



**HAL**  
open science

# Conception d'agents d'imagerie moléculaire et théranostiques pour la détection et la thérapie ciblée de cancers

Emma Renard

► **To cite this version:**

Emma Renard. Conception d'agents d'imagerie moléculaire et théranostiques pour la détection et la thérapie ciblée de cancers. Chimie organique. Université Bourgogne Franche-Comté, 2020. Français. NNT : 2020UBFCK029 . tel-03093954

**HAL Id: tel-03093954**

**<https://theses.hal.science/tel-03093954>**

Submitted on 4 Jan 2021

**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 DE DOCTORAT DE L'ÉTABLISSEMENT UNIVERSITÉ BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ

*Préparée à*

**Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne –  
UMR CNRS 6302**

UFR Sciences et Techniques, Université Bourgogne Franche-Comté  
École doctorale Carnot Pasteur n°553

Doctorat de Chimie organique

*Présentée par*

**Emma RENARD**

---

## **Conception d'agents d'imagerie moléculaire et théranostiques pour la détection et la thérapie ciblée de cancers**

---

Thèse soutenue le 30 octobre 2020, devant la commission d'examen composée de :

J. M. CHEZAL	Professeur à l'Université Clermont-Auvergne, Clermont-Ferrand	Président
B. KUHNAST	Ingénieur chercheur au CEA Paris Saclay	Rapporteur
S. HERNOT	Professeur à l'Université de Bruxelles, Bruxelles	Examinatrice
C. FROCHOT	Directeur de recherche CNRS, Nancy	Examinatrice
J. L. COLL	Directeur de recherche à l'Inserm UGA U1209, Grenoble	Examineur
C. BERTHET	Oncodesign, Dijon	Invité
F. DENAT	Professeur à l'Université de Bourgogne, Dijon	Directeur
V. GONCALVES	Maître de conférences à l'Université de Bourgogne, Dijon	Co-Directeur





*« Il faut savoir s'instruire dans la gaieté. Le savoir triste est un savoir mort. L'intelligence est joie. »*

*Voltaire*



## Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit n'auraient pas été possibles sans la contribution de nombreuses personnes que je remercierai dans cette section classique mais indispensable à mes yeux.

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Franck Denat, directeur de l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB) et le Pr. Claude Gros, directeur de l'équipe Porphyrines, Polyamines, Développement et Applications (P2DA) de m'avoir accueillie durant ces trois ans.

Je souhaite remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je remercie le Dr. Bertrand Kuhnast, ingénieur chercheur et responsable du groupe Sondes moléculaires au CEA ainsi que le Pr. Jean-Michel Chezal du laboratoire Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques à l'université Clermont-Auvergne d'avoir accepté de participer à mon jury en tant que rapporteurs. Je remercie le Pr. Sophie Hernot, professeur à l'université de Bruxelles, le Dr. Céline Frochot, directeur de recherche CNRS au Laboratoire Réactions et Génie des Procédés à Nancy ainsi que le Pr. Jean-Luc Coll, directeur de recherche du groupe Thérapie ciblée, Diagnostic précoce et Imagerie du cancer à Grenoble d'avoir accepté de faire partie de ce jury en tant qu'examineurs. Enfin, je remercie le Dr. Cyril Berthet, directeur de l'unité Pharmaco-Imaging chez Oncodesign et directeur des opérations chez Pharmimage à Dijon, qui a également accepté de participer à ce jury.

Ma plus grande reconnaissance revient bien évidemment à mes co-directeur et directeur de thèse, le Dr. Victor Goncalves et le Pr. Franck Denat, tant sur le plan professionnel que sur le plan personnel. Merci à tous les deux pour votre confiance, votre disponibilité et vos conseils scientifiques. Merci de m'avoir poussée à me dépasser et m'avoir soutenue et encouragée lors de mes crises de panique. Merci pour vos relectures et corrections de cette thèse mais aussi de tous les abstracts et publications. Merci pour tous les supers moments que nous avons partagés en congrès, autour d'un verre ou au laboratoire grâce à votre bonne humeur et votre goût pour les taquineries. J'en garderai de merveilleux souvenirs. Trois ans c'était trop court. Plus particulièrement, merci Victor pour avoir été présent, à l'écoute et avoir toujours pris le temps pour répondre à mes questions. Merci aussi pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ton optimisme. Bref, merci à vous, du fond du cœur, vous m'avez aidée et apporté beaucoup plus que vous ne le pensez. Cette thèse c'était de la folie !

Je remercie chaleureusement toutes les personnes ayant participé aux différents projets. Merci au Dr. Aurélie Prignon pour avoir réalisé la radiochimie et les expérimentations animales à Paris. Merci de m'avoir accueillie à plusieurs reprises dans ton labo et pour avoir partagé ton

goût pour ce beau projet de la neurotensine. Merci pour ton enthousiasme, ta joie de vivre et les supers moments passés ensemble.

