}\text{Lu}$ ). In a micrometastasis of 100  $\mu\text{m}$ , the dose delivered by  $^{90}\text{Y}$  was only 1.36Gy, while  $^{177}\text{Lu}$  delivered 24.5Gy.

These results are in line with some in-vivo studies, which showed a higher rate of eradication of micrometastases with  $^{177}\text{Lu}$  compared to  $^{90}\text{Y}$  (31). The findings might diverge, however, in case of heterogeneous targeting. For example, one study assessing anti-CD20 pretargeted radioimmunotherapy of lymphoma xenografts reported higher efficacy with  $^{90}\text{Y}$  (32). However, the average tumor diameter at treatment was 8 mm (higher than that of actual micrometastases) and targeting within tumors was highly heterogeneous (32). The same activity (37MBq) was used for both  $^{90}\text{Y}$  and  $^{177}\text{Lu}$ , which yields a different amount of released energy (Table-1). Tumor uptake (I.D./g) decreased over time (11.8% at 4h; 3.7% at 120h); the longer half-life of  $^{177}\text{Lu}$  was here a drawback. Finally, the “pretargeting” approach requires that the antibody be retained at the cell membrane (without being internalized), and this reduces the benefit of low-energy electrons.

At a distance beyond 0.8mm,  $^{90}\text{Y}$  deposits more energy (per MeV released) than  $^{177}\text{Lu}$  (Fig-5B). Thus,  $^{90}\text{Y}$  should be preferred to irradiate large, presumably heterogeneous, metastases or in case of indirect targeting, as in the case of intra-arterial radioembolization for liver malignancies (33). Combining  $^{90}\text{Y}$  with  $^{177}\text{Lu}$  might also be advantageous to treat metastases of various sizes, as suggested by experimental data (34).

Regarding very small metastases (<100 $\mu\text{m}$ ) and single tumor cells,  $^{111}\text{In}$  may be a better choice than  $^{177}\text{Lu}$  (Table-4 and Fig-3B): in a 10 $\mu\text{m}$  cell, the dose delivered by  $^{111}\text{In}$  was about 6 times higher than that from  $^{177}\text{Lu}$  (22.8 Gy vs. 3.92 Gy). Auger electrons contributed ~96% of  $^{111}\text{In}$  dose (Table-3). Some experimental findings suggested that the rate of eradication of micrometastases and single cells is higher with  $^{177}\text{Lu}$  than  $^{90}\text{Y}$  (31) and with  $^{111}\text{In}$  than with  $^{177}\text{Lu}$  or  $^{90}\text{Y}$  (31, 35). Many teams actively work on developing radiopharmaceuticals labeled with  $^{177}\text{Lu}$  or  $^{111}\text{In}$  with the aim of targeting micrometastases or specifically targeting cancer stem cells (36-39).



In order to assess the relative merits of labeling with  $^{111}\text{In}$  rather than  $^{177}\text{Lu}$ , several points need to be considered, and first of all, the cellular and subcellular distribution of the radiopharmaceutical. Techniques such as high-resolution autoradiography or secondary ion mass spectrometry can quantitatively depict the distribution at cellular level (40). This distribution may be used as input to the Monte Carlo code to derive the dose (26, 27). Uniform distribution, as considered in the present study, is an acceptable model for some molecules which are internalized via receptor-mediated endocytosis and partly trafficked to the nucleus. Examples include growth factors such as EGF (20), and agonist analogs of neuropeptides such as somatostatin, GLP-1, or bombesin (11). Neuropeptide antagonists are not internalized. Some molecules (e.g. MIBG) accumulate in cytoplasmic compartments. Many antibodies are internalized after binding to their membrane receptor (e.g. antibodies targeting CD22, EpCAM, PSMA, transferrin receptor, carbonic anhydrase IX, EGFR, HER2), whereas others (e.g. anti-CD20 and anti-CEA) are less internalized. Figure-2 shows that  $^{111}\text{In}$  conversion electrons have a long path, encompassing several cell diameters, and would act mainly through cross-fire, while Auger electrons deposit their energy within few micrometers (Auger KLL 19.3 keV) or even a fraction of micrometer (Auger LMM 2.61 keV). Internalization is thus necessary to maximize the radiation deposit of Auger emissions (37, 38). Strategies for facilitating the routing of  $^{111}\text{In}$ -radiopharmaceuticals to the nucleus are being developed (37, 39).

Photon emission is another point to consider. Isotopes with a small photon component (such as  $^{177}\text{Lu}$ , but not  $^{90}\text{Y}$ ) have the additional advantage of facilitating post-therapy imaging and dosimetry. However, the high proportion of photon emission with  $^{111}\text{In}$  (Table-1) is an inconvenient, because it adds to the total body dose. Moreover, while out-patient therapy is easily feasible with  $^{90}\text{Y}$  and  $^{177}\text{Lu}$ , photons emissions from  $^{111}\text{In}$  require patient hospitalization in most countries.

## CONCLUSION

Radiopharmaceutical therapy can effectively target disseminated tumor cells and occult micrometastases. However, selecting the optimal isotope is an important issue. Our data clearly suggest that  $^{177}\text{Lu}$  is a more appropriate choice than  $^{90}\text{Y}$  in this setting. While

the Auger-emitter  $^{111}\text{In}$  is also an interesting option, a full comparison of the merits of  $^{111}\text{In}$  vs.  $^{177}\text{Lu}$  for a specific clinical application should take into account additional factors such as the subcellular distribution of the radiopharmaceutical or whole-body dosimetry from gamma emission. Our future work will focus on these issues and also address other potentially useful  $\beta$ -, Auger and  $\alpha$ -emitters.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Pr. Keith Eckerman for helpful discussions regarding the ICRP-107 data files.

## References

1. Volkert WA, Hoffman TJ. Therapeutic radiopharmaceuticals. *Chem Rev.* 1999;99:2269-92.
2. Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med.* 1994;97:418-28.
3. Hindié E, Zanotti-Fregonara P, Keller I, et al. Bone metastases of differentiated thyroid cancer: impact of early <sup>131</sup>I-based detection on outcome. *Endocr Relat Cancer.* 2007;14:799-807.
4. Kwekkeboom DJ, Mueller-Brand J, Paganelli G, et al. Overview of results of peptide receptor radionuclide therapy with 3 radiolabeled somatostatin analogs. *J Nucl Med.* 2005;46 Suppl 1:62S-6S.
5. Kaminski MS, Zelenetz AD, Press OW, et al. Pivotal study of iodine I 131 tositumomab for chemotherapy-refractory low-grade or transformed low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol.* 2001;19:3918-28.
6. Witzig TE, Gordon LI, Cabanillas F, et al. Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2002;20:2453-63.
7. Waldherr C, Pless M, Maecke HR, et al. Tumor response and clinical benefit in neuroendocrine tumors after 7.4 GBq (90)Y-DOTATOC. *J Nucl Med.* 2002;43:610-6.
8. Kwekkeboom DJ, de Herder WW, Kam BL, et al. Treatment with the radiolabeled somatostatin analog [<sup>177</sup>Lu-DOTA-0,Tyr3]octreotate: toxicity, efficacy, and survival. *J Clin Oncol.* 2008;26:2124-30.
9. Morschhauser F, Kraeber-Bodéré F, Wegener WA, 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.* 2010;28:3709-16.

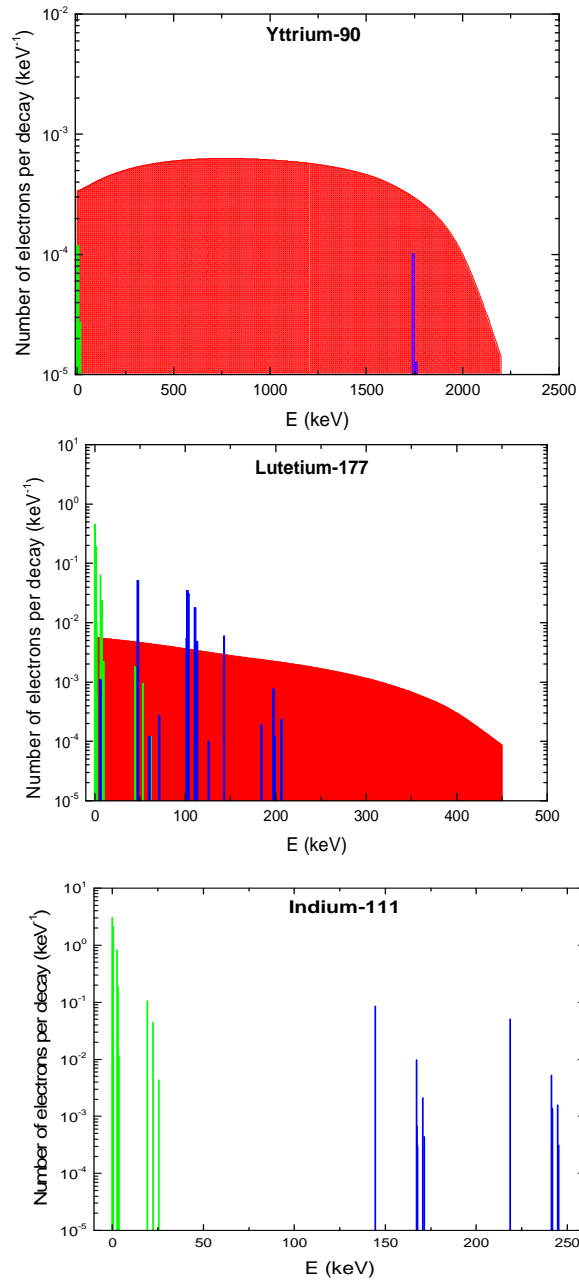
10. Stillebroer AB, Boerman OC, Desar IM, et al. Phase 1 radioimmunotherapy study with lutetium 177-labeled anti-carbonic anhydrase IX monoclonal antibody girentuximab in patients with advanced renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2013;64:478-85.
11. Morgat C, Mishra AK, Varshney R, Allard M, Fernandez P, Hindié E. Targeting neuropeptide receptors for cancer imaging and therapy: perspectives with bombesin, neurotensin, and neuropeptide-Y receptors. *J Nucl Med*. 2014;55:1650-7.
12. Kratochwil C, Giesel FL, Eder M, et al. [<sup>177</sup>Lu]Lutetium-labelled PSMA ligand-induced remission in a patient with metastatic prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015;42:987-8.
13. Liersch T, Meller J, Kulle B, et al. Phase II trial of carcinoembryonic antigen radioimmunotherapy with <sup>131</sup>I-labetuzumab after salvage resection of colorectal metastases in the liver: five-year safety and efficacy results. *J Clin Oncol*. 2005;23:6763-70.
14. Oei AL, Verheijen RH, Seiden MV, et al. Decreased intraperitoneal disease recurrence in epithelial ovarian cancer patients receiving intraperitoneal consolidation treatment with yttrium-90-labeled murine HMFG1 without improvement in overall survival. *Int J Cancer*. 2007;120:2710-4.
15. Morschhauser F, Radford J, Van Hoof A, 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*. 2008;26:5156-64.
16. Pantel K, Alix-Panabières C, Riethdorf S. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6:339-51.
17. Groheux D, Giacchetti S, Delord M, et al. Prognostic impact of <sup>18</sup>F-FDG PET/CT staging and of pathological response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015;42:377-85.

18. Braun S, Pantel K, Müller P, et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med*. 2000;342:525-33.
19. Reeh M, Effenberger KE, Koenig AM, et al. Circulating tumor cells as a biomarker for preoperative prognostic staging in patients with esophageal cancer. *Ann Surg*. Jan 20, 2015 [Epub ahead of print].
20. Vallis KA, Reilly RM, Scollard D, et al. Phase I trial to evaluate the tumor and normal tissue uptake, radiation dosimetry and safety of (111)In-DTPA-human epidermal growth factor in patients with metastatic EGFR-positive breast cancer. *Am J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;4:181-92.
21. Eckerman K, Endo A. ICRP Publication 107. Nuclear decay data for dosimetric calculations. *Ann ICRP* 2008;38:7-96.
22. Champion C, Zanotti-Fregonara P, Hindié E. CELLDOSE: a Monte Carlo code to assess electron dose distribution--S values for 131I in spheres of various sizes. *J Nucl Med*. 2008;49:151-7.
23. Champion C. Theoretical cross sections for electron collisions in water: structure of electron tracks. *Phys Med Biol*. 2003;48:2147-68.
24. Bardiès M, Chatal JF. Absorbed doses for internal radiotherapy from 22 beta-emitting radionuclides: beta dosimetry of small spheres. *Phys Med Biol*. 1994;39:961-81.
25. Goddu SM, Rao DV, Howell RW. Multicellular dosimetry for micrometastases: dependence of self-dose versus cross-dose to cell nuclei on type and energy of radiation and subcellular distribution of radionuclides. *J Nucl Med*. 1994;35:521-30.
26. Hindié E, Champion C, Zanotti-Fregonara P, et al. Calculation of electron dose to target cells in a complex environment by Monte Carlo code "CELLDOSE". *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2009;36:130-6.

27. Cai Z, Pignol JP, Chan C, Reilly RM. Cellular dosimetry of (111)In using monte carlo N-particle computer code: comparison with analytic methods and correlation with in vitro cytotoxicity. *J Nucl Med*. 2010;51:462-70.
28. O'Donoghue JA, Bardiès M, Wheldon TE. Relationships between tumor size and curability for uniformly targeted therapy with beta-emitting radionuclides. *J Nucl Med*. 1995;36:1902-9.
29. Bernhardt P, Forssell-Aronsson E, Jacobsson L, Skarnemark G. Low-energy electron emitters for targeted radiotherapy of small tumours. *Acta Oncol*. 2001;40:602-8.
30. Strigari L, Konijnenberg M, Chiesa C, et al. The evidence base for the use of internal dosimetry in the clinical practice of molecular radiotherapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;41:1976-88.
31. Michel RB, Andrews PM, Rosario AV, Goldenberg DM, Mattes MJ. <sup>177</sup>Lu-antibody conjugates for single-cell kill of B-lymphoma cells in vitro and for therapy of micrometastases in vivo. *Nucl Med Biol*. 2005;32:269-78.
32. Frost SH, Frayo SL, Miller BW, et al. Comparative efficacy of <sup>177</sup>Lu and <sup>90</sup>Y for anti-CD20 pretargeted radioimmunotherapy in murine lymphoma xenograft models. *PLoS One*. 2015;10:e0120561.
33. Mazzaferro V, Sposito C, Bhoori S, et al. Yttrium-90 radioembolization for intermediate-advanced hepatocellular carcinoma: a phase 2 study. *Hepatology*. 2013;57:1826-37.
34. de Jong M, Breeman WA, Valkema R, Bernard BF, Krenning EP. Combination radionuclide therapy using <sup>177</sup>Lu- and <sup>90</sup>Y-labeled somatostatin analogs. *J Nucl Med*. 2005;46 Suppl 1:13S-7S.
35. Behr TM, Béhé M, Löhr M, et al. Therapeutic advantages of Auger electron- over beta-emitting radiometals or radioiodine when conjugated to internalizing antibodies. *Eur J Nucl Med*. 2000;27:753-65.
36. D'Huyvetter M, Vincke C, Xavier C, et al. Targeted radionuclide therapy with A <sup>177</sup>Lu-labeled anti-HER2 nanobody. *Theranostics*. 2014;4:708-20.

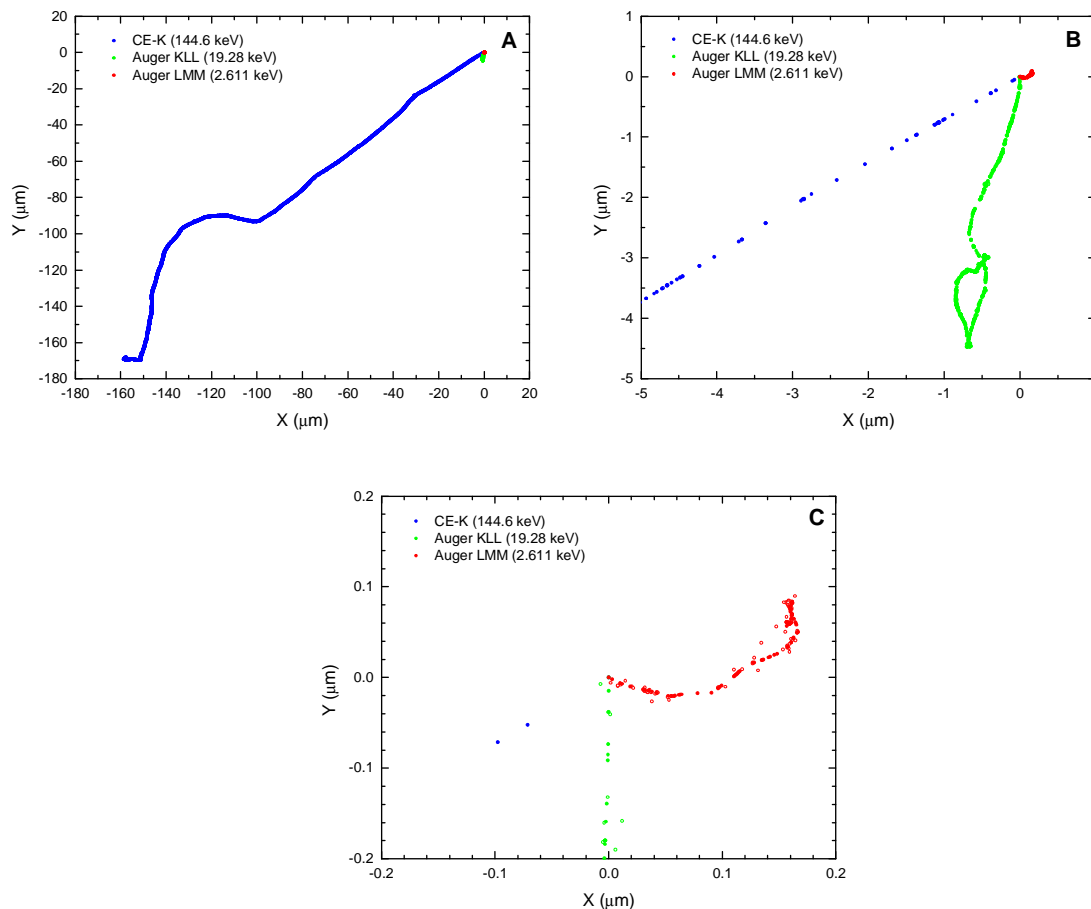
37. Kassis AI. The amazing world of auger electrons. *Int J Radiat Biol.* 2004;80:789-803.
38. Falzone N, Fernández-Varea JM, Flux G, Vallis KA. Monte Carlo evaluation of Auger electron-emitting theragnostic radionuclides. *J Nucl Med.* Jul 23, 2015 [Epub ahead of print].
39. Leyton JV, Hu M, Gao C, et al. Auger electron radioimmunotherapeutic agent specific for the CD123+/CD131- phenotype of the leukemia stem cell population. *J Nucl Med.* 2011;52:1465-73.
40. Chéhadé F, de Labriolle-Vaylet C, Moins N, et al. Secondary ion mass spectrometry as a tool for investigating radiopharmaceutical distribution at the cellular level: the example of I-BZA and (14)C-I-BZA. *J Nucl Med.* 2005;46:1701-6.