Merci aussi au Dr. Pierre-Alix Dancer d'avoir réalisé les images de fluorescence et au Dr. Christophe Portal pour m'avoir gentiment procuré la cyanine tétrasulfonate.

Merci au Dr. Frédéric Boschetti, directeur de la société CheMatech de m'avoir généreusement procuré tous les agents chélatants sans lesquels aucun projet n'aurait pu voir le jour.

Merci à toutes les personnes de la plateforme préclinique du Centre Georges-François Leclerc (CGFL) de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire. Le Dr. Bertrand Collin et Lydie Houot mais surtout le Dr. Pierre-Simon Bellaye et Mélanie Guillemin pour toutes les expérimentations animales. Et bien sûr, merci au Dr. Mathieu Moreau de m'avoir formée à la radiochimie.

Merci aussi au Dr. Sanne van Lith pour toutes les expériences *in vitro* et *in vivo* menées à Nijmegen.

Je souhaite aussi remercier les membres de la plateforme d'analyse (PACSMUB) pour leur temps passé sur l'analyse de mes composés. Particulièrement le Dr. Quentin Bonnin pour les analyses HRMS et RMN, Myriam Heydel pour les chromatographies ioniques et Marie-José Penouilh pour la RMN et à tous pour leurs réponses à toutes mes questions.

Je remercie tous les membres de l'ICMUB pour les échanges scientifiques ou non et particulièrement le Pr. Anthony Romieu pour avoir partagé ses connaissances et ses conseils, avoir répondu à mes questions sur la fluo ou sur une toute autre chimie et m'avoir gracieusement donné des cyanines. Merci aussi pour ta disponibilité et ton goût pour le bricolage, bien utile lors des problèmes rencontrés notamment sur la LCMS, l'HPLC semi-préparative ou encore le lyophilisateur, et tout simplement merci pour tout ce que tu fais au labo. Je remercie aussi les secrétaires qui se sont arrachées les cheveux plus d'une fois pour toute la paperasse et pour nous permettre de partir en congrès. Merci aussi aux pros de l'informatique qui m'ont aidée plus d'une fois à résoudre des problèmes!

J'aurai bien sûr une petite mention particulière pour le Dr. Claire Bernhard parce que j'ai adoré tous les moments qu'on a partagés, en pause-café, en congrès, autour d'un verre ou sur une piste de dance. ;) C'était toujours un plaisir de te croiser dans les couloirs, discuter avec toi de sciences, de vacances, de la vie en général et de Disney, parce que oui, j'ai trouvé une « adulte » qui a aussi ce goût pour les Disney et leurs chansons !

Je remercie à nouveau mon acolyte de radiomarquage Mathieu Moreau de m'avoir tout appris sur la radiochimie mais aussi sur les techniques et appareils utilisés pour la bioconjugaison (Orbitrap, MALDI, FPLC). Bien sûr tout cela sans jamais oublier un petit fond musical (de qualité), du chant (sans fausse note), du rythme (grâce à tes Tap-Tap) et des rires (beaucoup de rires). Je garderai un excellent souvenir de nos quelques jours à Barcelone pour l'EANM. Maintenant que je sais que tu peux te déhancher, il faudra remettre ça ;)

J'aimerais aussi remercier tous les doctorants et post-doc que j'ai pu croiser durant ces trois ans et qui ont facilité tous les moments passés au labo ou à l'extérieur, que ce soit pendant les pauses déjeuner, lors des fameux jeux de société, pour les randonnées dans la campagne dijonnaise, les parties de foot, ou encore toutes les soirées autour d'un verre : Marc, Pierre, Delphine, Coline, Mathieu, Julie, Joaquim, Adrien, Alex, Thibaud, Valou, Francesco, Jérémie et Malo. Je n'oublie pas mes compagnons de bureau et de labo Vivian et Kévin, pour vos conseils scientifiques mais aussi pour les soirées jeux, la petite musique d'ambiance au bureau (comment dire..., nulle) et les blind-tests !

Je ne pourrai pas finir mes remerciements dijonnais sans dire un grand merci à mes loustics préférés sans qui ces années auraient été bien moins agréables : Jojo, et la dream team (Léa, Anne et Garance).

Jojo merci pour ton sens de l'humour et tes blagues lourdes mais qu'on adore, ta joie de vivre, ton goût pour la bouffe mais aussi tout simplement pour ton grand cœur.

Léa, mon petit coup de cœur, merci pour tous ces excellents moments passés à tes côtés, que ce soit lors d'une réparation de vélo ou de voiture, lors d'une randonnée ou d'un jogging, lors des soirées, sur des chansons Disney ou à toutes les pauses déjeuner. J'ai même fini par apprécier quand tu boudais ! Bref le duo de princesses parisiennes quoi ;)

Anne, merci de m'avoir supportée pendant ces trois ans, c'était pas gagné mais tu as tenu le coup ! Je suis même sûre que tu y as pris goût et que toutes mes petites blagues vont te manquer, surtout le 1<sup>er</sup> avril. Merci pour tes conseils sécurité au labo (promis je ferai un effort), merci pour les indénombrables randonnées, les sorties shopping, ton goût pour les Disney et toutes les soirées passées ensemble.

Garance, ma compère de bureau et de paillasse. Pendant ces trois ans on a pu partager notre passion pour l'aquarelle, pour la (bonne) musique et pour le chant. J'espère que tu n'arrêteras pas de faire résonner ta voix dans ton prochain labo. On a su tirer profit de chaque situation pour passer de bons moments, dans la joie et la folie mais aussi parfois dans l'énervement (merci au fameux punchingball). Je suis bien évidemment obligée de mentionner ta maladresse qui m'a souvent fait peur mais aussi beaucoup amusée, pas moins que tes expressions n'ayant ni queue ni tête ;) Alors merci pour cette folie que tu as et surtout garde le sourire, ça te va si bien !

J'en ai fini avec les remerciements des dijonnais (pas tous si dijonnais d'ailleurs).

Merci à tous mes copains parisiens pour votre soutien et votre présence lors de mes retours en terre natale. Merci aussi à Lou, d'avoir toujours été là malgré la distance. On l'aura fait !

Je remercie aussi ma famille : Papa, Maman, Nanou et Noé pour votre soutien et la fierté à mon égard que je peux voir dans vos yeux. Merci d'avoir écouté toutes mes histoires lors de mes retours pour des weekends souvent trop courts. Je ne le dis pas assez souvent mais c'est l'occasion alors merci pour tout.

Enfin, Robin, cette rencontre inattendue. Merci à toi pour tout ce que tu m'apportes au quotidien et merci d'avoir embelli cette période de rédaction grâce à ton sourire, ton soutien, tes encouragements et ta présence. Merci pour tout.

## Financements

Ces travaux ont été partiellement financés par l'Agence nationale de la recherche (ANR) dans le cadre des programmes français Investissements d'Avenir Equipex (IMAPPI, ANR-10-EQPX-05-01), France Life Imaging (FluoNTEP, ANR-11-INBS-0006) et AAP Générique 2017 (ZINELABEL, ANR-17-CE18-0016-01). Ce travail a également été soutenu par le CNRS et l'Université de Bourgogne. Ces travaux s'inscrivent dans le cadre du projet Pharmaco-imagerie et agents théranostiques financé par le Conseil Régional de Bourgogne Franche-Comté à travers le Plan d'Action Régional pour l'Innovation (PARI) et par l'Union Européenne à travers le programme PO FEDER-FSE 2014/2020 Bourgogne.







# Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>- 5 -</b>
<b>Financements</b> .....	<b>- 9 -</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>- 11 -</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>- 17 -</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	<b>- 21 -</b>
<b>I. Le cancer</b> .....	<b>- 25 -</b>
<b>I.1. Généralités</b> .....	<b>- 25 -</b>
<b>I.2. Différentes étapes du diagnostic</b> .....	<b>- 27 -</b>
<b>I.3. Différentes thérapies possibles</b> .....	<b>- 28 -</b>
I.3.1. Chirurgie.....	- 28 -
I.3.2. Chimiothérapie.....	- 28 -
I.3.3. Radiothérapie.....	- 29 -
I.3.4. Hormonothérapie.....	- 29 -
I.3.5. Immunothérapie.....	- 29 -
<b>II. L'imagerie médicale</b> .....	<b>- 30 -</b>
<b>II.1. Imagerie structurale</b> .....	<b>- 31 -</b>
II.1.1. Radiographie .....	- 31 -
II.1.2. Tomodensitométrie .....	- 32 -
II.1.3. Imagerie par résonance magnétique.....	- 33 -
II.1.4. Échographie.....	- 34 -
<b>II.2. Imagerie moléculaire</b> .....	<b>- 35 -</b>
II.2.1. Imagerie nucléaire .....	- 36 -
II.2.2. Imagerie optique .....	- 44 -
<b>II.3. Imagerie multimodale</b> .....	<b>- 51 -</b>
II.3.1. Combinaison de l'imagerie fonctionnelle et structurale .....	- 53 -
II.3.2. Combinaison de modalités d'imagerie fonctionnelle .....	- 54 -
II.3.3. Théranostique .....	- 55 -
<b>III. Ciblage</b> .....	<b>- 57 -</b>
<b>III.1. Les radiopharmaceutiques</b> .....	<b>- 59 -</b>
<b>III.2. Ciblage passif</b> .....	<b>- 61 -</b>
III.2.1. Effet EPR.....	- 61 -
III.2.2. Types de vecteurs .....	- 62 -
<b>III.3. Ciblage actif</b> .....	<b>- 63 -</b>
III.3.1. Types de cibles.....	- 63 -
III.3.2. Types de vecteurs .....	- 66 -
<b>III.4. Agonistes et antagonistes</b> .....	<b>- 71 -</b>
<b>IV. Optimisation des sondes d'imagerie</b> .....	<b>- 72 -</b>
<b>V. Projets de recherche</b> .....	<b>- 73 -</b>
<b>Références</b> .....	<b>- 75 -</b>
<b>CHAPITRE 1 - Développement et optimisation d'un agent bimodal pour le diagnostic et la chirurgie guidée par fluorescence de l'adénocarcinome pancréatique</b> .....	<b>- 91 -</b>