## Figure Legends

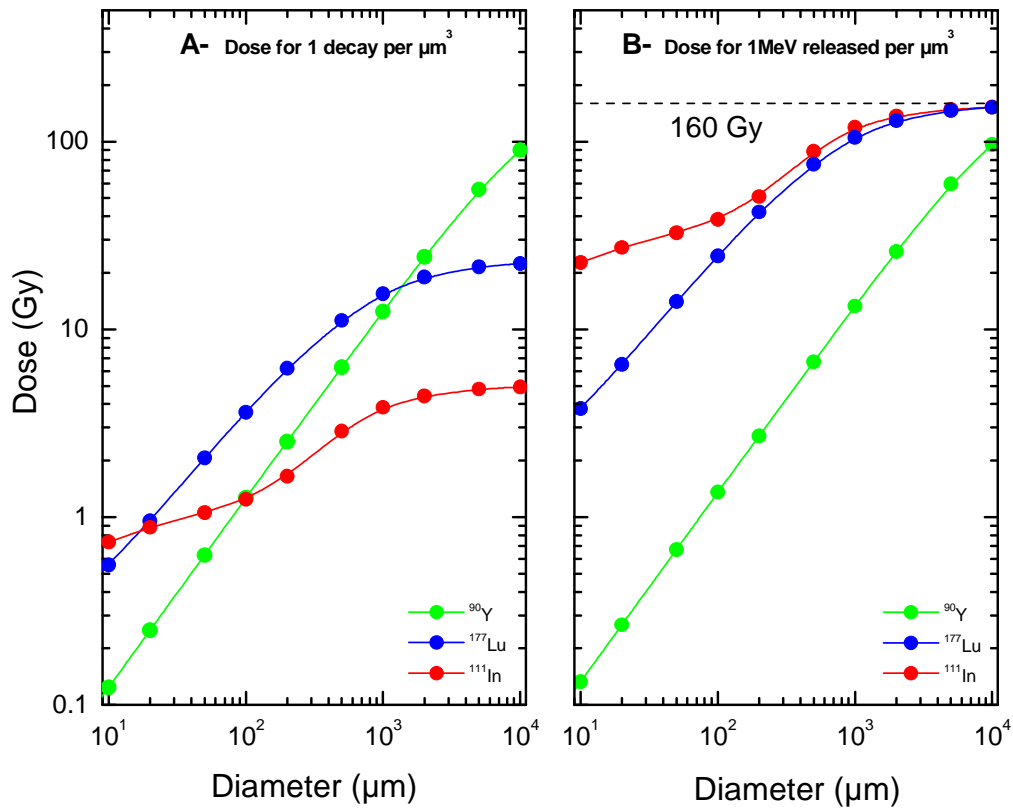


**Figure-1:** Electron emissions of  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  and  $^{111}\text{In}$ .  $\beta$ -spectra are in red, conversion electrons are in blue and Auger electrons in green.

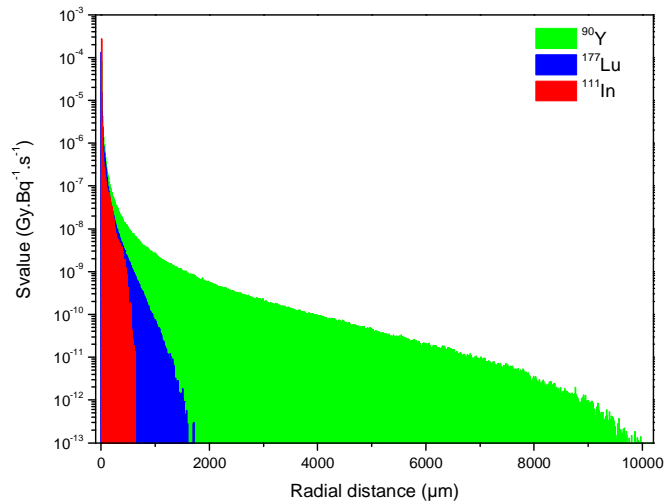




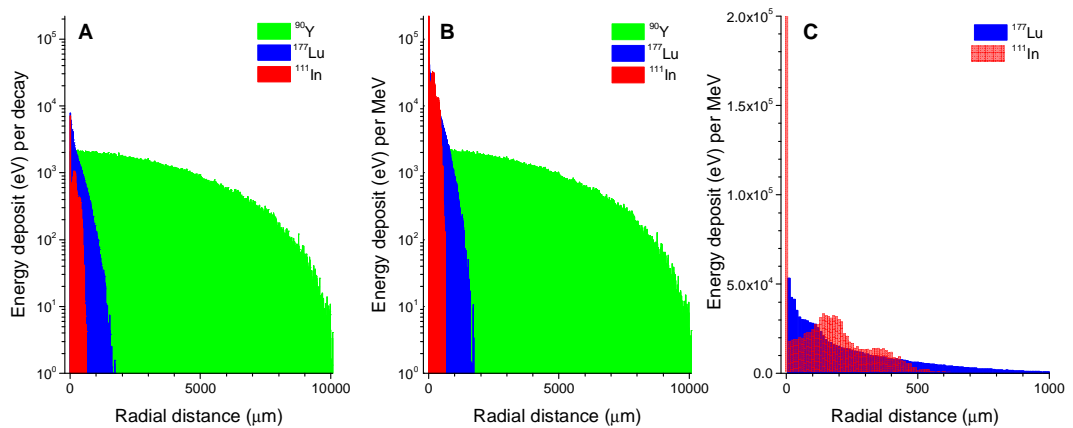
**Figure-2:** (A) Two-dimensional plots of the tracks of 3 representative electrons from  $^{111}\text{In}$ : CE-K (144.6 keV), Auger KLL (19.28 keV) and Auger LMM (2.61 keV) as simulated with CELLDOSE. (B) Magnification of the path of the two Auger electrons. (C) Further magnification of the path of the 2.61 keV Auger electron. The solid and open circles represent the ionizing interactions induced by the primary and the secondary electrons, respectively.



**Figure-3:** Electron dose from  $^{90}\text{Y}$  (green),  $^{177}\text{Lu}$  (blue) or  $^{111}\text{In}$  (red) as a function of sphere size. (A) Electron dose considering that 1 decay occurs per  $\mu\text{m}^3$  (B) Electron dose considering 1 MeV released per  $\mu\text{m}^3$ . 160 Gy/MeV/ $\mu\text{m}^3$  corresponds to total absorption.



**Figure-4:** Dose profile (S-value) around a point source of  $^{90}\text{Y}$  (green),  $^{177}\text{Lu}$  (blue) and  $^{111}\text{In}$  (red).



**Figure-5:** (A) Energy deposit (eV per decay) within concentric shells of 10- $\mu\text{m}$  thickness around a point source of  $^{90}\text{Y}$  (green),  $^{177}\text{Lu}$  (blue) and  $^{111}\text{In}$  (red). (B) Energy deposit per MeV released. (C) Energy deposit (eV per MeV released) of  $^{177}\text{Lu}$  and  $^{111}\text{In}$  over the first 1000  $\mu\text{m}$  around a point source. (Energy deposit is in logarithmic scale in A and B and linear scale in C).

**Table-1: Some characteristics of the three radionuclides**

Nuclide	<sup>90</sup> Y	<sup>177</sup> Lu	<sup>111</sup> In
Half-life (days)	2.671	6.647	2.805
Type of Decay (%)	β <sup>-</sup> (100 %)	β <sup>-</sup> (100 %)	EC (100%)
β particles mean energy (keV)	932.9	133.3	-
Conversion electrons (keV per decay)	0.2	13.52	27.94
CE energy range (keV)		6.2 - 206.3	144.6 – 245.4
Auger and Coster-Kronig electrons (keV per decay)	0.0007	1.13	6.88
Auger and Coster-Kronig electrons energy range (keV)		0.01 – 61.7	0.037 – 25.6
Total electron energy per decay (keV)	933.1	147.9	34.82
γ radiation useful for imaging: Energy in keV and abundance (%)	-	208.4 (11 %); 112.9 (6.4 %)	245.4 (94.1 %); 171.3 (90.6 %)
Photons X and γ (total energy per decay in keV)	0.0012	35.1	404.96
Energy per decay in keV (photons + electrons)		183	439.78
Percentage of energy emitted as photons	~ 0	19.2 %	92.1 %

**Table-2: S-values in spheres of various sizes for  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  and  $^{111}\text{In}$  and comparison with published data**

Diameter ( $\mu\text{m}$ )	Radius ( $\mu\text{m}$ )	$^{90}\text{Y}$ ( $\text{Gy.Bq}^{-1}.\text{s}^{-1}$ )	Bardiès * (24)	Goddu * (25)	$^{177}\text{Lu}$ ( $\text{Gy.Bq}^{-1}.\text{s}^{-1}$ )	Bardiès * (24)	$^{111}\text{In}$ ( $\text{Gy.Bq}^{-1}.\text{s}^{-1}$ )	Goddu * (25)
								Cai (27)
10000	5000	$1.72 \times 10^{-10}$	+5.2 %		$4.30 \times 10^{-11}$	+0.5 %	$1.01 \times 10^{-11}$	
5000	2500	$8.50 \times 10^{-10}$	+5.4 %	-11 %	$3.29 \times 10^{-10}$	+0.8 %	$7.88 \times 10^{-11}$	+0.35 %
2000	1000	$5.80 \times 10^{-9}$	+2.9 %		$4.54 \times 10^{-9}$	+1.2 %	$1.13 \times 10^{-9}$	
1000	500	$2.37 \times 10^{-8}$	+0.7 %	-7.8 %	$2.94 \times 10^{-8}$	+1.5 %	$7.86 \times 10^{-9}$	-5.2 %
500	250	$9.59 \times 10^{-8}$	-0.9 %		$1.69 \times 10^{-7}$	+0.5 %	$4.75 \times 10^{-8}$	
200	100	$6.03 \times 10^{-7}$	-1.8 %	-5.3 %	$1.48 \times 10^{-6}$	-1.1 %	$4.28 \times 10^{-7}$	-7.2 %
100	50	$2.42 \times 10^{-6}$	-2.2 %		$6.93 \times 10^{-6}$	-2.8 %	$2.58 \times 10^{-6}$	
50	25	$9.58 \times 10^{-6}$			$3.18 \times 10^{-5}$		$1.75 \times 10^{-5}$	
20	10	$5.95 \times 10^{-5}$	+1.2 %	+2.2 %	$2.33 \times 10^{-4}$	-8.3 %	$2.28 \times 10^{-4}$	-1.5 %
								+1.1% §
10	5	$2.37 \times 10^{-4}$		+3.9 %	$1.11 \times 10^{-3}$		$1.52 \times 10^{-3}$	-3.1 %
								+0.4% §
5	2.5	$9.42 \times 10^{-4}$			$5.54 \times 10^{-3}$		$1.01 \times 10^{-2}$	
2	1	$5.94 \times 10^{-3}$		+6.4 %	$4.92 \times 10^{-2}$		$1.36 \times 10^{-1}$	+1.7 %
1	0.5	$2.34 \times 10^{-2}$			$2.54 \times 10^{-1}$		$9.66 \times 10^{-1}$	
0.5	0.25	$8.98 \times 10^{-2}$			1.39		6.37	
0.2	0.1	$5.14 \times 10^{-1}$			14.3		61.3	
0.1	0.05	1.92			78.0		355	

\* [S value from the quoted author - present S value] / present S value

§ comparison with Cai (27).

**Table-3: Retained energy (percentage and absolute value) and contribution of the different electronic emissions**

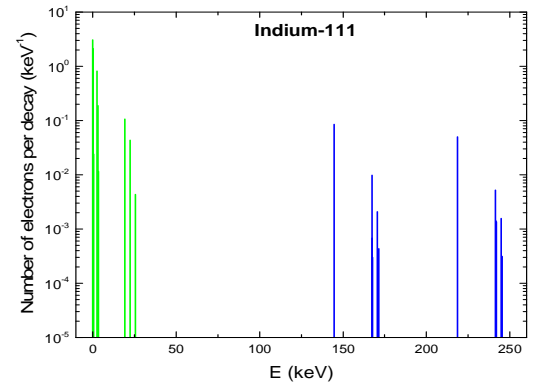
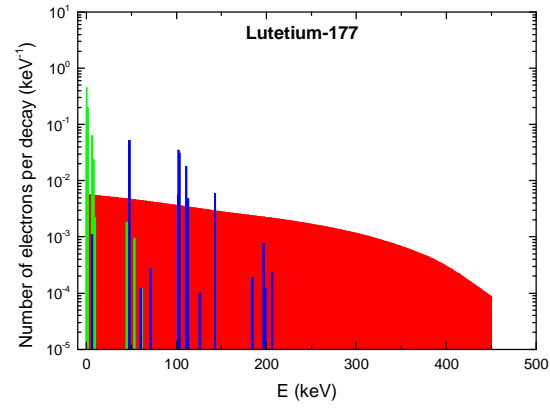
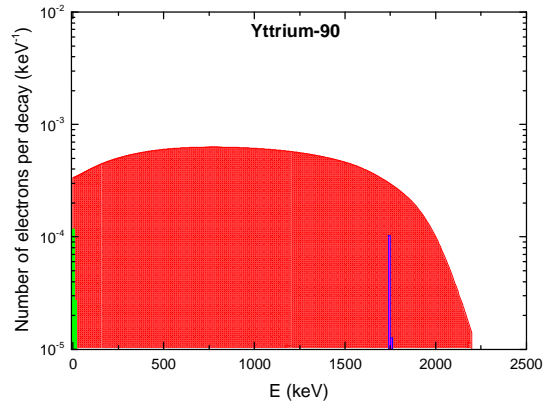
Sphere diameter ( $\mu\text{m}$ )	Radius ( $\mu\text{m}$ )	Retained energy (%)			Retained energy (keV per decay)			Relative contribution* (of different electronic emissions)				
		$^{90}\text{Y}$	$^{177}\text{Lu}$	$^{111}\text{In}$	$^{90}\text{Y}$	$^{177}\text{Lu}$	$^{111}\text{In}$	$^{177}\text{Lu}$			$^{111}\text{In}$	
								$\beta^-$ (%)	CE (%)	Auger (%)	CE (%)	Auger (%)
10000	5000	60.3	95.0	95.3	563	140	33.2	90.0	9.2	0.8	79.9	20.1
5000	2500	37.2	91.0	92.6	347	135	32.2	89.7	9.5	0.8	79.3	20.7
2000	1000	16.2	80.2	85.1	152	119	29.6	88.7	10.4	0.9	77.6	22.4
1000	500	8.31	65.1	73.9	77.7	96.3	25.7	86.9	12.0	1.1	74.2	25.8
500	250	4.19	46.7	55.8	39.2	69.2	19.4	83.8	14.6	1.6	66.0	34.0
200	100	1.69	26.1	32.2	15.8	38.6	11.2	80.1	17.1	2.8	41.8	58.2
100	50	0.85	15.3	24.3	7.93	22.6	8.44	79.4	15.9	4.7	24.2	75.8
50	25	0.42	8.79	20.5	3.92	13.0	7.15	77.5	14.7	7.8	13.4	86.6
20	10	0.17	4.13	17.1	1.56	6.11	5.95	73.7	10.5	15.8	6.1	93.9
10	5	0.08	2.45	14.3	0.77	3.62	4.96	66.1	8.2	25.7	3.5	96.5

\* For  $^{90}\text{Y}$ , the contribution from  $\beta^-$  emission to energy deposit is >99%

**Table-4: Comparison of electron dose deposit for the 3 isotopes***(also see figure-3)*

Sphere diameter ( $\mu\text{m}$ )	Radius ( $\mu\text{m}$ )	Dose per decay (Gy)			Dose for 1 decay per $\mu\text{m}^3$ (Gy)			Dose for 1 MeV released per $\mu\text{m}^3$ (Gy)		
		<sup>90</sup> Y	<sup>177</sup> Lu	<sup>111</sup> In	<sup>90</sup> Y	<sup>177</sup> Lu	<sup>111</sup> In	<sup>90</sup> Y	<sup>177</sup> Lu	<sup>111</sup> In
10000	5000	$1.72 \times 10^{-10}$	$4.30 \times 10^{-11}$	$1.01 \times 10^{-11}$	90.1	22.5	5.31	96.5	152	153
5000	2500	$8.50 \times 10^{-10}$	$3.29 \times 10^{-10}$	$7.88 \times 10^{-11}$	55.6	21.6	5.16	59.5	145	148
2000	1000	$5.80 \times 10^{-9}$	$4.54 \times 10^{-9}$	$1.13 \times 10^{-9}$	24.3	19.0	4.74	26.0	128	136
1000	500	$2.37 \times 10^{-8}$	$2.94 \times 10^{-8}$	$7.86 \times 10^{-9}$	12.4	15.4	4.12	13.3	104	118
500	250	$9.59 \times 10^{-8}$	$1.69 \times 10^{-7}$	$4.75 \times 10^{-8}$	6.27	11.1	3.11	6.71	74.8	89.3
200	100	$6.03 \times 10^{-7}$	$1.48 \times 10^{-6}$	$4.28 \times 10^{-7}$	2.53	6.18	1.79	2.70	41.8	51.5
100	50	$2.42 \times 10^{-6}$	$6.93 \times 10^{-6}$	$2.58 \times 10^{-6}$	1.27	3.63	1.35	1.36	24.5	38.9
50	25	$9.58 \times 10^{-6}$	$3.18 \times 10^{-5}$	$1.75 \times 10^{-5}$	0.63	2.08	1.14	0.67	14.1	32.9
20	10	$5.95 \times 10^{-5}$	$2.33 \times 10^{-4}$	$2.28 \times 10^{-4}$	0.25	0.98	0.95	0.27	6.61	27.4
10	5	$2.37 \times 10^{-4}$	$1.11 \times 10^{-3}$	$1.52 \times 10^{-3}$	0.12	0.58	0.79	0.13	3.92	22.8