<b>I. Introduction</b>	<b>- 95 -</b>
<b>I.1. Cancer du pancréas</b>	<b>- 95 -</b>
I.1.1. Épidémiologie	- 95 -
I.1.2. Physiopathologie	- 96 -
I.1.3. Diagnostic et thérapie	- 97 -
<b>I.2. Neurotensine</b>	<b>- 101 -</b>
I.2.1. La neurotensine et ses récepteurs	- 101 -
I.2.2. Rôle physiologique	- 103 -
I.2.3. Rôle dans les cancers	- 104 -
<b>I.3. Présentation du projet</b>	<b>- 105 -</b>
<b>I.4. État de l'art</b>	<b>- 107 -</b>
I.4.1. Développement d'analogues de la neurotensine	- 107 -
I.4.2. Développement d'analogues marqués de la neurotensine	- 108 -
<b>II. Résultats et discussion</b>	<b>- 111 -</b>
<b>II.1. Design des agents d'imagerie</b>	<b>- 111 -</b>
II.1.1. Choix du vecteur	- 111 -
II.1.2. Choix du radioélément et de l'agent chélatant	- 112 -
II.1.3. Choix de la sonde fluorescente	- 114 -
II.1.4. Choix de l'espaceur	- 114 -
<b>II.2. Synthèse et caractérisation</b>	<b>- 115 -</b>
II.2.1. Synthèse des ligands	- 115 -
II.2.2. Propriétés spectrales	- 117 -
<b>II.3. Évaluation <i>in vitro</i></b>	<b>- 117 -</b>
II.3.1. Métallation au <sup>nat</sup> Ga et évaluation de la stabilité	- 117 -
II.3.2. Détermination des constantes d'inhibition ( $K_i$ )	- 119 -
II.3.3. Radiomarquage	- 119 -
II.3.4. Mesure du caractère hydrophile (LogD)	- 121 -
<b>II.4. Évaluation <i>in vivo</i> par imagerie TEP</b>	<b>- 121 -</b>
II.4.1. Évaluation des propriétés pharmacocinétiques sur souris saines	- 121 -
II.4.2. Évaluation de la biodistribution sur souris xénotreffées	- 122 -
<b>II.5. Évaluation des propriétés de fluorescence</b>	<b>- 124 -</b>
<b>III. Conclusion et perspectives</b>	<b>- 126 -</b>
<b>Références</b>	<b>- 128 -</b>
<b>CHAPITRE 2 - Développement et optimisation d'un radiotraceur TEP antagoniste des récepteurs NTS<sub>1</sub></b>	<b>- 143 -</b>
<b>I. Introduction</b>	<b>- 147 -</b>
<b>I.1. NTS<sub>1</sub> et antagonistes</b>	<b>- 147 -</b>
I.1.1. Découverte et développement d'antagonistes des NTS <sub>1</sub>	- 147 -
I.1.2. Avantages des petites molécules antagonistes	- 148 -
<b>I.2. État de l'art</b>	<b>- 149 -</b>
<b>I.3. Importance du choix de l'agent chélatant</b>	<b>- 152 -</b>
<b>I.4. Présentation du projet</b>	<b>- 155 -</b>
<b>II. Résultats et discussion</b>	<b>- 156 -</b>
<b>II.1. Design des molécules</b>	<b>- 156 -</b>
II.1.1. Groupement polyamine	- 156 -
II.1.2. Choix des agents chélatants	- 156 -
II.1.3. Synthèse et caractérisation	- 162 -
<b>II.2. Tests <i>in vitro</i></b>	<b>- 168 -</b>