**Figure-1**





**Figure-2**

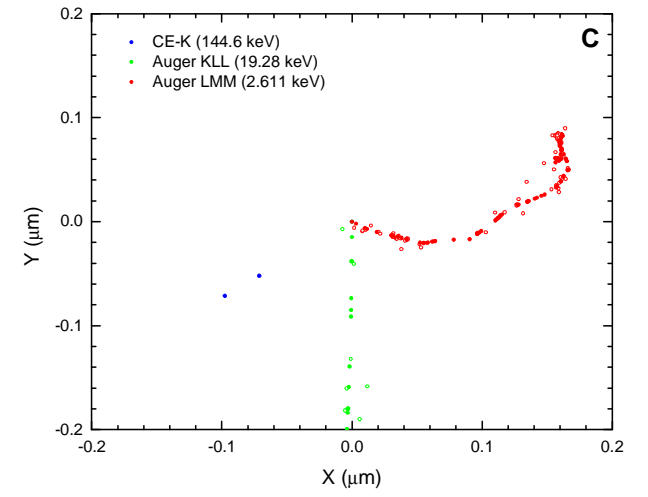
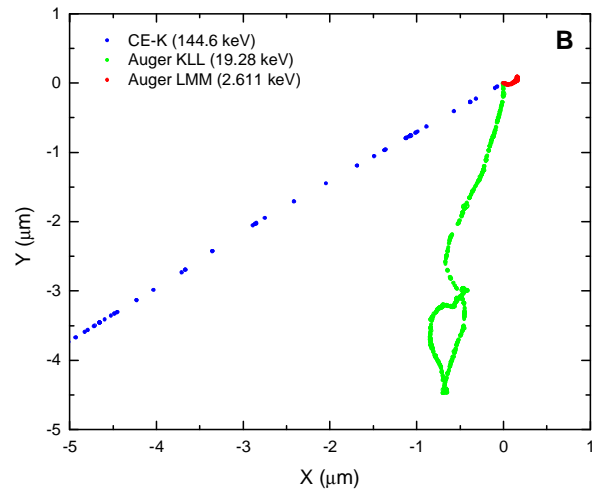
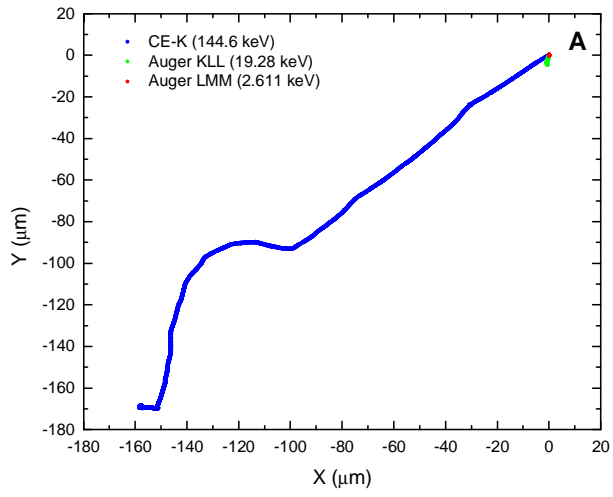
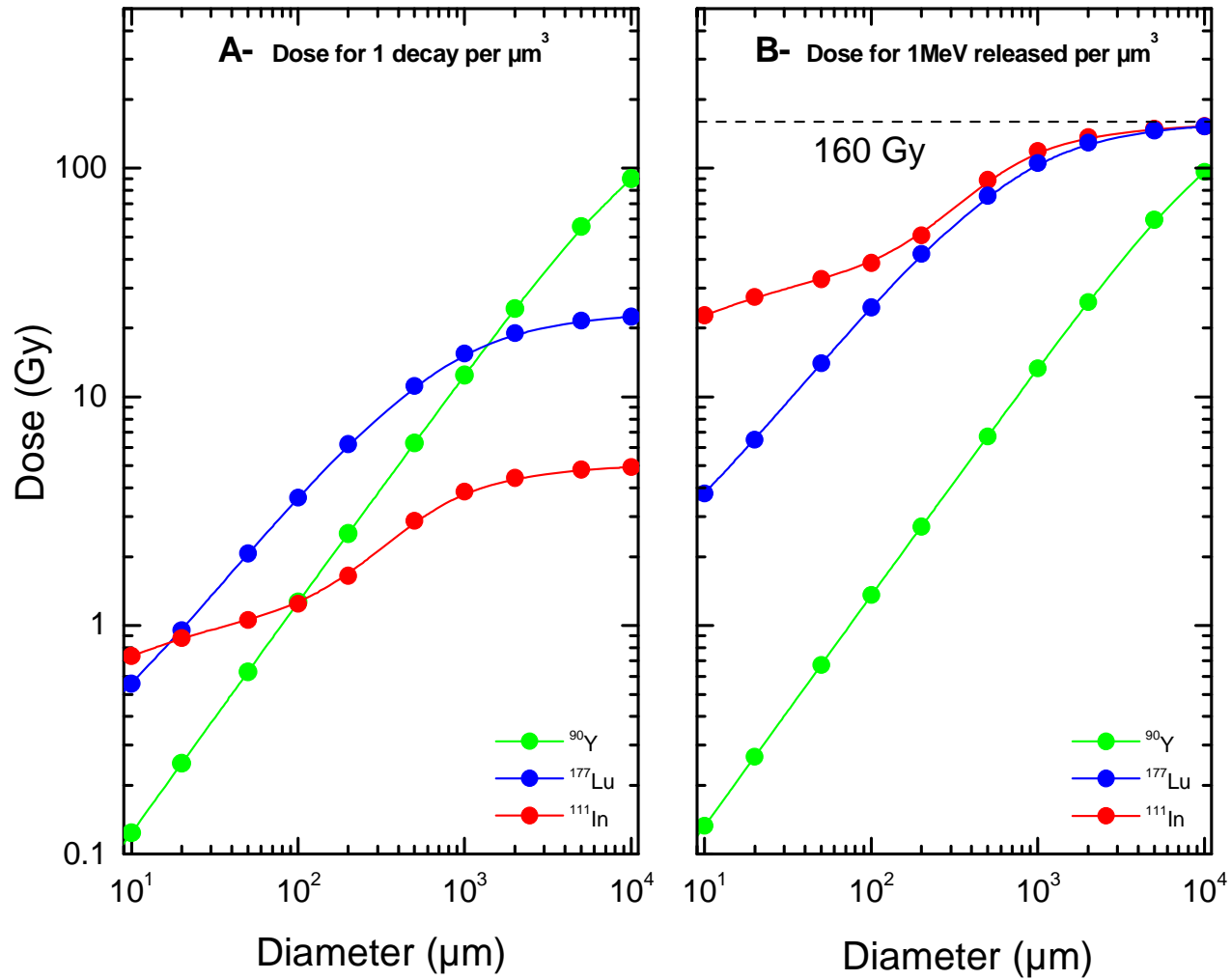


Figure-3



**Figure-4**

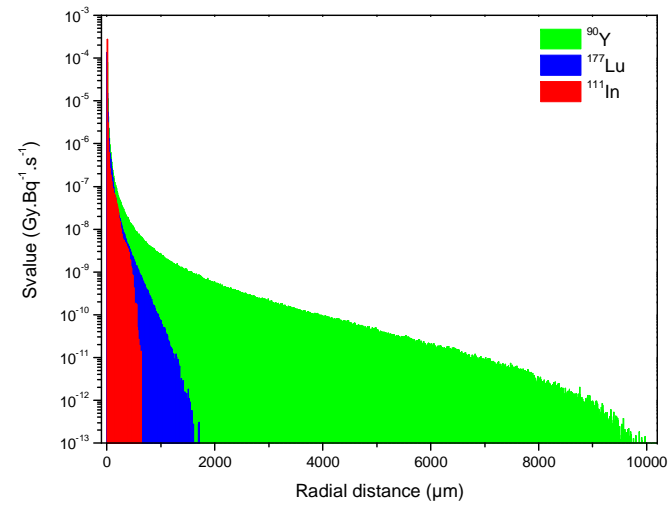
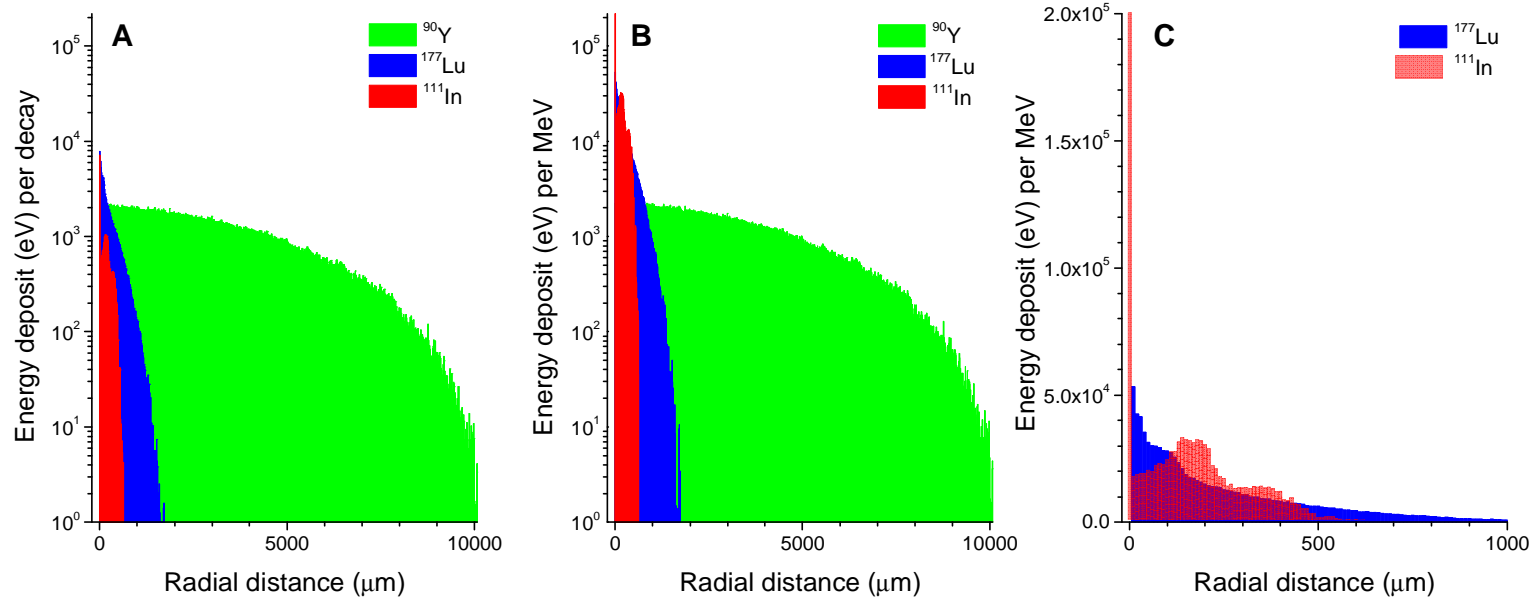


Figure-5



Article 7: Terbium-161 is a promising isotope for targeted radionuclide therapy: Assessment with the Monte Carlo code CELLDOSE. *Theranostics*. Soumis

Christophe Champion, Michèle A. Quinto, **Clément Morgat**, Paolo Zanotti-Frégonara, Elif Hindié.

# **Terbium-161 is a Promising Isotope for Targeted Radionuclide Therapy: Assessment with the Monte Carlo Code CELLDOSE**

Christophe Champion<sup>1</sup>, Michele A. Quinto<sup>1</sup>, Clément Morgat<sup>2</sup>, Paolo Zanotti-Fregonara<sup>2</sup>,  
Elif Hindié<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Université de Bordeaux, CNRS/IN2P3, Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan (CENBG),  
FRANCE

<sup>2</sup>Service de Médecine Nucléaire - CHU de Bordeaux ; UMR 5287 ; LabEx TRAIL ; Université de Bordeaux,  
FRANCE.

## **Corresponding authors:**

- Pr Christophe Champion

Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan

Chemin du Solarium, BP 120, 33175 Gradignan

Tel.: +33 557120896; Fax: +33 557120801

e-mail: [champion@cenbg.in2p3.fr](mailto:champion@cenbg.in2p3.fr)

- Pr Elif Hindié, MD, PhD

Service de Médecine Nucléaire, Hôpital Haut-Lévêque,

CHU de Bordeaux, 33604 Pessac, France.

Tel: +(33)557656838; Fax: +(33)557656839

e-mail: [elif.hindie@chu-bordeaux.fr](mailto:elif.hindie@chu-bordeaux.fr)

**Financial support:** This work was funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale under contract PhysiCancer “MICRONAUTE project” and by the French Investment for the Future program within LabEx TRAIL “Translational and Advanced Imaging Laboratory”.

**Running foot line: Dose deposits from  $^{161}\text{Tb}$  in micrometastases**

## **ABSTRACT**

**PURPOSE:** The importance of targeted radionuclide therapy is steadily increasing, and its prospective uses now include minimal residual disease. Besides lutetium-177, three other medium-energy  $\beta^-$  emitters, copper-67, scandium-47 and terbium-161, are promising candidates for arming novel radiopharmaceuticals. The aim of this study was to compare the effectiveness of these isotopes at irradiating small tumor volumes.

**METHODS:** Electron dose from uniform isotope distributions was assessed with the Monte Carlo code CELLDOSE in spheres of various sizes (from 10mm down to 10 $\mu$ m). All electron emissions, including  $\beta^-$  spectra, Auger and conversion electrons were included. As  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{47}\text{Sc}$  and  $^{161}\text{Tb}$  differ in electron energy per decay, doses were compared assuming 1 MeV released per  $\mu\text{m}^3$ , which would result in 160 Gy if totally absorbed.

**RESULTS:** In a 10-mm sphere, the four isotopes yielded similar dose deposits per  $\text{MeV}/\mu\text{m}^3$  (152-157 Gy). Dose deposits declined along with sphere size, underscoring the difficulty of irradiating micrometastases.  $^{161}\text{Tb}$ , however, delivered a higher dose compared to the other isotopes. For instance, in a 100- $\mu\text{m}$  metastasis, dose deposits were 24.5 Gy with  $^{177}\text{Lu}$ , 24.1 Gy with  $^{67}\text{Cu}$ , 14.8 Gy with  $^{47}\text{Sc}$  and 44.5 Gy with  $^{161}\text{Tb}$ . Auger and conversion electrons accounted for 71% of  $^{161}\text{Tb}$  dose. The difference between isotopes further increased when considering spheres of cell-size dimensions.

**CONCLUSION:** Terbium-161 can effectively target micrometastases and single tumor cells thanks to its decay spectrum that combines medium-energy  $\beta^-$  emission and low-energy conversion and Auger electrons. These results are in agreement with some recent studies on cell cultures and tumor xenografts.

**Key words:** Dose, radionuclide therapy, lutetium-177, terbium-161, copper-67, scandium-47



## INTRODUCTION

Targeted radionuclide therapy relies on the administration of radiolabeled compounds to irradiate tumors (1). A well-known example is iodine-131, which is commonly used to treat thyroid cancer metastases and to prevent cancer recurrence after thyroidectomy (2,3). Several other tumor-targeting radiopharmaceuticals have successfully entered into clinical practice, such as  $^{131}\text{I}$ -MIBG for neural crest tumors, anti-CD20 antibodies (e.g.  $^{131}\text{I}$ -tositumomab and  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomab tiuxetan) for lymphoma (4) and the somatostatin analogs  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC and  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE for neuroendocrine tumors (5). New clinical applications and trials include earlier treatment of patients with metastases and adjuvant therapy or consolidation after remission (6). In clinical practice, targeted radionuclide therapy offers better results in patients with small metastases (5, 7, 8). Experimental data also show that the therapeutic efficacy is higher for microscopic tumors than for larger ones (9, 10). Indeed, large metastases, which often include areas of stromal, fibrous or necrotic tissues, or loss of target expression, would be irradiated less uniformly and thus less effectively. Moreover, interstitial pressure in large tumors hinders the delivery of some radiopharmaceuticals, and hypoxia increases resistance to radiation.

Lutetium-177 has been used to label a wide array of novel molecules which are under development or already in clinical trials. Indeed,  $^{177}\text{Lu}$  can be stably chelated to various peptides and antibodies and has many favorable characteristics compared to both  $^{90}\text{Y}$  and  $^{131}\text{I}$ . Compared to yttrium-90,  $^{177}\text{Lu}$  emits a small percentage of photons which can be used for post-therapy imaging. Its medium-energy  $\beta^-$  emission causes fewer side-effects (11), and should allow for better irradiation of minimal residual disease or occult micrometastases (12-16), which are the main reason for relapse (17-19). On the other hand,  $^{131}\text{I}$ -labeling carries the risk of dehalogenation, which is associated with reduced targeting efficiency and the need for thyroid protection. Also, due to the large percentage of gamma photons emitted,  $^{131}\text{I}$  treatment delivers a high body radiation dose and in most countries requires hospitalization.

Three other promising medium-energy  $\beta^-$  emitters are: copper-67, scandium-47 and terbium-161 (20-25). All three have suitable half-lives (Table-1) and are amenable to imaging thanks to some gamma photons emission. Importantly, for all three the availability of a corresponding  $\beta^+$  or  $\gamma$ -emitting isotope allows for PET or SPECT pre-therapy imaging and dosimetry. Indeed, the isotopes  $^{64}\text{Cu}$  ( $T_{1/2} = 12.7\text{h}$ ;  $\beta^+$  emitter),  $^{44}\text{Sc}$  ( $T_{1/2} = 3.97\text{h}$ ;  $\beta^+$  emitter),  $^{152}\text{Tb}$  ( $T_{1/2} = 17.5\text{h}$ ;  $\beta^+$  emitter) and  $^{155}\text{Tb}$  ( $T_{1/2} = 5.32\text{d}$ ;  $\gamma$ -emitter) are suitable for imaging at later time points than would be possible with  $^{68}\text{Ga}$ , whose half-life is only 68 minutes (26-28). In addition, these relatively long half-lives would enable delivery of radiopharmaceuticals at distance from the production site.

A specific advantage of  $^{161}\text{Tb}$  over the other isotopes is that, in addition to  $\beta^-$  emission, its decay spectrum is rich in low energy Auger and conversion electrons (13, 25). Indeed, studies with tumor xenografts or cell cultures suggested that  $^{161}\text{Tb}$  might be more effective than  $^{177}\text{Lu}$  (29, 30).

The aim of this study was to assess dose deposits and compare the effectiveness of  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{47}\text{Sc}$  and  $^{161}\text{Tb}$  at irradiating micrometastases. Dose calculations were performed with the Monte Carlo code CELLDOSE.