II.2.1. Métallation au <sup>nat</sup> Ga.....	- 168 -
II.2.2. Évaluation de la stabilité.....	- 169 -
II.2.3. Détermination des constantes d'inhibition ( $K_i$ ).....	- 170 -
II.2.4. Radiomarquage.....	- 170 -
II.2.5. Mesure du caractère hydrophile (LogD).....	- 178 -
<b>II.3. Évaluation des propriétés pharmacocinétiques des différents agents d'imagerie.....</b>	<b>- 179 -</b>
<b>III. Conclusion et perspectives.....</b>	<b>- 183 -</b>
<b>Références.....</b>	<b>- 185 -</b>
<b>CHAPITRE 3 - Modification site-spécifique d'un fragment d'anticorps pour le diagnostic et la thérapie de cancers exprimant le récepteur à l'EGF.....</b>	<b>- 193 -</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>- 197 -</b>
<b>I.1. Récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR).....</b>	<b>- 197 -</b>
I.1.1. Rôle physiologique.....	- 197 -
I.1.2. Rôle dans les cancers.....	- 198 -
I.1.3. Thérapie ciblée des récepteurs EGFR.....	- 198 -
I.1.4. Imagerie nucléaire des récepteurs EGFR.....	- 199 -
<b>I.2. Différentes techniques de bioconjugaison.....</b>	<b>- 202 -</b>
I.2.1. Modifications aléatoires.....	- 203 -
I.2.2. Modifications site-spécifiques.....	- 205 -
I.2.3. Réactions bioorthogonales et de chimie <i>click</i> .....	- 209 -
I.2.4. Double modification des protéines.....	- 213 -
<b>I.3. Présentation du projet.....</b>	<b>- 215 -</b>
<b>II. Résultats et discussion.....</b>	<b>- 216 -</b>
<b>II.1. Design du conjugué.....</b>	<b>- 216 -</b>
II.1.1. Choix de l'agent chélatant et du radionucléide.....	- 216 -
II.1.2. Choix de la sonde pour la thérapie photodynamique.....	- 217 -
II.1.3. Choix du vecteur.....	- 218 -
II.1.4. Stratégie de conjugaison pour la double modification site-spécifique du V <sub>H</sub> H 7D12...-	- 220 -
<b>II.2. Synthèse et caractérisation du V<sub>H</sub>H théranostique.....</b>	<b>- 222 -</b>
II.2.1. Production du V <sub>H</sub> H 7D12.....	- 222 -
II.2.2. Synthèse du V <sub>H</sub> H 7D12-BCN.....	- 223 -
II.2.3. Tests de réactivité.....	- 227 -
II.2.4. Préparation de la sonde bimodale.....	- 230 -
II.2.5. Bioconjugaison.....	- 231 -
II.2.6. Propriétés spectrales.....	- 234 -
<b>II.3. Radiomarquage.....</b>	<b>- 234 -</b>
<b>II.4. Évaluation du conjugué <i>in vitro</i>.....</b>	<b>- 235 -</b>
II.4.1. Affinité et internalisation.....	- 235 -
II.4.2. Évaluation de l'efficacité de la PDT.....	- 236 -
<b>II.5. Évaluation du conjugué <i>in vivo</i>.....</b>	<b>- 238 -</b>
<b>III. Conclusion et perspectives.....</b>	<b>- 239 -</b>
<b>Références.....</b>	<b>- 241 -</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>- 253 -</b>
<b>PARTIE EXPÉRIMENTALE.....</b>	<b>- 259 -</b>
<b>I. Materials and Methods.....</b>	<b>- 263 -</b>
<b>II. Chapter 1 – Experimental part.....</b>	<b>- 266 -</b>