## METHODS

Decay characteristics of  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{47}\text{Sc}$  and  $^{161}\text{Tb}$  are provided in Table-1. For assessment of electron dose deposit, the full data on electron emissions were obtained from ICRP-07 (31).  $\beta$ -spectra are contained in the *ICRP-07.Bet* file and conversion electrons (CE) and Auger electrons (including Coster-Kronig electrons) in the *ICRP-07.Rad* file (31). Photons were neglected. Figure-1 shows electron emissions used for Monte Carlo simulation.

CELLDOSE is based on electron-water molecule interaction cross sections and takes into account all ionization, excitation and elastic scattering processes in order to produce an event-by-event electron track simulation (32). The slowing-down histories for primary and secondary electrons are described until the energy value of 7.4 eV (which is the electron excitation threshold of the water molecule) (33). Below this cut-off, residual energy was considered to be absorbed locally. As compared to analytic methods, Monte Carlo codes can provide a 3D cartography of microscopic distribution of the dose in tissues and cells and can be adapted to complex geometries (34).

S-values for  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{47}\text{Sc}$  or  $^{161}\text{Tb}$ , and the percentage of electron energy that is retained, were assessed in spheres whose diameters ranged from 10mm to 10 $\mu\text{m}$ . These spheres represented micrometastases of various sizes, down to single tumor cells. (*S-values for very small spheres, down to 0.1 $\mu\text{m}$ , are also provided but will not be discussed further*). We assessed the relative contribution of the different electron emissions ( $\beta^-$  particles, CE, Auger electrons) to the total energy retained in each sphere, as previously described with  $^{131}\text{I}$ (32).

In addition to the dose from a single decay in spheres of various sizes (S-values), we also calculated the doses resulting from a uniform concentration of events (1 decay per  $\mu\text{m}^3$ ). Moreover, because  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{47}\text{Sc}$  and  $^{161}\text{Tb}$  differ in the total amount of electron energy emitted per decay, the doses were compared after normalization over a fixed amount of electron energy released per unit of volume (1 MeV per  $\mu\text{m}^3$ ). If totally absorbed, this “electron concentration” would yield 160 Gy.

Finally, we examined the spatial profile of energy deposit around a point source of  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{47}\text{Sc}$  or  $^{161}\text{Tb}$ . Energy deposit (eV per decay) was studied within 10- $\mu\text{m}$  thick shells concentric to the point source.

## RESULTS

### *S values for $^{90}\text{Y}$ , $^{177}\text{Lu}$ and $^{111}\text{In}$ in spheres of various sizes*

Table-2 reports the S-values (mean dose per decay) from uniform radionuclide distribution in spheres of water density. For  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$  and  $^{47}\text{Sc}$ , there was rather good agreement with data reported by Bardiès(35), differences being <10% for spheres  $\geq 20\mu\text{m}$ . Bardiès and colleagues did not report on S-values for spheres  $<20\mu\text{m}$ (35). Terbium-161 was not assessed in their work.

### *Energy retained in the spheres and contribution of the different electron emissions.*

Table-3 reports the absolute amount of energy retained and the relative contribution of  $\beta^-$  particles, CE and Auger electrons (including Coster-Kronig electrons). Contribution from CE and Auger electrons was much higher for  $^{161}\text{Tb}$ . CE and Auger electrons account for 24.9% of the total dose in the 10mm sphere and for as much as 88.3% in the 10- $\mu\text{m}$  “single-cell” (Table-3).

### *Electron dose deposits after normalization.*

For each isotope and each sphere, Table-4 reports the dose for 1 decay occurring per  $\mu\text{m}^3$  and the dose for 1 MeV released per  $\mu\text{m}^3$  (i.e. normalization for differences in electron energy per decay).

When 1 MeV per  $\mu\text{m}^3$  is released, the absorbed dose in a 10-mm metastasis was similar among the four isotopes and ranging between 152 and 157 Gy (Table-4). In a 1-mm metastasis, the dose was 104Gy with  $^{177}\text{Lu}$ , 107Gy with  $^{67}\text{Cu}$ , 89.6Gy with  $^{47}\text{Sc}$  and 108Gy with  $^{161}\text{Tb}$ . In spheres of smaller size, the dose reduction was more abrupt for  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$  and  $^{47}\text{Sc}$  than for  $^{161}\text{Tb}$ (Table-4 and Fig-2). For example, in a 100- $\mu\text{m}$  micrometastasis, the doses delivered by  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$  and  $^{47}\text{Sc}$  were 24.5Gy, 24.1Gy and 14.8Gy, respectively, as

compared to 44.5Gy with  $^{161}\text{Tb}$  (Table-4). The differences between isotopes further increased in cell-sized spheres. For instance, in a homogeneously labeled single cell of  $10\mu\text{m}$  diameter, the doses delivered by  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{47}\text{Sc}$  and  $^{161}\text{Tb}$  were 3.92Gy, 3.42Gy, 1.74Gy and 14.1Gy, respectively (Table-4 and Fig-2).

When  $^{177}\text{Lu}$  was taken as reference for comparisons,  $^{67}\text{Cu}$  showed slightly lower efficacy than  $^{177}\text{Lu}$  and only for the smallest spheres ( $\leq 50\mu\text{m}$ ) while  $^{47}\text{Sc}$  showed quite lower efficacy than  $^{177}\text{Lu}$  for micrometastases  $< 1000\mu\text{m}$ . At the opposite,  $^{161}\text{Tb}$  was superior to  $^{177}\text{Lu}$ . Efficacy ratio ( $^{161}\text{Tb}/^{177}\text{Lu}$ ) was 1.04 for a 1mm metastasis but reached 1.82 for a  $100\mu\text{m}$  micrometastasis and 3.6 for a  $10\mu\text{m}$  single cell (Table-4).

#### *Electron energy deposit around a point source*

The four isotopes showed a similar global energy deposit distribution around a point source: the distance within which 90% of the emitted energy is deposited (R90) was 0.62mm for  $^{177}\text{Lu}$ , 0.57mm for  $^{67}\text{Cu}$ , 0.72mm for  $^{47}\text{Sc}$  and 0.63mm for  $^{161}\text{Tb}$ . Energy deposit dropped to zero at a distance comprised between 1.4mm for  $^{67}\text{Cu}$  and 2mm for  $^{47}\text{Sc}$ . However, despite the apparent overall similarity, the dose distribution of the four isotopes markedly differed in proximity of the source. In particular, the energy deposited by  $^{161}\text{Tb}$  (per MeV released) was quite higher than that deposited by the other three isotopes in the first  $10\mu\text{m}$ , but also up to  $30\mu\text{m}$  around the point source (Fig-3). This is explained by the presence in the  $^{161}\text{Tb}$  decay spectrum of low energy electrons (Fig-1), whose doses are deposited over relatively short distances (Fig-4). This high energy deposit, in the first  $10\mu\text{m}$  and up to  $30\mu\text{m}$  (Fig-3), suggests that  $^{161}\text{Tb}$  would deliver a dose higher than that of the other isotopes not only to the targeted cell but also to its immediate neighbors.

## **DISCUSSION**

In many cancers, the prognosis is linked to metastatic relapse, which may occur years after primary surgery (17-19). Many researchers think that targeted

radionuclide therapy has the potential to play a major role as a systemic therapy for occult micrometastases in high-risk patients (12, 14, 15). In particular, several studies suggest that radiopharmaceutical therapy can be very effective when administered at an early stage (9, 10), partly because small and structurally homogeneous metastases can be more effectively irradiated. On the other hand, the fraction of energy retained is lower in small tumors (Tables 2 to 4). For example, the high-energy  $\beta^-$  emitter  $^{90}\text{Y}$ , commonly used to treat patients with large tumor masses or refractory disease (4), is deemed to be ineffective at eradicating micrometastases (13). In this setting,  $^{177}\text{Lu}$  would be a better candidate than  $^{90}\text{Y}$  (12, 13, 16). The radiolanthanide  $^{161}\text{Tb}$ , whose medium-energy  $\beta^-$  is similar to that of  $^{177}\text{Lu}$ , but with a larger amount of conversion and Auger electrons, might be an even better choice (13, 24, 25).

To properly compare the effectiveness of the different isotopes, whose electron energies per decay differ, we assumed that 1 MeV was released per  $\mu\text{m}^3$ . If totally absorbed, this energy would always yield 160 Gy. Absorbed doses of this level were measured in large metastases (>2cm) of neuroendocrine tumors, which responded to  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE therapy (36). Smaller and less heterogeneous tumors, from micrometastases to single cells, should respond to lower doses.

Our simulations showed that the dose delivered to a 10-mm metastasis was similar for the four isotopes (151 to 153 Gy), and close to the dose that would result from total absorption. The doses decreased along with sphere size, and this underscored the fact that micrometastases are more difficult to irradiate. However,  $^{161}\text{Tb}$  showed better characteristics not only when compared to  $^{67}\text{Cu}$  and  $^{47}\text{Sc}$ , but also with regards to  $^{177}\text{Lu}$  itself (Table-4, Fig-2). The efficacy ratio ( $^{161}\text{Tb}/^{177}\text{Lu}$ ) was 1.04 for a 1-mm metastasis but reached 1.82 for a 100- $\mu\text{m}$  micrometastasis and 3.6 for a 10- $\mu\text{m}$  single cell (Table-4). This higher efficacy was mainly due to the large amount of Auger and conversion electrons of  $^{161}\text{Tb}$  which accounted for 71% of  $^{161}\text{Tb}$  dose to the 100- $\mu\text{m}$  metastasis and 88% of the dose to the 10- $\mu\text{m}$  cell (Table-3). Decay data from ICRP-07 show that, for each decay of  $^{161}\text{Tb}$ , one  $\beta^-$  particle is emitted together with an average of 1.42 CE and 10.96 Auger electrons. In comparison,  $^{177}\text{Lu}$  gives one  $\beta^-$  particle and an average of 0.15 CE and 1.12 Auger electrons (31). Not only  $^{161}\text{Tb}$  is richer in Auger and CE emissions but, contrarily to  $^{177}\text{Lu}$ , the energy

of the majority of  $^{161}\text{Tb}$  conversion electrons is less than 50keV (Fig-1). Figure-4 shows that, for these electrons, the doses are deposited over relatively short distances.

Differences in released energy and half-life (physical and effective) are important factors to take into account when planning in vivo studies. The total electron energy per  $^{161}\text{Tb}$  decay (202.5 keV) is 37% higher than that of  $^{177}\text{Lu}$  (147.9 keV), whereas the half-lives are similar (Table-1). In mice, the maximum tolerated dose (MTD) of a  $^{161}\text{Tb}$ -labeled antibody was 10MBq vs. 12MBq for  $^{177}\text{Lu}$  (29). Recent in vivo findings on tumor-control efficacy echo those we obtained with our Monte Carlo simulations. At an injected activity of 50% MTD (5MBq  $^{161}\text{Tb}$  or 6 MBq  $^{177}\text{Lu}$ ), Grünberg and colleagues reported higher tumor growth inhibition of subcutaneous xenografts of ovarian cancer using a  $^{161}\text{Tb}$ -labeled anti-L1CAM antibody as compared to the same antibody labeled with  $^{177}\text{Lu}$  (29). Again, in a cell culture study, performed to assess the half-maximal inhibition of tumor cell viability of KB cells (human cervical carcinoma) with radiolabeled folate conjugates, the radioactivity concentration required was 4.5 fold lower with the  $^{161}\text{Tb}$ -labeled conjugate as compared to the  $^{177}\text{Lu}$ -labeled conjugate (30). When the differences in electron energy released are taken into account, these results agree with the higher efficacy of  $^{161}\text{Tb}$  we measured in cell-sized spheres ( $\times 3$  for a 20- $\mu\text{m}$  cell and  $\times 3.6$  for a 10- $\mu\text{m}$  cell) (Table-4). Surprisingly, the efficacy of the  $^{161}\text{Tb}$  conjugate was less pronounced ( $\times 1.7$ ) in the IGROV-1 cell line (human ovarian carcinoma) (30). The reasons of this finding are unknown, but may be partly due to a lower internalization rate of the folate conjugate in the IGROV-1 cells (30).

In order to assess the relative merits of labeling with  $^{161}\text{Tb}$ , compared to the other isotopes for clinical applications, the biodistribution of the radiopharmaceutical is of paramount importance. The cellular and subcellular localization of the isotopes can be imaged and quantified with techniques such as autoradiography or secondary ion mass microscopy (37). This distribution may be used as input to derive the dose to tumor cells (34). The energy deposited by  $^{161}\text{Tb}$  (per MeV released) is quite higher than that deposited by  $^{177}\text{Lu}$  in the first 10 $\mu\text{m}$  around a point source and also up to 30 $\mu\text{m}$  (Fig-3). Thus,  $^{161}\text{Tb}$  would likely deliver a higher dose than  $^{177}\text{Lu}$ , not only to the targeted cell, but also to its immediate neighbors. Moreover, the short tracks of energy deposit of Auger electrons and some low energy conversion electrons (Fig-4) suggest that a putative  $^{161}\text{Tb}$ -labeled

radiopharmaceutical would be more effective if transported into the cell and internalized in the nucleus (38). On the other hand, DNA might not be the only important target. The impact of Auger electrons on other targets such as the cell membrane has also been emphasized (39). Our future work will focus on differences in dose distribution between  $^{161}\text{Tb}$  and  $^{177}\text{Lu}$  for various cellular distributions of the radiopharmaceutical.  $^{161}\text{Tb}$  will also be compared to other Auger emitters, such as  $^{111}\text{In}$ ,  $^{119}\text{Sb}$ ,  $^{125}\text{I}$  or alpha-emitters to specifically target micrometastases and single-cells.

The half-life and the chemical properties are also important points to consider for choosing the most appropriate isotope. Both  $^{177}\text{Lu}$  and  $^{161}\text{Tb}$  have suitable half-lives (6.65d and 6.91d, respectively) for labeling antibodies and peptides. These two radiolanthanides share also similar chemical properties. By contrast,  $^{67}\text{Cu}$  and  $^{47}\text{Sc}$  have shorter half-lives (respectively 2.58d and 3.35d). This might be a desirable characteristic for those radiopharmaceuticals that exhibit a more rapid washout from tumor tissues.

The fraction of energy emitted as photons is small for  $^{177}\text{Lu}$  (~19%) and for  $^{161}\text{Tb}$  (~15%) (Table-1). Photons from  $^{177}\text{Lu}$  (208.4 keV: 11% and 112.9 keV: 6.4%) are well suited to post-therapy imaging. The 74.6-keV photons emitted by  $^{161}\text{Tb}$  (intensity 10.2%) are still amenable to imaging (in fact, their energy is similar to that of the photons emitted by the myocardial imaging agent  $^{201}\text{Tl}$ ). The higher proportion of photon emission with  $^{67}\text{Cu}$  and  $^{47}\text{Sc}$  (~40%) is however a drawback, because these photons do not contribute significantly to tumor irradiation, increase total body dose and, might require hospitalization for radioprotection purposes.

Finally, logistic issue may drive the choice of the isotope. Producing  $^{67}\text{Cu}$  as no-carrier added in amounts suitable for large clinical use has proved difficult (20, 21). The optimal technique to produce  $^{47}\text{Sc}$  is still debated (23). By contrast, producing large amounts of  $^{161}\text{Tb}$  and  $^{177}\text{Lu}$  is technically feasible.  $^{161}\text{Tb}$  can be produced as no carrier added, using for example a gadolinium-160 target ( $^{160}\text{Gd}(n,\gamma)^{161}\text{Tb}$ ), and with good radionuclide purity ( $^{160}\text{Tb}$  to  $^{161}\text{Tb}$  activity ratio <0.0001) (25). The cost for large-scale production is estimated to be comparable to that of no carrier added  $^{177}\text{Lu}$  (25).

## CONCLUSION



Radiopharmaceutical therapy can effectively target disseminated tumor cells and occult micrometastases, provided that the optimal isotope is used. Our data suggest that  $^{161}\text{Tb}$  might be a better choice than  $^{177}\text{Lu}$ . The promising characteristics of this isotope warrant its use in clinical trials.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Pr. Keith Eckerman for helpful discussions regarding the ICRP-107 data files.

## References

1. Volkert WA, Hoffman TJ. [Therapeutic radiopharmaceuticals](#). *Chem Rev.* 1999;99(9):2269-92.
2. Seidlin SM, Marinelli LD, Oshry E. [Radioactive iodine therapy; effect on functioning metastases of adenocarcinoma of the thyroid](#). *J Am Med Assoc.* 1946;132(14):838-47.
3. Mazzaferri EL, Jhiang SM. [Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer](#). *Am J Med.* 1994;97(5):418-28.
4. Witzig TE, Gordon LI, Cabanillas F, et al. [Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma](#). *J Clin Oncol.* 2002;20(10):2453-63.
5. Kwekkeboom DJ, de Herder WW, Kam BL, et al. [Treatment with the radiolabeled somatostatin analog \[<sup>177</sup>Lu-DOTA 0,Tyr3\]octreotate: toxicity, efficacy, and survival](#). *J Clin Oncol.* 2008;26(13):2124-30.
6. Morschhauser F, Radford J, Van Hoof A, 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.* 2008;26(32):5156-64.
7. Hindié E, Zanotti-Fregonara P, Keller I, et al. [Bone metastases of differentiated thyroid cancer: impact of early <sup>131</sup>I-based detection on outcome](#). *Endocr Relat Cancer.* 2007;14(3):799-807.
8. Hindié E, Mellièrè D, Lange F, et al. [Functioning pulmonary metastases of thyroid cancer: does radioiodine influence the prognosis?](#) *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2003;30(7):974-81.
9. Aarts F, Koppe MJ, Hendriks T, et al. [Timing of adjuvant radioimmunotherapy after cytoreductive surgery in experimental peritoneal carcinomatosis of colorectal origin](#). *Ann Surg Oncol.* 2007;14(2):533-40.
10. de Jong GM, Hendriks T, Eek A, et al. [Radioimmunotherapy improves survival of rats with microscopic liver metastases of colorectal origin](#). *Ann Surg Oncol.* 2009;16(7):2065-73.
11. Bodei L, Kidd M, Paganelli G, et al. [Long-term tolerability of PRRT in 807 patients with neuroendocrine tumours: the value and limitations of clinical factors](#). *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2015;42(1):5-19.
12. Michel RB, Andrews PM, Rosario AV, Goldenberg DM, Mattes MJ. [<sup>177</sup>Lu-antibody conjugates for single-cell kill of B-lymphoma cells in vitro and for therapy of micrometastases in vivo](#). *Nucl Med Biol.* 2005;32(3):269-78.
13. Uusijärvi H, Bernhardt P, Rösch F, Maecke HR, Forssell-Aronsson E. [Electron- and positron-emitting radiolanthanides for therapy: aspects of dosimetry and production](#). *J Nucl Med.* 2006;47(5):807-14.
14. Tolmachev V, Orlova A, Pehrson R, et al. [Radionuclide therapy of HER2-positive microxenografts using a <sup>177</sup>Lu-labeled HER2-specific Affibody molecule](#). *Cancer Res.* 2007 Mar 15;67(6):2773-82.
15. Persson M, Juhl K, Rasmussen P, et al. [uPAR targeted radionuclide therapy with \(<sup>177</sup>Lu-DOTA-AE105 inhibits dissemination of metastatic prostate cancer](#). *Mol Pharm.* 2014;11(8):2796-806.
16. Champion C, Zanotti-Fregonara P, Quinto MA, Morgat C, Hindié E. Comparative efficacy of <sup>90</sup>Y, <sup>177</sup>Lu and <sup>111</sup>In for the irradiation of tumor cells and micrometastases: a Monte Carlo study using CELLDOSE.

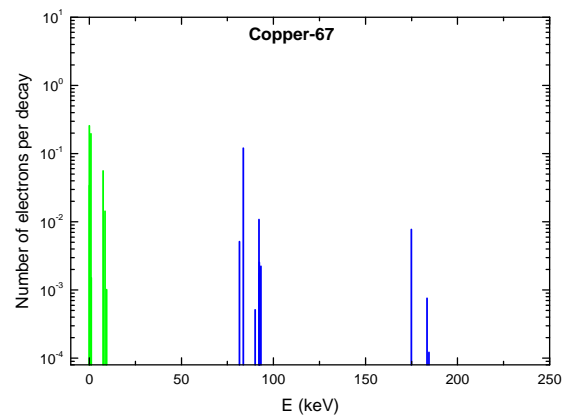
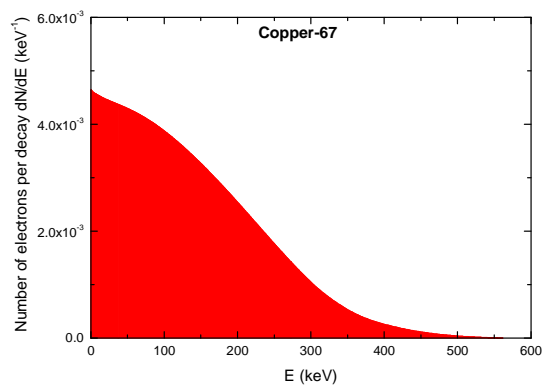
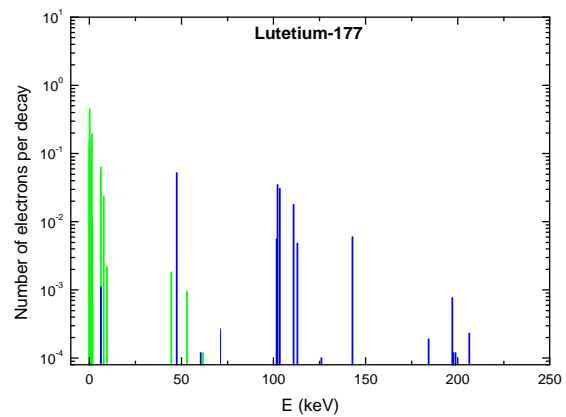
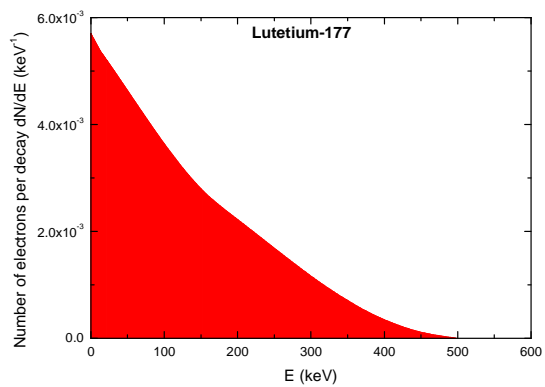
Oral presentation at the Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine; October 18 - 22, 2014; Gothenburg, Sweden. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;41:S181.

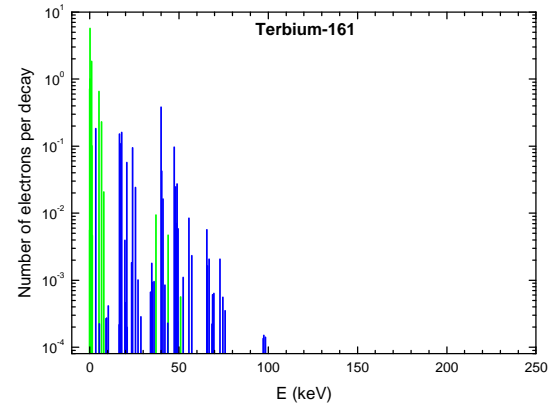
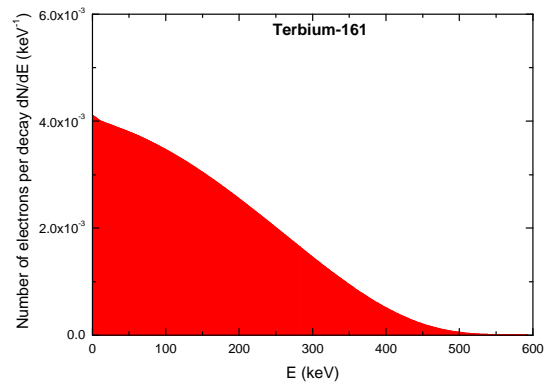
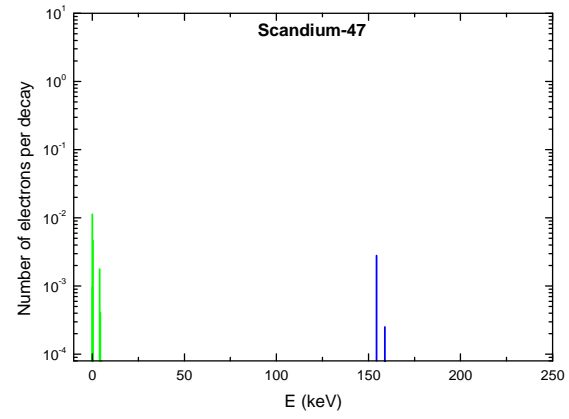
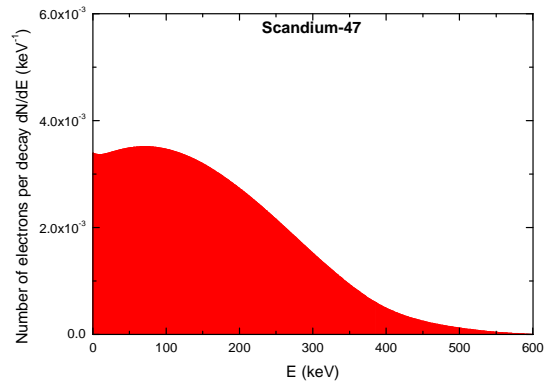
17. Pantel K, Alix-Panabières C, Riethdorf S. [Cancer micrometastases](#). *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6(6):339-51.
18. Braun S, Pantel K, Müller P, et al. [Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer](#). *N Engl J Med*. 2000;342(8):525-33.
19. Bork U, Rahbari NN, Schölch S, et al. [Circulating tumour cells and outcome in non-metastatic colorectal cancer: a prospective study](#). *Br J Cancer*. 2015;112(8):1306-13.
20. DeNardo GL, Kukis DL, Shen S, DeNardo DA, Meares CF, DeNardo SJ. [67Cu-versus 131I-labeled Lym-1 antibody: comparative pharmacokinetics and dosimetry in patients with non-Hodgkin's lymphoma](#). *Clin Cancer Res*. 1999;5(3):533-41.
21. Knogler K, Grünberg J, Zimmermann K, et al. [Copper-67 radioimmunotherapy and growth inhibition by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibodies in a therapy model of ovarian cancer metastasis](#). *Clin Cancer Res*. 2007;13(2 Pt 1):603-11.
22. Kolsky KL, Joshi V, Mausner LF, Srivastava SC. [Radiochemical purification of no-carrier-added scandium-47 for radioimmunotherapy](#). *Appl Radiat Isot*. 1998 Dec;49(12):1541-9.
23. Müller C, Bunka M, Haller S, et al. [Promising prospects for 44Sc-/47Sc-based theragnostics: application of 47Sc for radionuclide tumor therapy in mice](#). *J Nucl Med*. 2014;55(10):1658-64.
24. de Jong M, Breeman WA, Bernard BF, et al. [Evaluation in vitro and in rats of 161Tb-DTPA-octreotide, a somatostatin analogue with potential for intraoperative scanning and radiotherapy](#). *Eur J Nucl Med*. 1995;22(7):608-16.
25. Lehenberger S, Barkhausen C, Cohrs S, et al. [The low-energy  \$\beta^-\$  and electron emitter \(161\)Tb as an alternative to \(177\)Lu for targeted radionuclide therapy](#). *Nucl Med Biol*. 2011;38(6):917-24.
26. Pfeifer A, Knigge U, Binderup T, et al. [64Cu-DOTATATE PET for Neuroendocrine Tumors: A Prospective Head-to-Head Comparison with 111In-DTPA-Octreotide in 112 Patients](#). *J Nucl Med*. 2015 Jun;56(6):847-54.
27. Hernandez R, Valdovinos HF, Yang Y, et al. [\(44\)Sc: an attractive isotope for peptide-based PET imaging](#). *Mol Pharm*. 2014;11(8):2954-61.
28. Müller C, Zhernosekov K, Köster U, et al. [A unique matched quadruplet of terbium radioisotopes for PET and SPECT and for  \$\alpha\$ - and  \$\beta\$ - radionuclide therapy: an in vivo proof-of-concept study with a new receptor-targeted folate derivative](#). *J Nucl Med*. 2012;53(12):1951-9.
29. Grünberg J, Lindenblatt D, Dorrer H, et al. [Anti-L1CAM radioimmunotherapy is more effective with the radiolanthanide terbium-161 compared to lutetium-177 in an ovarian cancer model](#). *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;41(10):1907-15.
30. Müller C, Reber J, Haller S, et al. [Direct in vitro and in vivo comparison of \(161\)Tb and \(177\)Lu using a tumour-targeting folate conjugate](#). *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;41(3):476-85.
31. Eckerman K, Endo A. ICRP Publication 107. Nuclear decay data for dosimetric calculations. *Ann ICRP* 2008;38:7-96.

32. Champion C, Zanotti-Fregonara P, Hindié E. [CELLDOSE: a Monte Carlo code to assess electron dose distribution--S values for  \$^{131}\text{I}\$  in spheres of various sizes.](#) *J Nucl Med.* 2008;49(1):151-7.
33. Champion C. [Theoretical cross sections for electron collisions in water: structure of electron tracks.](#) *Phys Med Biol.* 2003;48(14):2147-68.
34. Hindié E, Champion C, Zanotti-Fregonara P, et al. [Calculation of electron dose to target cells in a complex environment by Monte Carlo code "CELLDOSE".](#) *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2009;36(1):130-6.
35. Bardiès M, Chatal JF. [Absorbed doses for internal radiotherapy from 22 beta-emitting radionuclides: beta dosimetry of small spheres.](#) *PhysMedBiol.* 1994;39(6):961-81.
36. Ilan E, Sandström M, Wassberg C, et al. [Dose response of pancreatic neuroendocrine tumors treated with peptide receptor radionuclide therapy using  \$^{177}\text{Lu}\$ -DOTATATE.](#) *J Nucl Med.* 2015;56(2):177-82.
37. Chéhadé F, de Labriolle-Vaylet C, Moins N, et al. [Secondary ion mass spectrometry as a tool for investigating radiopharmaceutical distribution at the cellular level: the example of I-BZA and  \$\(^{14}\text{C}\)\$ -I-BZA.](#) *J Nucl Med.* 2005;46(10):1701-6.
38. Kassis AI. [The amazing world of auger electrons.](#) *Int J Radiat Biol.* 2004;80(11-12):789-803.
39. Pouget JP, Santoro L, Raymond L, et al. [Cell membrane is a more sensitive target than cytoplasm to dense ionization produced by auger electrons.](#) *Radiat Res.* 2008;170(2):192-200.

## Figure Legends

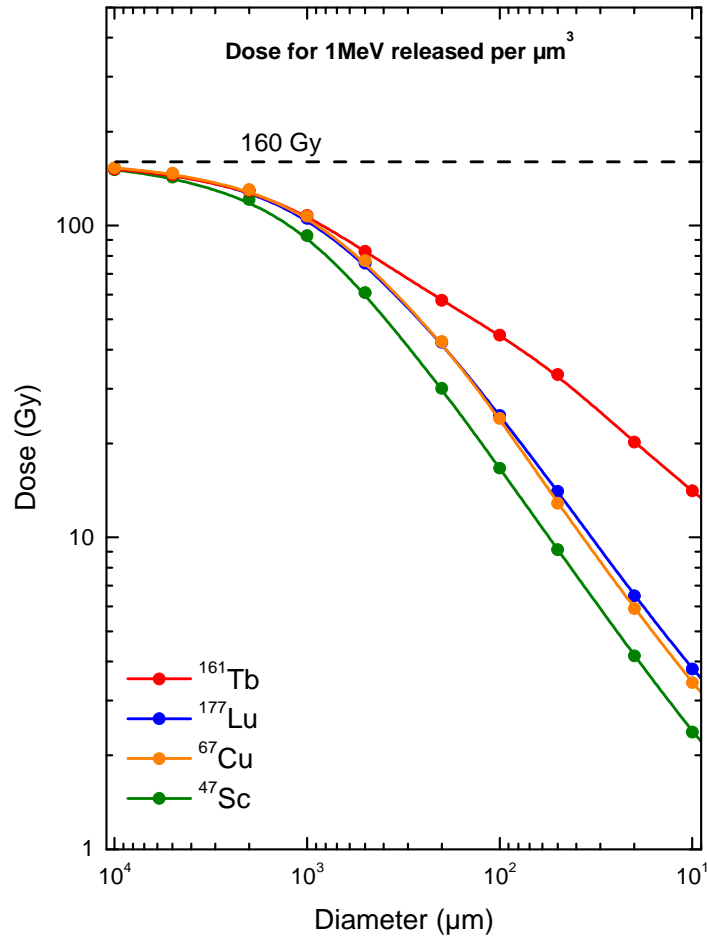
### Figure-1





**Figure-1:** Electron emissions of  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{47}\text{Sc}$  and  $^{161}\text{Tb}$ . B-spectra are in red (integral of the curve = 1), conversions electrons (CE) are in blue and Auger electrons (including Coster-Kronig electrons) in green. Conversion and Auger electrons whose probability was  $<0.0001$  (31) were neglected and are not represented.

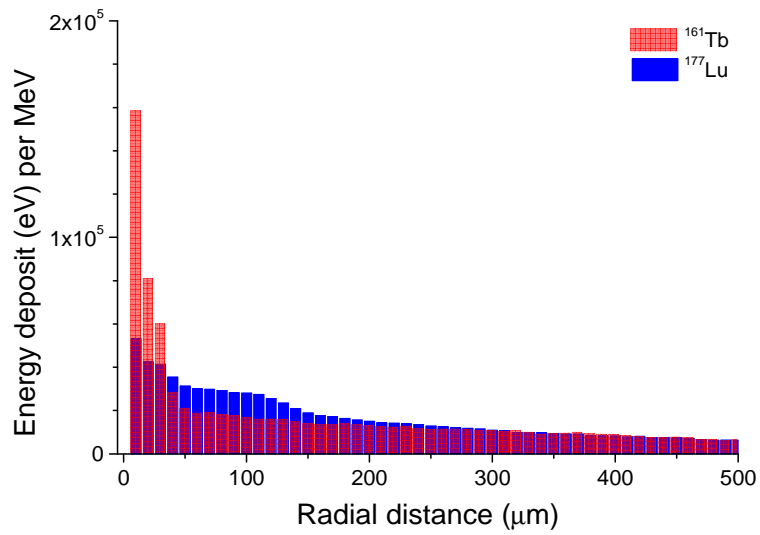
Figure-2



**Figure-2:** Electron dose delivered by <sup>177</sup>Lu, <sup>67</sup>Cu, <sup>47</sup>Sc or <sup>161</sup>Tb (considering 1 MeV released per  $\mu\text{m}^3$ ) as a function of sphere size. The maximal value of 160 Gy/MeV/ $\mu\text{m}^3$  corresponds to total absorption.

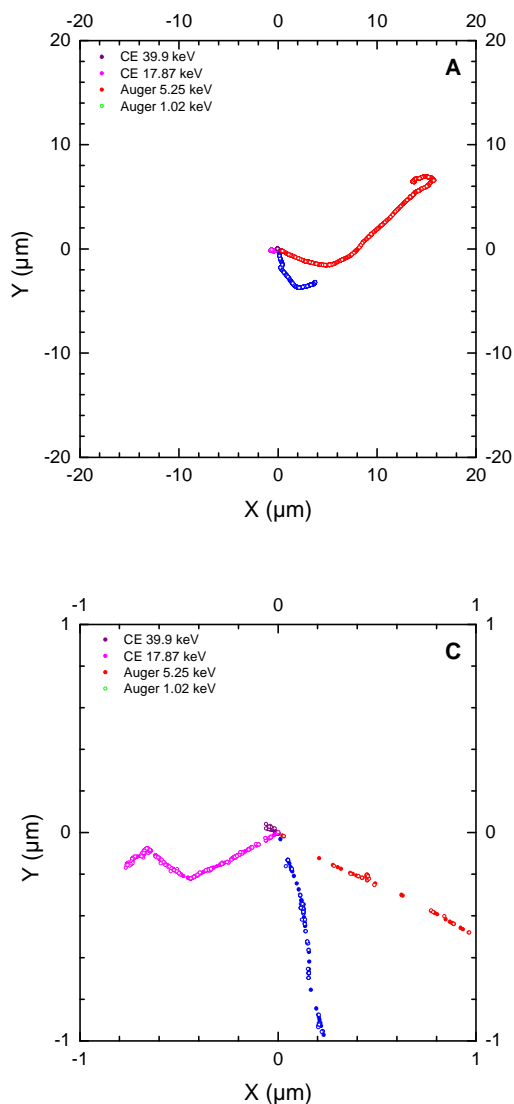


**Figure-3**



**Figure-3:** Patterns of energy deposit (eV per MeV released) of  $^{177}\text{Lu}$  and  $^{161}\text{Tb}$  over the first 500 μm around a point source.