<b>II.1. Synthesis and characterization of DOTA-NT-20.3</b> .....	<b>266 -</b>
II.1.1. Synthesis of NT-20.3 .....	266 -
II.1.2. Synthesis of DOTA-NT-20.3 .....	268 -
<b>II.2. Synthesis and characterization of compound 1 to 7</b> .....	<b>269 -</b>
II.2.1. Synthesis of compounds <b>1a</b> , <b>1b</b> and <b>1c</b> .....	269 -
II.2.2. Synthesis of compounds <b>2a</b> , <b>2b</b> and <b>2c</b> .....	269 -
II.2.3. Synthesis of compound <b>3</b> .....	273 -
II.2.4. Synthesis of compound <b>4</b> .....	274 -
II.2.5. Synthesis of compounds <b>5</b> to <b>7</b> .....	276 -
<b>II.3. Spectral properties of compounds 3 to 7</b> .....	<b>280 -</b>
<b>II.4. Metalation of DOTA-NT-20.3 and peptides with <sup>nat</sup>Ga</b> .....	<b>281 -</b>
<b>II.5. <i>In vitro</i> stability</b> .....	<b>287 -</b>
<b>II.6. <i>In vitro</i> binding affinity</b> .....	<b>290 -</b>
<b>II.7. Radiolabeling of peptides with <sup>68</sup>Ga</b> .....	<b>290 -</b>
<b>II.8. Cell culture and animal models</b> .....	<b>290 -</b>
<b>II.9. Small animal PET imaging and biodistribution studies</b> .....	<b>291 -</b>
<b>II.10. Near-Infrared Fluorescence Imaging</b> .....	<b>292 -</b>
<b>II.11. Fluorescence-Guided Surgery</b> .....	<b>293 -</b>
<b>III. Chapter 2 – Experimental part</b> .....	<b>294 -</b>
<b>III.1. Synthesis and characterization of compound 8 to 20</b> .....	<b>294 -</b>
III.1.1. Synthesis of synthon <b>A</b> .....	294 -
III.1.2. Synthesis of synthon <b>B</b> .....	300 -
III.1.3. Synthesis of synthon <b>C</b> .....	301 -
III.1.4. Synthesis of synthon <b>D</b> .....	304 -
III.1.5. Synthesis of compound <b>20</b> .....	308 -
<b>III.2. Coupling with the chelating agents</b> .....	<b>312 -</b>
III.2.1. Synthesis of compound <b>21 (3BP-228)</b> .....	312 -
III.2.2. Synthesis of compound <b>22</b> .....	313 -
III.2.3. Synthesis of compound <b>23</b> .....	315 -
III.2.4. Synthesis of compound <b>24</b> .....	316 -
III.2.5. Synthesis of compound <b>25</b> .....	318 -
III.2.6. Synthesis of compound <b>27</b> .....	319 -
III.2.7. Synthesis of compound <b>29</b> .....	322 -
<b>III.3. Synthesis of compound 3BP-227</b> .....	<b>326 -</b>
III.3.1. Synthesis of synthon <b>E</b> .....	326 -
III.3.2. Synthesis of 3BP-227.....	327 -
<b>III.4. Metalation of peptides with <sup>nat</sup>Ga</b> .....	<b>333 -</b>
<b>III.5. <i>In vitro</i> stability</b> .....	<b>342 -</b>
<b>III.6. <i>In vitro</i> binding affinity</b> .....	<b>347 -</b>
<b>III.7. Radiolabeling of compounds with <sup>68</sup>Ga</b> .....	<b>347 -</b>
<b>III.8. Small animal PET imaging and biodistribution studies</b> .....	<b>348 -</b>
<b>IV. Chapter 3 – Experimental part</b> .....	<b>352 -</b>
<b>IV.1. Production and characterization of 7D12</b> .....	<b>352 -</b>
<b>IV.2. Synthesis and characterization</b> .....	<b>352 -</b>
IV.2.1. Synthesis of BCN-PEG <sub>2</sub> -maleimide <b>34</b> .....	352 -
IV.2.2. Synthesis of disubstituted tetrazine with amine groups <b>37</b> .....	354 -
IV.2.3. Synthesis of the bimodal probe <b>49</b> .....	356 -
IV.2.4. Synthesis of conjugates <b>35</b> , <b>39</b> , <b>40</b> , <b>42</b> , <b>43</b> .....	361 -
IV.2.5. Synthesis of conjugate DTPA-IRDye700DX-7D12 <b>50</b> .....	367 -
<b>IV.3. Spectral properties of compound IRDye700DX derivatives</b> .....	<b>367 -</b>
<b>IV.4. Stability of DTPA-IRDye700DX-7D12 in radiolabeling-like conditions</b> .....	<b>369 -</b>

IV.5. Radiolabeling of conjugate with <sup>111</sup> In.....	- 369 -
IV.6. Cell culture and animal models.....	- 370 -
IV.7. <i>In vitro</i> binding assay .....	- 370 -
IV.8. <i>In vitro</i> binding and internalization of conjugate.....	- 370 -
IV.9. Singulet oxygen production of conjugate upon illumination .....	- 371 -
IV.10. <i>In vitro</i> photodynamic therapy .....	- 372 -
IV.11. Small animal SPECT imaging and biodistribution studies.....	- 373 -
VALORISATION DES RÉSULTATS .....	- 375 -
ANNEXE 1 .....	- 379 -
ANNEXE 2 .....	- 389 -



## Abréviations

ADC: Antibody-drug conjugate  
ADN: Acide désoxyribonucléique  
AEEAc: 8-amino-3,6-dioxaoctanoic acid  
ARN: Acide ribonucléique  
BCN: Bicyclo[6.1.0]nonyne  
Boc: *tert*-butyloxycarbonyl  
BSA: Bovine serum albumin  
CHO cells: Chinese hamster ovary cells  
CT: Computed tomography  
CV: Column volume  
DIC: *N,N'*-diisopropylcarbodiimide  
DIPEA: *N,N*-diisopropylethylamine  
DMF: *N,N*-dimethylformamide  
DMSO: Dimethyl sulfoxide  
DOL: Degree of labelling  
DOTA: 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid  
DOTAGA: 2-(4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetracyclododecan-1-yl)pentanedioic acid  
DTPA: Diethylenetriaminepentaacetic acid  
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid  
EGFR: Epidermal growth factor receptor  
EPR: Enhanced permeability and retention  
ESI: Electrospray ionization  
FA: Formic acid  
FDA: Food and drug administration  
FDG: Fluorodeoxyglucose  
Fmoc: Fluorenylmethyloxycarbonyl  
FPLC: Fast protein liquid chromatography  
GMP: Good manufacturing practices  
HATU: 1-[bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate  
HEPES: acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique  
HER: Human epidermal growth factor receptor  
HPLC: High-performance liquid chromatography  
HRMS: High-resolution mass spectrometry  
IEDDA: Inverse electron-demand Diels-Alder  
IC<sub>50</sub>: Inhibitory concentration 50  
ICG: Indocyanine green