**Figure-4**



**Figure-4:** Two-dimensional plots of the tracks of two representative conversion electrons and two representative Auger electrons from  $^{161}\text{Tb}$  as simulated with CELLDOSE. Fig-4A reproduces the full path of the two CE (39.9keV and 17.87keV). Fig-4B is a magnification of the paths of Auger electrons (5.25keV, 1.02keV). The solid and open circles represent the ionizing interactions induced by the primary and the secondary electrons, respectively.

**Table-1: Isotope characteristics (see also figure-1 for electron emission spectra)**

Nuclide	<sup>177</sup> Lu	<sup>67</sup> Cu	<sup>47</sup> Sc	<sup>161</sup> Tb
Half-life (day)	6.647	2.576	3.349	6.906
Type of Decay (%)	β <sup>-</sup> (100 %)	β <sup>-</sup> (100 %)	β <sup>-</sup> (100 %)	β <sup>-</sup> (100 %)
βparticles mean energy (keV)	133.3	135.9	161.9	154.3
Daughter	177-Hafnium (stable)	67-Zinc (stable)	47-Titanium (stable)	161-Dysprosium (stable)
CE emission (total energy per decay in keV)	13.52	13.74	0.48	39.28
CE energy range (keV) *	6.16 - 206.27	81.64 – 184.49	154.4 – 158.9	3.33 – 98.33
Auger and Coster-Kronig electrons (total energy per decay in keV)	1.13	0.75	0.01	8.94
Auger and Coster-Kronig electrons energy range (keV) *	0.0107 – 61.69	0.057 – 9.43	0.027 – 4.84	0.018 – 50.89
Total electron energy per decay (average in keV)	147.9	150.4	162.4	202.5
Electron energy neglected in Monte Carlo simulation (keV) *	0.09	0.05	0	0.07
γ radiation useful for imaging (Energy in keV and % abundance)	208.4 (11 %) 112.9 (6.4 %)	184.6 (49.6%) 91.3 (7.6%) & 93.3 (3%)	159.4 (68.3%)	74.6 (10.2%)
Photons X and γ (total energy per decay in keV)	35.1	114.9	108.9	36.35
Energy per decay in keV (photons + electrons)	183	265.3	271.3	238.9
Percentage of energy emitted as photons	19.18 %	43.31 %	40.1 %	15.2 %

\* Conversion and Auger electrons with probability <0.0001 were neglected (31).

**Table-2: S-values for <sup>177</sup>Lu, <sup>67</sup>Cu, <sup>47</sup>Sc and <sup>161</sup>Tb and fraction of energy retained in spheres of various sizes**

Diameter ( $\mu\text{m}$ )	S-values( $\text{Gy}\cdot\text{Bq}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )				Retained energy(%)			
	<sup>177</sup> Lu	<sup>67</sup> Cu	<sup>47</sup> Sc	<sup>161</sup> Tb	<sup>177</sup> Lu	<sup>67</sup> Cu	<sup>47</sup> Sc	<sup>161</sup> Tb
10000	$4.30 \times 10^{-11}$	$4.39 \times 10^{-11}$	$4.87 \times 10^{-11}$	$5.82 \times 10^{-11}$	95.0	95.6	98.3	94.7
5000	$3.29 \times 10^{-10}$	$3.37 \times 10^{-10}$	$3.69 \times 10^{-10}$	$4.47 \times 10^{-10}$	91.0	91.9	93.2	90.9
2000	$4.54 \times 10^{-9}$	$4.67 \times 10^{-9}$	$4.74 \times 10^{-9}$	$6.22 \times 10^{-9}$	80.2	81.5	76.5	80.9
1000	$2.94 \times 10^{-8}$	$3.07 \times 10^{-8}$	$2.77 \times 10^{-8}$	$4.14 \times 10^{-8}$	65.1	67.0	56.0	67.3
500	$1.69 \times 10^{-7}$	$1.77 \times 10^{-7}$	$1.40 \times 10^{-7}$	$2.54 \times 10^{-7}$	46.7	48.2	35.4	51.6
200	$1.48 \times 10^{-6}$	$1.52 \times 10^{-6}$	$1.05 \times 10^{-6}$	$2.76 \times 10^{-6}$	26.1	26.5	17.0	36.0
100	$6.93 \times 10^{-6}$	$6.89 \times 10^{-6}$	$4.58 \times 10^{-6}$	$1.71 \times 10^{-5}$	15.3	15.0	9.25	27.8
50	$3.18 \times 10^{-5}$	$2.95 \times 10^{-5}$	$1.95 \times 10^{-5}$	$1.02 \times 10^{-4}$	8.79	8.04	4.93	20.8
20	$2.33 \times 10^{-4}$	$2.12 \times 10^{-4}$	$1.30 \times 10^{-4}$	$9.70 \times 10^{-4}$	4.13	3.69	2.09	12.6
10	$1.11 \times 10^{-3}$	$9.80 \times 10^{-4}$	$5.38 \times 10^{-4}$	$5.41 \times 10^{-3}$	2.45	2.14	1.09	8.80
5	$5.54 \times 10^{-3}$	$4.70 \times 10^{-3}$	$2.22 \times 10^{-3}$	$3.02 \times 10^{-2}$	1.53	1.282	0.56	6.15
2	$4.92 \times 10^{-2}$	$3.76 \times 10^{-2}$	$1.43 \times 10^{-2}$	$3.22 \times 10^{-1}$	0.87	0.65	0.23	4.19
1	$2.54 \times 10^{-1}$	$1.74 \times 10^{-1}$	$1.13 \times 10^{-1}$	1.89	0.56	0.38	0.23	3.08
0.5	1.39	$8.98 \times 10^{-1}$	$2.37 \times 10^{-1}$	10.9	0.38	0.25	0.06	2.22
0.2	14.3	8.93	1.50	123	0.25	0.16	0.02	1.60
0.1	78.0	50.6	6.08	765	0.17	0.11	0.01	1.24

**Table-3: Retained energy and contribution of the different electronic emissions**

Sphere diameter ( $\mu\text{m}$ )	Retained energy (keV per decay)				Contribution of the different electronic emissions											
					$^{177}\text{Lu}$			$^{67}\text{Cu}$			$^{47}\text{Sc}$			$^{161}\text{Tb}$		
	$^{177}\text{Lu}$	$^{67}\text{Cu}$	$^{47}\text{Sc}$	$^{161}\text{Tb}$	$\beta^-$ (%)	CE (%)	Auger (%)	$\beta^-$ (%)	CE (%)	Auger (%)	$\beta^-$ (%)	CE (%)	Auger (%)	$\beta^-$ (%)	CE (%)	Auger (%)
10000	140	143	159	190	90.0	9.2	0.8	90.2	9.3	0.5	99.7	0.29	0.01	75.1	20.2	4.7
5000	135	138	151	183	89.7	9.5	0.8	89.9	9.5	0.6	99.7	0.29	0.01	74.1	21.0	4.9
2000	119	122	124	163	88.7	10.4	0.9	89.0	10.4	0.6	99.7	0.29	0.01	71.0	23.5	5.5
1000	96.3	100	90.7	135	86.9	12.0	1.1	87.2	12.1	0.7	99.7	0.29	0.01	65.5	27.9	6.6
500	69.2	72.3	57.4	104	83.8	14.6	1.6	84.1	14.9	1.0	99.6	0.35	0.05	55.9	35.5	8.6
200	38.6	39.8	27.5	72.3	80.1	17.1	2.8	79.3	18.9	1.8	99.7	0.24	0.06	40.1	47.7	12.2
100	22.6	22.5	15.0	55.9	79.4	15.9	4.7	79.4	17.3	3.3	99.7	0.19	0.11	29.3	55.1	15.6
50	13.0	12.1	7.99	41.8	77.5	14.7	7.8	81.2	12.8	6.0	99.7	0.17	0.13	21.4	58.1	20.5
20	6.11	5.54	3.39	25.4	73.7	10.5	15.8	77.3	10.0	12.7	99.5	0.16	0.34	15.3	52.3	32.4
10	3.62	3.21	1.76	17.7	66.1	8.2	25.7	70.7	8.3	21.0	99.2	0.15	0.65	11.7	43.4	44.9

**Table-4: Comparison of electron dose deposit assuming homogeneous isotope distribution**

Sphere diameter ( $\mu\text{m}$ )	Dose for 1 decay per $\mu\text{m}^3$ (Gy)				Dose for 1 MeV released per $\mu\text{m}^3$ (Gy)				Efficacy ratio (with $^{177}\text{Lu}$ as reference)			
	$^{177}\text{Lu}$	$^{67}\text{Cu}$	$^{47}\text{Sc}$	$^{161}\text{Tb}$	$^{177}\text{Lu}$	$^{67}\text{Cu}$	$^{47}\text{Sc}$	$^{161}\text{Tb}$	$^{177}\text{Lu}$	$^{67}\text{Cu}$	$^{47}\text{Sc}$	$^{161}\text{Tb}$
10000	22.5	23.0	25.5	30.5	152	153	157	152	1	1.01	1.03	1.00
5000	21.6	22.1	24.2	29.3	145	147	149	146	1	1.01	1.03	1.01
2000	19.0	19.6	19.8	26.0	128	130	122	129	1	1.02	0.95	1.01
1000	15.4	16.1	14.5	21.7	104	107	89.6	108	1	1.03	0.86	1.04
500	11.1	11.6	9.19	16.6	74.8	77.1	56.7	82.7	1	1.03	0.76	1.11
200	6.18	6.37	4.39	11.6	41.8	42.4	27.2	57.6	1	1.01	0.65	1.38
100	3.63	3.61	2.39	8.95	24.5	24.1	14.8	44.5	1	0.98	0.60	1.82
50	2.08	1.93	1.28	6.67	14.1	12.9	7.89	33.3	1	0.91	0.56	2.36
20	0.98	0.89	0.54	4.06	6.61	5.91	3.35	20.2	1	0.89	0.51	3.06
10	0.58	0.51	0.28	2.83	3.92	3.42	1.74	14.1	1	0.87	0.44	3.60

## Discussion générale

---

Pour le développement de peptides marqués au  $^{68}\text{Ga}$  sur notre site Bordelais, la première étape indispensable a été de mettre au point, caractériser et valider la plate-forme de radiomarquage au  $^{68}\text{Ga}$  afin de s'assurer de la qualité de la solution de chlorure de  $^{68}\text{Ga}$  qui sera utilisée dans les radiomarquages mais également du produit fini qui sera injecté au patient. Les lots de validation sont conformes aux spécifications des monographies de la Pharmacopée Européenne "Solution de chlorure de  $^{68}\text{Ga}$  pour radiomarquage" et " $^{68}\text{Ga}$ -edotrétotide". Les contrôles et les validations effectués sur les matières premières répondent en partie à des spécifications internes démontrant le manque de cadre réglementaire régissant ces médicaments radiopharmaceutiques expérimentaux innovants en particulier lorsque les matières premières utilisées ne sont pas fournies GMP. De plus, la disponibilité de précurseur labellisés "GMP" n'est pas garantie dans tous les pays, en raison de brevets, ce qui peut augmenter considérablement le coût de la matière première (136). Nous avons donc développé une stratégie de caractérisation et validation pharmaceutique reposant sur la libération paramétrique des matières premières, de la substance de référence et du produit fini, particulièrement bien adaptée aux médicaments radiopharmaceutiques non GMP.

Pour des applications cliniques TEP de radiopharmaceutiques marqués au  $^{68}\text{Ga}$ , un des pré-requis est de calibrer les instruments de mesures des activités de  $^{68}\text{Ga}$ , notamment l'activimètre. Ce questionnement est important pour éviter les erreurs sur les activités injectées pouvant aboutir à une erreur sur la quantification du SUV. Ceci pourrait en effet être une limite quant à la réalisation d'essais cliniques multicentriques, la comparaison entre les valeurs de SUV obtenues dans différents centres devenant délicate. Ainsi, nous avons développé une méthode simple et robuste, se passant de standards, pour calibrer les activimètres avec n'importe quel émetteur de positons.

Le potentiel translationnel de cette plate-forme de radiomarquage au  $^{68}\text{Ga}$  a été démontré par l'obtention des autorisations réglementaires pour la réalisation d'un essai clinique monocentrique de phase II utilisant un nouvel analogue de la somatostatine marqué au  $^{68}\text{Ga}$  (le  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC) pour le diagnostic de tumeurs neuroendocrines duodéno pancréatiques chez des patients NEM-1 en collaboration avec le service d'Endocrinologie du CHU de Bordeaux. Au cours de ce travail nous avons démontré la supériorité diagnostique de la TEP/TDM au  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC par rapport à l'imagerie conventionnelle à l' $^{111}\text{In}$ -pentétréotide et au scanner sur une cohorte de 19 patients. De plus, le  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC a permis de détecter des lésions supplémentaires non mises en évidence par les autres modalités d'imagerie. Enfin, ce projet nous a permis de nous positionner en tant que centre clinique d'innovation pour l'imagerie moléculaire TEP au  $^{68}\text{Ga}$ , avec d'autres essais envisagés avec le  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA et le  $^{68}\text{Ga}$ -RM2.

Ces nouvelles modalités d'imagerie et de thérapie vectorisée n'ont pas de pertinence sans l'identification des cibles moléculaires sous-jacentes. En effet, la connaissance de l'expression de ces récepteurs en fonction de l'hétérogénéité moléculaire tumorale est primordiale, car elle permet d'anticiper la variabilité de captation d'analogues radiomarqués dans différents phénotypes. Ainsi, nous avons élaboré un programme de recherche visant à caractériser trois récepteurs de neuropeptides dans diverses tumeurs humaines. En effet, outre

les récepteurs de la somatostatine, d'autres récepteurs de neuropeptides comme le GRP-R, NTR<sub>1</sub> ou les récepteurs du neuropeptide-Y, ont également un fort potentiel clinique.

Dans le cancer du sein, nos résultats indiquent que le GRP-R est sur-exprimé dans le phénotype luminal A (qui exprime les récepteurs hormonaux et est de bon pronostic). Ce phénotype représente environ 50-60 % des cancers du sein et est associé à un bon pronostic. Néanmoins, certaines patientes vont développer des métastases à distance. Des analogues radiomarqués au <sup>68</sup>Ga pourraient avoir une place dans l'imagerie. De même, des analogues radiomarqués par des émetteurs β<sup>-</sup> pourraient être utiles comme arme thérapeutique supplémentaire chez des patientes métastatiques.

Dans le cancer de la prostate, plusieurs études ont rapporté l'expression du GRP-R dans des formes peu agressives, associée à une forte expression du récepteur aux androgènes et à un bon pronostic. Cette donnée est importante car il manque actuellement des arguments pour surveiller les patients à faibles risques et pour ne pas opérer des patients pour qui la prostatectomie n'apporte pas de bénéfice en terme de survie afin de leur éviter l'impact sur la qualité de vie. L'imagerie moléculaire du GRP-R pourrait trouver son intérêt ici et nous souhaitons développer cette imagerie sur notre site Bordelais, notamment grâce au projet UROPET qui vise à comparer les performances diagnostiques de la TEP/TDM au <sup>68</sup>Ga-RM2 (antagoniste du GRP-R) vs <sup>68</sup>Ga-PSMA chez 15 patients atteints de cancer de la prostate localisés, candidats à une prostatectomie totale.

Un autre volet de ce travail, guidé par l'intérêt du ciblage des récepteurs de la bombésine, nous a conduit au développement d'une nouvelle classe de radiopeptides, les analogues de la ranatensine. Ces analogues, lorsqu'optimisés, pourraient avoir un rôle pour le ciblage de tumeurs surexprimant NMB-R. Une stratégie utilisée pour l'optimisation chimique des analogues du GRP consiste à introduire une charge positive grâce au motif pipéridine en position de linker, mais également de substituer la phénylalanine en avant dernière position par un motif statine qui confère un fort caractère antagoniste et améliore l'affinité(137). Une collaboration avec des chimistes spécialisés en synthèse peptidique serait un atout indéniable pour effectuer des modifications pertinentes sur le DOTA-RV\_15.

Le rôle du récepteur NTR<sub>1</sub> dans le cancer de la prostate reste encore largement méconnu. Néanmoins, nos résultats semblent indiquer un rôle de ce récepteur dans les cancers de la prostate de haut grade. Par ailleurs, l'implication de certaines voies de signalisation dans la régulation de l'expression de la neurotensine et de son récepteur NTR<sub>1</sub> méritent d'être approfondie. Concernant le cancer du sein, le récepteur NTR<sub>1</sub> pourrait être fortement exprimé dans les cancers de hauts grades de phénotypes moléculaires basaux pour lesquels il n'existe pas de thérapie autre que la chimiothérapie. L'engouement actuel pour l'étude de NTR<sub>1</sub> s'étant actuellement à divers autres cancers, nous avons évoqué parmi d'autres, le mélanome cutané et le cancer de la vessie.

La recherche des récepteurs Y<sub>1</sub> et Y<sub>5</sub> mérite d'être approfondie, notamment dans le cancer du sein, toujours en raison du manque de thérapies ciblées pour les cancers du sein triple négatifs.

Enfin, dans une optique théranostique, nous avons comparé la dose déposée par différents radioisotopes β<sup>-</sup> habituellement utilisés en radiothérapie métabolique <sup>177</sup>Lu, <sup>111</sup>In et <sup>90</sup>Y. Nos données montrent clairement un avantage pour le <sup>177</sup>Lu en comparaison avec <sup>90</sup>Y pour l'irradiation de micro-métastases. L'<sup>111</sup>In reste pertinent pour l'irradiation de cellules



tumorales isolées. Récemment, un autre émetteur  $\beta^-$ , aux caractéristiques physiques et nucléaires proches de celles du  $^{177}\text{Lu}$  mais qui possède des électrons Auger et de conversions supplémentaires, est disponible: le  $^{161}\text{Tb}$ . Le développement des premiers analogues peptidiques radiomarqués au  $^{161}\text{Tb}$  a montré que les capacités d'imagerie entre le  $^{161}\text{Tb}$  et le  $^{177}\text{Lu}$  sont équivalentes mais que les effets thérapeutiques sont meilleurs pour le  $^{161}\text{Tb}$  (133,135). Pour étayer ce résultat, nous avons également comparé les doses déposées par le  $^{161}\text{Tb}$  et le  $^{177}\text{Lu}$ . Nos données montrent un avantage clair pour le  $^{161}\text{Tb}$ . L'intérêt des radioisotopes du terbium réside dans la possibilité de produire un quadruplet de radioéléments pour différentes applications: le  $^{149}\text{Tb}$  pour l' $\alpha$ -thérapie (mais présence de 7,1 % d'émission  $\beta^+$ ), le  $^{152}\text{Tb}$  pour l'imagerie TEP (mais intensité d'émission  $\beta^+$  de seulement 17 %), le  $^{155}\text{Tb}$  pour l'imagerie TEMP et le  $^{161}\text{Tb}$  pour la  $\beta$ /Auger-thérapie (133). Une autre paire théranostique émergera certainement dans les années à venir: la paire  $^{44}\text{Sc}$  ( $T_{1/2} = 3,97$  h,  $I_{\beta^+} = 94,27$  %,  $E_{\beta^+\text{moy}} = 632$  keV) /  $^{47}\text{Sc}$  ( $T_{1/2} = 3,35$  j,  $E_{\beta^+\text{moy}} = 162$  keV,  $E_{\gamma} = 159$  keV) en raison de leurs caractéristiques nucléaires idéales. D'après nos calculs dosimétriques, le  $^{161}\text{Tb}$  semble toutefois supérieur au  $^{47}\text{Sc}$  pour l'irradiation de micrométastases.

## Continuité du travail de Thèse

---

Dans la poursuite de ce travail, nous mettrons à profit cette plate-forme de radiomarquage lors du PHRC GEP-NOC promu par l'AP-HM utilisant le  $^{68}\text{Ga}$ -DOTANOC dans les tumeurs neuroendocrines. Le PHRC  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA et le projet UROPET permettront également (si acceptés) de développer l'imagerie moléculaire au  $^{68}\text{Ga}$ .

Nous souhaitons également approfondir la caractérisation de l'expression des récepteurs  $\text{sst}_2$ ,  $\text{NTR}_1$ ,  $\text{Y}_1$  et  $\text{Y}_5$  dans des profils moléculaires tumoraux précis. Ceci est important car actuellement les choix diagnostiques et thérapeutiques offerts sont différents en fonction du sous-type tumoral.

La confirmation de l'expression de  $\text{sst}_2$  dans les lymphomes de Hodgkin de l'enfant pourrait ouvrir la voie à des essais thérapeutiques chez des patients avec maladie réfractaire ou récidivante, qu'il s'agisse d'utilisation d'analogues froids de la somatostatine (octréotide, Sandostatine®, ou Somatuline, par exemple) ou radiomarqués au  $^{177}\text{Lu}$ .

En fonction des résultats obtenus concernant l'expression de  $\text{NTR}_1$ ,  $\text{Y}_1$  et  $\text{Y}_5$  dans des tumeurs pertinentes (notamment cancer du sein et de la prostate), la synthèse, le radiomarquage puis l'évaluation *in vitro* ainsi qu'*in vivo* d'un analogue de neuropeptide ciblant chacun de ces récepteurs est envisageable dans une perspective de dépôt de projets nationaux et/ou européens et en collaboration avec d'autres équipes partenaires afin de développer l'imagerie et la thérapie moléculaire.

Sur le versant radiothérapie métabolique, le CHU de Bordeaux est un des centres investigateurs (en attente de l'autorisation ASN) dans un essai clinique utilisant le  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE (Lutathera®) pour le traitement de patients atteints de métastases de tumeurs neuroendocrines duodéno-pancréatiques (essai Occlurandom promu par l'Institut Gustave Roussy). D'autres essais sont en cours d'élaboration par le Service de Médecine Nucléaire de l'Hôpital Haut-Lévêque du CHU de Bordeaux.

Cette thématique s'inscrit donc dans la recherche de récepteurs de neuropeptides pour le développement de l'imagerie/thérapie moléculaire plus spécifiques de certains phénotypes tumoraux, pouvant permettre une stadification optimale, un diagnostic précoce du site de récurrence et de sélectionner les patients pour des thérapies ciblées ou radiociblées.

Au cours de mon travail de Thèse, j'ai également pu encadrer différents étudiants (BTS, licence, master). Dans la poursuite de mon travail de Thèse, je souhaite continuer cette activité d'encadrement sur le sujet "récepteurs de neuropeptides et cancer".

## **REFERENCES**

- 1.** Uehara H, Gonzalez N, Sancho V, et al. Pharmacology and selectivity of various natural and synthetic bombesin related peptide agonists for human and rat bombesin receptors differs. *Peptides*. 2011;32:1685-1699.
- 2.** Morgat C, Hindié E, Mishra AK, Allard M, Fernandez P. Gallium-68: Chemistry and radiolabeled peptides exploring different oncogenic pathways. *Cancer Biother Radiopharm*. 2013;28:85-97.
- 3.** Morgat C, Mishra AK, Varshney R, Allard M, Fernandez P, Hindié E. Targeting Neuropeptide Receptors for Cancer Imaging and Therapy: Perspectives with Bombesin, Neurotensin, and Neuropeptide-Y Receptors. *J Nucl Med*. 2014;55:1650-1657.
- 4.** Patel YC. Somatostatin and Its Receptor Family. *Front Neuroendocrinol*. 1999;20:157-198.
- 5.** Barbieri F, Bajetto A, Pattarozzi A, et al. Peptide Receptor Targeting in Cancer: The Somatostatin Paradigm. *Int J Pept*. 2013:1-20.
- 6.** Evers BM. Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues. *Peptides*. 2006;27:2424-2433.
- 7.** Wu Z, Martinez-Fong D, Tredaniel J, Forgez P. Neurotensin and its high affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;3.
- 8.** Brothers SP, Wahlested C. Therapeutic potential of neuropeptide Y (NPY) receptor ligands. *EMBO Mol Med*. 2010;2:429-439.
- 9.** Zhang L, Bijker MS, Herzog H. The neuropeptide Y system: pathophysiological and therapeutic implications in obesity and cancer. *Pharmacol Ther*. 2011;131:91-113.
- 10.** Ramage JK, Ahmed A, Ardill J, et al. Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumours (NETs). *Gut*. 2012;61:6-32.
- 11.** Reubi JC. Peptide receptor expression in GEP-NET. *Virchows Archiv*. 2007;451:47-50.
- 12.** Luboldt W, Zophel K, Wunderlich G, Abramyuk A, Luboldt HJ, Kotzerke J. Visualization of somatostatin receptors in prostate cancer and its bone metastases with Ga-68-DOTATOC PET/CT. *Mol Imaging Biol*. 2010;12:78-84.
- 13.** Jadvar H. Molecular imaging of prostate cancer with PET. *J Nucl Med*. 2013;54:1685-1688.
- 14.** Osborne JR, Green DA, Spratt DE, et al. A Prospective Pilot Study of <sup>89</sup>Zr-J591/Prostate Specific Membrane Antigen Positron Emission Tomography in Men with Localized Prostate Cancer Undergoing Radical Prostatectomy. *J Urol*. 2014;191:1439-1445.

- 15.** Afshar-Oromieh A, Zechmann CM, Malcher A, et al. Comparison of PET imaging with a <sup>68</sup>Ga-labelled PSMA ligand and <sup>18</sup>F-choline-based PET/CT for the diagnosis of recurrent prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;41:11-20.
- 16.** Schuster D, Votaw JR, Nieh PT, et al. Initial Experience with the Radiotracer Anti-1-Amino-3-<sup>18</sup>F-Fluorocyclobutane-1-Carboxylic Acid with PET/CT in Prostate Carcinoma. *J Nucl Med*. 2007;48:56-63.
- 17.** Markwalder R, Reubi JC. Gastrin-releasing Peptide Receptors in the Human Prostate : Relation to Neoplastic Transformation. *Cancer Res*. 1999;59:1152-1159.
- 18.** Reubi JC, Wenger S, Schmuckli-Maurer J. Bombesin Receptor Subtypes in Human Cancers : Detection with the Universal Radioligand <sup>125</sup>I-[d-Tyr<sup>6</sup>, b-Ala<sup>11</sup>, Phe<sup>13</sup>, Nle<sup>14</sup>] Bombesin(6-14). *Clin Cancer Res*. 2002;8:1139-1146.
- 19.** Beer M, Montani M, Gerhardt J, et al. Profiling gastrin-releasing peptide receptor in prostate tissues: clinical implications and molecular correlates. *Prostate*. 2012;72:318-325.
- 20.** Ananias HJK, van den Heuvel MC, Helfrich W, de Jong IJ. Expression of the gastrin-releasing peptide receptor, the prostate stem cell antigen and the prostate-specific membrane antigen in lymph node and bone metastases of prostate cancer. *Prostate*. 2009;69:1101-1108.
- 21.** Taylor RM, Severns V, Brown DC, Bisoffi M, Sillerud LO. Prostate cancer targeting motifs: Expression of  $\alpha_v\beta_3$ , neurotensin receptor 1, prostate specific membrane antigen, and prostate stem cell antigen in human prostate cancer cell lines and xenografts. *Prostate*. 2012;72:523-532.
- 22.** Swift SL, Burns JE, Maitland NJ. Altered Expression of Neurotensin Receptors Is Associated with the Differentiation State of Prostate Cancer. *Cancer Res*. 2010;70:347-356.
- 23.** DaSilva JO, Amorino GP, Casarez EV, Pemberton B, Parsons SJ. Neuroendocrine-Derived Peptides Promote Prostate Cancer Cell Survival Through Activation of IGF-IR Signaling. *Prostate*. 2013;73:801-8012.
- 24.** Valerie NC, Casarez EV, Dasilva JO, et al. Inhibition of neurotensin receptor 1 selectively sensitizes prostate cancer to ionizing radiation. *Cancer Res*. 2011;71:6817-6826.
- 25.** Hashimoto K, Kyoda Y, Tanaka T, et al. The potential of neurotensin secreted from neuroendocrine tumor cells to promote gelsolin-mediated invasiveness of prostate adenocarcinoma cells. *Lab Invest*. 2015:1-13.
- 26.** Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65:87-108.

- 27.** Perou CM, Sorlie T, Elsen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406:747-752.
- 28.** Dupouy S, Viardot-Foucault V, Alifano M, et al. The Neurotensin Receptor-1 Pathway Contributes to Human Ductal Breast Cancer Progression. *Plos One*. 2009;4:1-7.
- 29.** Dupouy S, Doan VK, Wu Z, et al. Activation of EGFR, HER2 and HER3 by neurotensin/neurotensin receptor 1 renders breast tumors aggressive yet highly responsive to lapatinib and metformin in mice. *Oncotarget*. 2014:1-17.
- 30.** Gugger M, Reubi C. Gastrin-Releasing peptide Receptors in Non-Neoplastic and Neoplastic Human Breast. *Am j Pathol*. 1999;155:2067-2076.
- 31.** Ni C, Zhao X, Sun T, Liu Y, Gu Q, Sun B. Role of gastrin-releasing peptides in breast cancer metastasis. *Hum Pathol*. 2012;43:2342-2347.
- 32.** Dalm SU, Martens JWM, Sieuwerts AM, et al. In-Vitro and in-Vivo Application of Radiolabeled Gastrin Releasing Peptide Receptor Ligands in Breast Cancer. *J Nucl Med*. 2015;56:752-757.
- 33.** Dalm S, Sieuwerts A, Look M, et al. Clinical relevance of targeting the gastrin releasing peptide receptor, somatostatin receptor 2 or chemokine c-x-c motif receptor 4 in breast cancer for imaging and therapy. *J Nucl Med*. 2015;56:1487-1493.
- 34.** Reubi JC, Gugger M, Waser B. Y<sub>1</sub>-Mediated Effect of Neuropeptide Y in Cancer : Breast Carcinomas as Targets. *Cancer Res*. 2001;61:4636-4641.
- 35.** Reubi C, Gugger M, Waser B. Co-expressed peptide receptors in breast cancer as a molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2002;29:855-862.
- 36.** Cescato R, Maina T, Nock B, et al. Bombesin receptor antagonists may be preferable to agonists for tumor targeting. *J Nucl Med*. 2008;49:318-326.
- 37.** Wild D, Fani M, Fischer R, et al. Comparison of somatostatin receptor agonist and antagonist for peptide receptor radionuclide therapy: A pilot study. *J Nucl Med*. 2014;55:1248-1252.
- 38.** Ginj M, Zhang H, Waser B, et al. Radiolabeled Somatostatin Receptor Antagonists Are Preferable to Agonists for in vivo Peptide Receptor Targeting of Tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:16436-16441.
- 39.** Nock BA, Maina T, Krenning EP, de Jong M. "To Serve and Protect": Enzyme Inhibitors as Radiopeptide Escorts Promote Tumor Targeting. *J Nucl Med*. 2014;55:121-127.
- 40.** Teunissen JJM, Kwekkeboom DJ, Valkema R, Krenning EP. Nuclear medicine techniques for the imaging and treatment of neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer*. 2011;18:S27-S51.

- 41.** Buchmann I, Henze M, Engelbrecht S, et al. Comparison of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC PET and  $^{111}\text{In}$ -DTPAOC (Octreoscan) SPECT in patients with neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007;34:1617-1626.
- 42.** Reubi JC, Schar JC, Waser B, et al. Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. *Eur J Nucl Med*. 2000;27:273-282.
- 43.** Wild D, Macke HR, Waser B, et al.  $^{68}\text{Ga}$ -DOTANOC: a first compound for PET imaging with high affinity for somatostatin receptor subtypes 2 and 5. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2005;32:724.
- 44.** Schreiter NF, Brenner W, Nogami M, et al. Cost comparison of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-octreotide scintigraphy and  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC PET/CT for staging enteropancreatic neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2012;39:72-82.
- 45.** Gabriel M, Decristoforo C, Kendler D, et al.  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-octreotide PET in neuroendocrine tumors: comparison with somatostatin receptor scintigraphy and CT. *J Nucl Med*. 2007;48:508-518.
- 46.** Ambrosini V, Campana D, Tomassetti P, Fanti S.  $^{68}\text{Ga}$ -labelled peptides for diagnosis of gastroenteropancreatic NET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2012;39:52-60.
- 47.** Pfeifer A, Knigge U, Binderup T, et al.  $^{64}\text{Cu}$ -DOTATATE PET for Neuroendocrine Tumors: A Prospective Head-to-Head Comparison with  $^{111}\text{In}$ -DTPA-Octreotide in 112 Patients. *J Nucl Med*. 2015;56:847-854.
- 48.** Taieb D, Neumann H, Rubello D, Al-Nahhas A, Guillet B, Hindie E. Modern nuclear imaging for paragangliomas: Beyond SPECT. *J Nucl Med*. 2012;53:264-274.
- 49.** Sancho V, Di Florio A, Moody TW, Jensen RT. Bombesin receptor-mediated imaging and cytotoxicity: review and current status. *Curr Drug deliv*. 2011;8:79-134.
- 50.** Van de Wiele C, Dumont F, Vanden Broecke R, et al. Technetium-99m RP527, a GRP analogue for visualisation of GRP receptor-expressing malignancies: a feasibility study. *Eur J Nucl Med*. 2000;27:1694-1699.
- 51.** Van de Wiele C, Phonteyne P, Pauwels P, et al. Gastrin-releasing peptide receptor imaging in human breast carcinoma versus immunohistochemistry. *J Nucl Med*. 2008;49:260-264.
- 52.** Roivainen A, Kahkonen E, Luoto P, et al. Plasma Pharmacokinetics, Whole-Body Distribution, Metabolism, and Radiation Dosimetry of  $^{68}\text{Ga}$  Bombesin Antagonist BAY 86-7548 in Healthy Men. *J Nucl Med*. 2013;54:867-872.

- 53.** Kahkonen E, Jambor I, Kemppainen J, et al. In vivo imaging of prostate cancer using [<sup>68</sup>Ga]-labeled bombesin analog BAY86-7548. *Clin Cancer Res.* 2013;19:5434-5443.
- 54.** Wieser G, Mansi R, Grosu AL, et al. Positron emission tomography (PET) imaging of prostate cancer with a gastrin releasing peptide receptor antagonist - from mice to men. *Theranostics.* 2014;4:412-419.
- 55.** Sah BR, Burger IA, Schibli R, et al. Dosimetry and first clinical evaluation of the new <sup>18</sup>F radiolabeled Bombesin Analogue BAY 864367 in patients with prostate cancer. *J Nucl Med.* 2015;56:372-378.
- 56.** Mansi R, Fleischmann A, Macke HR, Reubi JC. Targeting GRPR in urological cancers—from basic research to clinical application. *Nat Rev Urol.* 2013;10:235-244.
- 57.** Buchegger F, Bonvin F, Kosinski M, et al. Radiolabeled Neurotensin Analog, <sup>99m</sup>Tc-NT-XI, Evaluated in Ductal Pancreatic Adenocarcinoma Patients. *J Nucl Med.* 2003;44:1649-1654.
- 58.** Gabriel M, Decristoforo C, Woll E, et al. [<sup>99m</sup>Tc]demotensin VI: biodistribution and initial clinical results in tumor patients of a pilot/phase I study. *Cancer Biother Radiopharm.* 2011;26:557-563.
- 59.** Alshoukr F, Prignon AI, Brans L, et al. Novel DOTA-neurotensin analogues for <sup>111</sup>In scintigraphy and <sup>68</sup>Ga PET imaging of neurotensin receptor-positive tumors. *Bioconjugate Chem.* 2011;22:1374-1385.
- 60.** García-Garayoa E, Bläuenstein P, Blanc A, Maes V, Tourwé D, Schubiger PA. A stable neurotensin-based radiopharmaceutical for targeted imaging and therapy of neurotensin receptor-positive tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2009;36:37-47.
- 61.** Wu Z, Li L, Liu S, et al. Facile preparation of a thiol-reactive <sup>18</sup>F-labeling agent and synthesis of <sup>18</sup>F-DEG-VS-NT for PET imaging of a neurotensin receptor-positive tumor. *J Nucl Med.* 2014;55:1-7.
- 62.** Mascarin A, Valverde IE, Vomstein S, Mindt TL. 1,2,3-Triazole Stabilized Neurotensin-Based Radiopeptidomimetics for Improved Tumor Targeting. *Bioconjugate Chem.* 2015;26:2143-2152.
- 63.** Zwanziger D, Khan IU, Neundorf I, et al. Novel Chemically Modified Analogues of Neuropeptide Y for Tumor Targeting. *Bioconjug Chem.* 2008;19:1430-1438.
- 64.** Khan IU, Zwanziger D, Bohme I, et al. Breast-cancer diagnosis by neuropeptide Y analogues: from synthesis to clinical application. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010;49:1155-1158.
- 65.** Chatenet D, Cescato R, Waser B, Erchegyi J, Rivier JE, Reubi JC. Novel dimeric DOTA-coupled peptidic Y<sub>1</sub>-receptor antagonists for targeting of neuropeptide Y receptor-expressing cancers. *EJNMMI Res.* 2011;1:21.