IRM: Imagerie par résonance magnétique  
iTLC: Instant thin layer chromatography  
LRMS: Low-resolution mass spectrometry  
MALDI-TOF: Matrix-assisted laser desorption ionization - Time of flight  
MES: 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid  
mp: Melting point  
MS: Mass-spectrometry  
NBS: *N*-bromosuccinimide  
NCS: *N*-chlorosuccinimide  
NHS: *N*-hydroxysuccinimide  
NIR: Near-infrared  
NMR: Nuclear magnetic resonance  
NOTA: 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid  
NODAGA: 1,4,7-triazacyclononane,1-glutaric acid-4,7-diacetic acid  
NT: Neurotensine  
NTS: Neurotensin receptor  
PB: Phosphate buffer  
PBS: Phosphate buffer saline  
PDAC: Pancreatic ductal adenocarcinoma  
PDT: Photodynamic therapy  
PEG: Polyethylene glycol  
p.i.: Post-injection  
PIT: Photoimmunotherapy  
PKC: Protéine kinase C  
PLC: Phospholipase C  
ppm: Parts per million  
PRRT: Peptide receptor radionuclide therapy  
PSMA: Prostate specific membrane antigen  
RCPG: Récepteur couplé aux protéines-G  
RMN: Résonance magnétique nucléaire  
ROS: Reactive oxygen species  
RP: Reverse phase  
RT: Room temperature  
RTK: Récepteur à activité tyrosine kinase  
SD: Standard deviation  
SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis  
S<sub>N</sub>Ar: Substitution nucléophile aromatique  
SPPS: Solid phase peptide synthesis  
TCEP: Tris(2-carboxyethyl)phosphine  
TCO: Transcyclooctene  
TDM: Tomodensitométrie

TEAB: Triethylammonium bicarbonate  
TEP: Tomographie par émission de positons  
TEMP: Tomographie par émission monophotonique  
TEA: Tetraethylammonium  
TFA: Trifluoroacetic acid  
THF: Tetrahydrofuran  
THP: Tris(hydroxypyridinone)  
TIC : Total ion chromatogram  
TIPS: Triisopropylsilane  
Tle: *tert*-Leucine  
TLE: Transfert linéique d'énergie  
TSTU: *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(*N*-succinimidyl)uronium tetrafluoroborate  
UV: Ultraviolet



---

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

---



<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>- 21 -</b>
<b>I. Le cancer.....</b>	<b>- 25 -</b>
<b>I.1. Généralités.....</b>	<b>- 25 -</b>
<b>I.2. Différentes étapes du diagnostic.....</b>	<b>- 27 -</b>
<b>I.3. Différentes thérapies possibles.....</b>	<b>- 28 -</b>
I.3.1. Chirurgie.....	- 28 -
I.3.2. Chimiothérapie.....	- 28 -
I.3.3. Radiothérapie.....	- 29 -
I.3.4. Hormonothérapie.....	- 29 -
I.3.5. Immunothérapie.....	- 29 -
<b>II. L'imagerie médicale.....</b>	<b>- 30 -</b>
<b>II.1. Imagerie structurale.....</b>	<b>- 31 -</b>
II.1.1. Radiographie.....	- 31 -
II.1.2. Tomodensitométrie.....	- 32 -
II.1.3. Imagerie par résonance magnétique.....	- 33 -
II.1.4. Échographie.....	- 34 -
<b>II.2. Imagerie moléculaire.....</b>	<b>- 35 -</b>
II.2.1. Imagerie nucléaire.....	- 36 -
II.2.2. Imagerie optique.....	- 44 -
<b>II.3. Imagerie multimodale.....</b>	<b>- 51 -</b>
II.3.1. Combinaison de l'imagerie fonctionnelle et structurale.....	- 53 -
II.3.2. Combinaison de modalités d'imagerie fonctionnelle.....	- 54 -
II.3.3. Théranostique.....	- 55 -
<b>III. Ciblage.....</b>	<b>- 57 -</b>
<b>III.1. Les radiopharmaceutiques.....</b>	<b>- 59 -</b>
<b>III.2. Ciblage passif.....</b>	<b>- 61 -</b>
III.2.1. Effet EPR.....	- 61 -
III.2.2. Types de vecteurs.....	- 62 -
<b>III.3. Ciblage actif.....</b>	<b>- 63 -</b>
III.3.1. Types de cibles.....	- 63 -
III.3.2. Types de vecteurs.....	- 66 -
<b>III.4. Agonistes et antagonistes.....</b>	<b>- 71 -</b>
<b>IV. Optimisation des sondes d'imagerie.....</b>	<b>- 72 -</b>
<b>V. Projets de recherche.....</b>	<b>- 73 -</b>
<b>Références.....</b>	<b>- 75 -</b>