- 66.** Hofmann S, Maschauer S, Kuwert T, Beck-Sickinger AG, Prante O. Synthesis and in vitro and in vivo evaluation of an  $^{18}\text{F}$ -labeled neuropeptide Y analogue for imaging of breast cancer by PET. *Mol Pharm.* 2015;12:1121-1130.
- 67.** Rolleman EJ, Melis M, Valkema R, Boerman OC, Krenning EP, de Jong M. Kidney protection during peptide receptor radionuclide therapy with somatostatin analogues. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2010;37:1018-1031.
- 68.** Kwekkeboom DJ, Kam BL, van Essen M, et al. Somatostatin receptor-based imaging and therapy of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer.* 2009;17:R53-R73.
- 69.** Kratochwil C, Giesel FL, Bruchertseifer F, et al.  $^{213}\text{Bi}$ -DOTATOC receptor-targeted alpha-radionuclide therapy induces remission in neuroendocrine tumours refractory to beta radiation: a first-in-human experience. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2014;41:2106-2119.
- 70.** Bodei L, Ferrari M, Nunn A, et al.  $^{177}\text{Lu}$ -AMBA Bombesin analogue for hormone refractory prostate cancer patients: a phase I escalation study with single-cycle administrations. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2007;34.
- 71.** Schuchardt C, Kulkarni HR, Smerling C, et al. First dosimetric results with Lu-177 3BP-227 in a patient with pancreatic cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2014;41:PW049.
- 72.** Fani M, Andre JP, Maecke HR.  $^{68}\text{Ga}$ -PET: a powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals. *Contrast Media Mol Imaging.* 2008;3:67-77.
- 73.** Velikyan I, Beyer GJ, Langstrom B. Microwave-Supported Preparation of  $^{68}\text{Ga}$  Bioconjugates with High Specific Radioactivity. *Bioconjugate Chem.* 2004;15:554-560.
- 74.** Velikyan I, Xu H, Nair M, Hall H. Robust labeling and comparative preclinical characterization of DOTA-TOC and DOTA-TATE. *Nucl Med Biol.* 2012;39:628-639.
- 75.** Morgat C, Mazère J, Fernandez P, et al. A phantom-based method to standardize dose-calibrators for new  $\beta^+$ -emitters. *Nucl Med Commun.* 2015;36:201-206.
- 76.** Scharfetter VH, Dudas J, Url C, et al.  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA<sup>0</sup>-Tyr<sup>3</sup>-octreotide positron emission tomography in nasopharyngeal carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2015;42:20-24.
- 77.** Khor LK, Loi HY, Sinha AK, et al. Correlation between  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NOC PET/CT and  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT in EBV-positive undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2015;42:1162-1163.
- 78.** Remmele W, Stegner H. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for the immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe.* 1987;8:138-140.

- 79.** Mauz-Körholz C, Metzger ML, Kelly KM, et al. Pediatric Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2015;33:2975-2985.
- 80.** Lugtenburg PJ, Krenning EP, Valkema R, et al. Somatostatin receptor scintigraphy useful in stage I-II Hodgkin's disease: more extended disease identified. *Br J Haematol.* 2001;112:936-944.
- 81.** Reubi J, Waser B, Van Hagen M, et al. In vitro and in vivo detection of somatostatin receptors in human malignant lymphomas. *Int J Cancer.* 1992;50:895-900.
- 82.** Keller G, Engel JB, Schally AV, Nagy A, Hammann B, Halmos G. Growth inhibition of experimental non-Hodgkin's lymphomas with the targeted cytotoxic somatostatin analogue AN-238. *Int J Cancer.* 2005;114:831-835.
- 83.** Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406:747-752.
- 84.** Schillaci O, Buscombe JR. Breast scintigraphy today: indications and limitations. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2004;31:S35-S45.
- 85.** Halmos G, Wittliff JL, Schally AV. Characterization of bombesin/gastrin releasing peptide receptors in human breast cancer and their relationship to steroid receptor expression. *Cancer Res.* 1995;55:280-287.
- 86.** van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002;415:530-536.
- 87.** Reubi JC, Wenger S, Schmuckli-Maurer J, Schaer JC, Gugger M. Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand  $^{125}\text{I}$ -[D-Tyr<sup>6</sup>,  $\beta$ -Ala<sup>11</sup>, Phe<sup>13</sup>, Nle<sup>14</sup>] bombesin(6-14). *Clin Cancer Res.* 2002;8:1139-1146.
- 88.** Beer M, Montani M, Gerhardt J, et al. Profiling gastrin-releasing peptide receptor in prostate tissues: Clinical implications and molecular correlates. *Prostate.* 2012;72:318-325.
- 89.** Mansi R, Fleischmann A, Macke HR, Reubi JC. Targeting GRPR in urological cancers--from basic research to clinical application. *Nat Rev Urol.* 2013;10:235-244.
- 90.** Körner M, Waser B, Rehmann R, Reubi JC. Early over-expression of GRP receptors in prostatic carcinogenesis. *Prostate.* 2014;74:217-224.
- 91.** Reubi JC. Strict rules are needed for validation of G-protein-coupled receptor immunohistochemical studies in human tissues. *Endocrine.* 2014;47:659-661.

- 92.** Subik K, Lee J, Baxter L, et al. The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and Ar by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer (Auckl)*. 2010;4:35-41.
- 93.** Vranic S, Gatalica Z, Wang Z. Update on the molecular profile of the MDA-MB-453 cell line as a model for apocrine breast carcinoma studies. *Oncol Lett*. 2011;2:1131-1137.
- 94.** Gugger M, Reubi JC. Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. *Am J Pathol*. 1999;155:2067-2076.
- 95.** Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast Cancer Subtypes and the Risk of Local and Regional Relapse. *J Clin Oncol*. 2010;28:1684-1691.
- 96.** van Kruchten M, de Vries EGE, Brown M, et al. PET imaging of oestrogen receptors in patients with breast cancer. *Lancet Oncol*. 2013;14:e465-e475.
- 97.** Wilt TJ, Brawer MK, Jones KM, et al. Radical Prostatectomy versus Observation for Localized Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2012;367:203-213.
- 98.** van den Bergh RC, Giannarini G. Prostate cancer: surgery versus observation for localized prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2014;11:312-313.
- 99.** Jeldres C, Cullen J, Hurwitz LM, et al. Prospective quality-of-life outcomes for low-risk prostate cancer: Active surveillance versus radical prostatectomy. *Cancer*. 2015;6:29370.
- 100.** Umbehr MH, Muntener M, Hany T, Sulser T, Bachmann LM. The role of <sup>11</sup>C-choline and <sup>18</sup>F-fluorocholine positron emission tomography (PET) and PET/CT in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur Urol*. 2013;64:106-117.
- 101.** Rajinikanth A, Manoharan M, Soloway CT, Civantos FJ, Soloway MS. Trends in Gleason score: concordance between biopsy and prostatectomy over 15 years. *Urology*. 2008;72:177-182.
- 102.** Afshar-Oromieh A, Malcher A, Eder M, et al. PET imaging with a [<sup>68</sup>Ga]gallium-labelled PSMA ligand for the diagnosis of prostate cancer: biodistribution in humans and first evaluation of tumour lesions. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2013;40:486-495.
- 103.** Eiber M, Maurer T, Souvatzoglou M, et al. Evaluation of hybrid <sup>68</sup>Ga-PSMA-ligand PET/CT in 248 patients with biochemical recurrence after radical prostatectomy. *J Nucl Med*. 2015;19:154153.
- 104.** Kabasakal L, Demirci E, Ocak M, et al. Evaluation of PSMA PET/CT imaging using a <sup>68</sup>Ga-HBED-CC ligand in patients with prostate cancer and the value of early pelvic imaging. *Nucl Med Commun*. 2015;36:582-587.

- 105.** Maurer T, Weirich G, Schottelius M, et al. Prostate-specific Membrane Antigen–radioguided Surgery for Metastatic Lymph Nodes in Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2015;68:530-534.
- 106.** Uehara H, González N, Sancho V, et al. Pharmacology and selectivity of various natural and synthetic bombesin related peptide agonists for human and rat bombesin receptors differs. *Peptides.* 2011;32:1685-1699.
- 107.** Park H-J, Kim S-R, Kim M-K, et al. Neuromedin B receptor antagonist suppresses tumor angiogenesis and tumor growth in vitro and in vivo. *Cancer Letters.* 2011;312:117-127.
- 108.** Park H-J, Kim M-K, Kim S-R, Bae S-K, Bae M-K. Hypoxia regulates the expression of the neuromedin B receptor through a mechanism dependent on hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *PLoS One.* 2013;8:e82868.
- 109.** Almeida TA, Rodriguez Y, Hernández M, Reyes R, Bello AR. Differential expression of new splice variants of the neurotensin receptor 1 gene in human prostate cancer cell lines. *Peptides.* 2010;31:242-247.
- 110.** Rodriguez Y, Almeida TA, Valladares F, et al. Neurotensin and Neurotensin Receptor 1 Expression in Human Myometrium and Uterine Leiomyomas. *Biol Reprod.* 2010;83:641-647.
- 111.** White JF, Noinaj N, Shibata Y, et al. Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature.* 2012;490:508-513.
- 112.** Dupouy S, Viardot-Foucault V, Alifano M, et al. The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression. *PLoS One.* 2009;4:e4223.
- 113.** Souzaze F, Dupouy S, Viardot-Foucault V, et al. Expression of neurotensin and NT<sub>1</sub> receptor in human breast cancer: A potential role in tumor progression. *Cancer Res.* 2006;66:6243-6249.
- 114.** Younes M, Wu Z, Dupouy S, et al. Neurotensin (NTS) and its receptor (NTSR1) causes EGFR, HER2 and HER3 over-expression and their autocrine/paracrine activation in lung tumors, confirming responsiveness to erlotinib. *Oncotarget.* 2014;5:8252-8269.
- 115.** Alifano M, Souzaze F, Dupouy S, et al. Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16:4401-4410.
- 116.** Alifano M, Loi M, Camilleri-Broet S, Dupouy S, Régnard JF, Forgez P. Neurotensin expression and outcome of malignant pleural mesothelioma. *Biochimie.* 2010;92:164-170.
- 117.** Bossard C, Souzaze F, Jarry A, et al. Over-expression of neurotensin high-affinity receptor 1 (NTS1) in relation with its ligand neurotensin (NT) and nuclear  $\beta$ -catenin in inflammatory bowel disease-related oncogenesis. *Peptides.* 2007;28:2030-2035.

- 118.** Gromova P, Rubin BP, Thys A, Erneux C, Vanderwinden J-M. Neurotensin receptor 1 is expressed in gastrointestinal stromal tumors but not in interstitial cells of cajal. *PLoS One*. 2011;6:e14710.
- 119.** Castillo-Rodriguez RA, Arango-Rodriguez ML, Escobedo L, et al. Suicide HSVtk gene delivery by neurotensin-polyplex nanoparticles via the bloodstream and GCV Treatment specifically inhibit the growth of human MDA-MB-231 triple negative breast cancer tumors xenografted in athymic mice. *PLoS One*. 2014;9:e97151.
- 120.** van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, et al. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate*. 2003;57:205-225.
- 121.** Sehgal I, Powers S, Huntley B, Powis G, Pittelkow M, Maihle NJ. Neurotensin is an autocrine trophic factor stimulated by androgen withdrawal in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:4673-4677.
- 122.** Souazé F, Forgez P. Molecular and cellular regulation of neurotensin receptor under acute and chronic agonist stimulation. *Peptides*. 2006;27:2493-2501.
- 123.** Souza F. Neurotensin receptor 1 gene activation by the Tcf/ $\beta$ -catenin pathway is an early event in human colonic adenomas. *Carcinogenesis*. 2005;27:708-716.
- 124.** Prowald A, Cronauer MV, von Klot C, et al. Modulation of  $\beta$ -catenin-mediated TCF-signalling in prostate cancer cell lines by wild-type and mutant p53. *Prostate*. 2007;67:1751-1760.
- 125.** Kim JT, Liu C, Zaytseva YY, Weiss HL, Townsend Jr CM, Evers BM. Neurotensin, a novel target of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, promotes growth of neuroendocrine tumor cells. *Int J Cancer*. 2015;136:1475-1481.
- 126.** Zhou Z, Xie J, Cai Y, Yang S, Chen Y, Wu H. The significance of NTR1 expression and its correlation with  $\beta$ -catenin and EGFR in gastric cancer. *Diagn Pathol*. 2015;10.
- 127.** Tepper CG, Gregg JP, Shi X-B, et al. Profiling of gene expression changes caused by p53 gain-of-function mutant alleles in prostate cancer cells. *Prostate*. 2005;65:375-389.
- 128.** Kaufman DS. Challenges in the treatment of bladder cancer. *Ann Oncol*. 2006;17:v106-112.
- 129.** Zhang Y, Zhu S, Yi L, Liu Y, Cui H. Neurotensin receptor1 antagonist SR48692 reduces proliferation by inducing apoptosis and cell cycle arrest in melanoma cells. *Mol Cell Biochem*. 2013;20:20.
- 130.** Memminger M, Keller M, Lopuch M, et al. The Neuropeptide Y Y<sub>1</sub> Receptor: A Diagnostic Marker? Expression in MCF-7 Breast Cancer Cells is Down-Regulated by Antiestrogens In Vitro and in Xenografts. *PLoS One*. 2012;7:e51032.

- 131.** Sheriff S, Ali M, Yahya A, Haider KH, Balasubramaniam A, Amlal H. Neuropeptide Y Y5 Receptor Promotes Cell Growth through Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling and Cyclic AMP Inhibition in a Human Breast Cancer Cell Line. *Mol Cancer Res.* 2010;8:604-614.
- 132.** Magni P, Motta M. Expression of neuropeptide Y receptors in human prostate cancer cells. *Ann Oncol.* 2001;12:S27-29.
- 133.** Muller C, Zhernosekov K, Koster U, et al. A Unique Matched Quadruplet of Terbium Radioisotopes for PET and SPECT and for  $\alpha$ - and  $\beta$ -Radionuclide Therapy: An In Vivo Proof-of-Concept Study with a New Receptor-Targeted Folate Derivative. *J Nucl Med.* 2012;53:1951-1959.
- 134.** Lehenberger S, Barkhausen C, Cohrs S, et al. The low-energy  $\beta^-$  and electron emitter  $^{161}\text{Tb}$  as an alternative to  $^{177}\text{Lu}$  for targeted radionuclide therapy. *Nucl Med Biol.* 2011;38:917-924.
- 135.** Müller C, Reber J, Haller S, et al. Direct in vitro and in vivo comparison of  $^{161}\text{Tb}$  and  $^{177}\text{Lu}$  using a tumour-targeting folate conjugate. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2014;41:476-485.
- 136.** Decristoforo C, Pickett RD, Verbruggen A. Feasibility and availability of  $^{68}\text{Ga}$ -labelled peptides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2012;39:31-40.
- 137.** Mansi R, Wang X, Forrer F, et al. Development of a potent DOTA-conjugated bombesin antagonist for targeting GRPr-positive tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2010;38:97-107.

## **PRODUCTION SCIENTIFIQUE**

*Les articles présentés dans cette Thèse ne sont pas mentionnés dans cette section*

## **Communications orales à diffusion internationale**

- Hindié E, Quinto M. A., Zanotti-Fregonara P, **Morgat C**, Champion C. Terbium-161 a promising radionuclide for the irradiation of tumor cells and micrometastases: Monte Carlo assessment using CELLDOSE. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2015**;42:S1. Hamburg (Germany).

- **Morgat C**, Varshney R, Schulz J, Savona-Baron C, Vimont D, Riès C, Bertrand S.S, Mishra A.K, Fernandez P, Hindié E. Development of a  $^{68}\text{Ga}$ -ranatensin analog for bombesin receptors PET molecular imaging. *J Nucl Med.* **2015**;56(S2):2A-30. Baltimore (USA)

- **Morgat C**, Mazère J, Fernandez P, Buj S, Vimont D, Schulz J, Lamare F. Methodological proposal to standardize dose-calibrators for new  $\beta^+$  emitters:  $^{68}\text{Ga}$  as demonstrative working example. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **2014**;41:S308. Gotenburg (Sweden).

- Champion C, Zanotti-Fregonara P, Quinto M. A, **Morgat C**, Hindié E. Comparative efficacy of  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  and  $^{111}\text{In}$  for the irradiation of tumor cells and micrometastases: a Monte Carlo study using CELLDOSE. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **2014**;41:S181. Gotenburg (Sweden).

## **Communications affichées à diffusion internationale**

- **Morgat C**, Vélayoudom-Céphise F. L., Schwartz P, Nunes M. L, Schulz J, Mazère J, Guyot M, Gaye D, Hindié E, Tabarin A, Fernandez P. Interest of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC-PET-CT compared to  $^{111}\text{In}$ -DTPA-octreotide scintigraphy to detect pancreas and duodenum neuroendocrine tumors in patients with MEN-1: preliminary results. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2015**;42:S1. Hamburg (Germany)

- **Morgat C**, Varshney R, Schulz J, Savona-Baron C, Vimont D, Riès C, Bertrand S, Allard M, Mishra A.K, Fernandez P, Hindié E. Identification of GRPR in ER-positive breast cancer cells as molecular basis to develop a new  $^{68}\text{Ga}$ -GRPR-antagonist ( $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-RV\_15) for PET molecular imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **2014**;41:S421. Gotenburg (Sweden).



## Communications orales à diffusion nationale

- Velayoudom-Céphise F. L, **Morgat C**, Schwartz P, Nunes M. L, Guyot M, Schulz J, Mazère J, Gaye D, Hindié E, Fernandez P, Tabarin A. Evaluation de la TEP au  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC et de la tomoscintigraphie à l' $^{111}\text{In}$ -DTPA-octréotide pour le dépistage des tumeurs neuroendocrines duodéno pancréatiques des patients porteurs d'une NEM1: étude pilote. *Annales d'Endocrinologie* 2015;76(4):322-323

- Fernandez P, **Morgat C**, Schulz J, Vimont D, Mazère J, Debordeaux F, Hindié E, Allard M. Mise en place d'une plate-forme d'imagerie par le Gallium-68: applications précliniques et cliniques. *Société Française de Génie Biologique et Médical* 2015 Dourdan.

- **Morgat C**, Gary C, Vimont D, Négroni L, Schulz J, Breilh D, Fernandez P, Xuereb F, Mazère J. Validation pharmaceutique de la matière première DOTATOC pour la production du médicament radiopharmaceutique expérimental  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC. *SNPHPU*. 2014 Juan-les-Pins.

## Communications affichées à diffusion nationale

- **Morgat C**, Gary C, Vimont D, Négroni L, Schulz J, Breilh D, Fernandez P, Xuereb F, Mazère J. Validation pharmaceutique de la matière première DOTATOC pour la production du médicament radiopharmaceutique expérimental  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC. *SNPHPU*. 2014 Juan-les-Pins.