# I. Le cancer

## I.1. Généralités

Le cancer est caractérisé par la prolifération incontrôlée de cellules anormales. Celles-ci peuvent envahir les tissus et organes environnants et former des métastases sur des sites distants.<sup>1</sup> Le cancer est la deuxième cause de décès dans le monde (après les maladies cardiovasculaires) avec 9.6 millions de décès en 2016.<sup>2</sup> Les cancers les plus fréquents sont le cancer du poumon, du sein, du colon, de la prostate et enfin de l'estomac.<sup>2</sup> Environ 38% de la population sera diagnostiquée d'un cancer au cours de sa vie.<sup>3</sup> Les pays les plus touchés sont ceux les moins développés. En effet, seulement 26% des pays à faibles revenus disposent des services nécessaires pour diagnostiquer et traiter le cancer à un stade précoce, et il est bien connu que la détection du cancer à un stade avancé ainsi que le manque de traitements sont des facteurs défavorables à la survie des patients.<sup>1</sup>

Cinq facteurs comportementaux favorisent le développement de cancer : le tabagisme, la consommation d'alcool, le manque d'exercice physique, un indice de masse corporelle élevé et une mauvaise alimentation. Un tiers des décès par cancer est dû à un ou plusieurs de ces facteurs.<sup>4</sup> À cela s'ajoutent les facteurs environnementaux, tels que l'exposition à des rayonnements ionisants, à des produits cancérigènes ou à certains biologiques (virus, bactéries, parasites), ainsi que les causes génétiques. Le vieillissement est probablement le facteur le plus important dans la survenue de cancers, dû à l'accumulation de toute une vie d'exposition à des facteurs pro-oncogènes et à la diminution de l'efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN.

Le cancer est caractérisé par la transformation de cellules normales en des cellules tumorales due à une perte du contrôle physiologique. Trois types de gènes sont responsables de ce changement de comportement. Ceux-ci peuvent subir des mutations qui vont accentuer ou modifier leur rôle.

Parmi eux, les gènes proto-oncogènes vont être activés. Ces gènes sont responsables de la prolifération excessive et de la dédifférenciation des cellules. Au cours du développement, les cellules se différencient, c'est-à-dire qu'elles se spécialisent en différents types cellulaires pour donner naissance aux nombreux tissus nous constituant (cellules nerveuses, épithéliales, sanguines, musculaires, osseuses...). Ceci s'accompagne de nombreux changements tels que des modifications morphologiques, l'acquisition de nouvelles propriétés spécifiques, la perte des capacités à s'auto-renouveler, à se diviser indéfiniment, à migrer, etc. Lors du processus de cancérisation, les cellules vont perdre certains caractères de différenciation cellulaire et retrouver leur capacité de division et de migration.

Les gènes suppresseurs de tumeurs, normalement responsables de la mort cellulaire programmée des cellules, vont conduire à une croissance anarchique après mutation.



Enfin, les gènes réparateurs, responsables de l'intégrité du génome, peuvent devenir inactifs après mutation.

De ce fait, les cellules tumorales ont des caractéristiques biologiques bien différentes des cellules saines. D. Hanahan et R. Weinberg ont recensé plusieurs transformations caractéristiques du processus de cancérisation telles que la modification de certaines voies de signalisation intracellulaire, la variation de l'expression de certains récepteurs cellulaires, la modification du système immunitaire, du métabolisme (consommation en glucose par exemple) et des propriétés physicochimiques du microenvironnement tumoral (zones hypoxiques), ou encore le développement de l'angiogenèse.<sup>5,6</sup> Toutes ces modifications permettent d'échapper aux mécanismes de régulation de la croissance cellulaire et favorisent la survie, la progression et la dissémination des cellules cancéreuses (Figure 1).

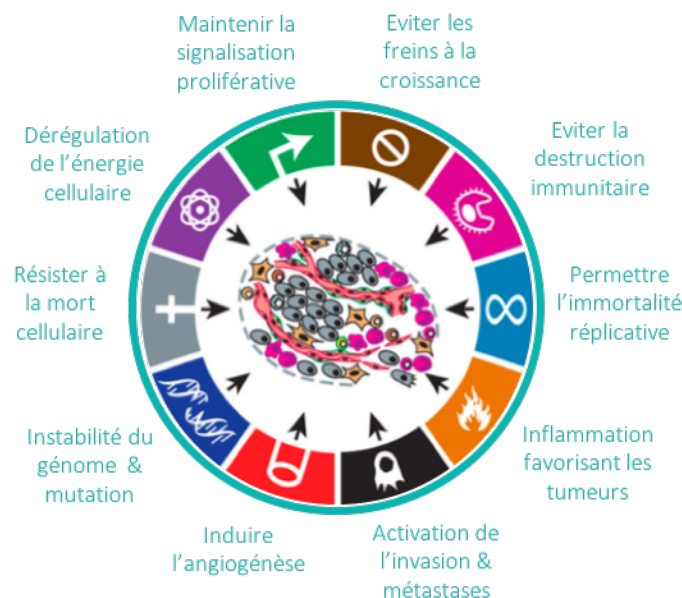


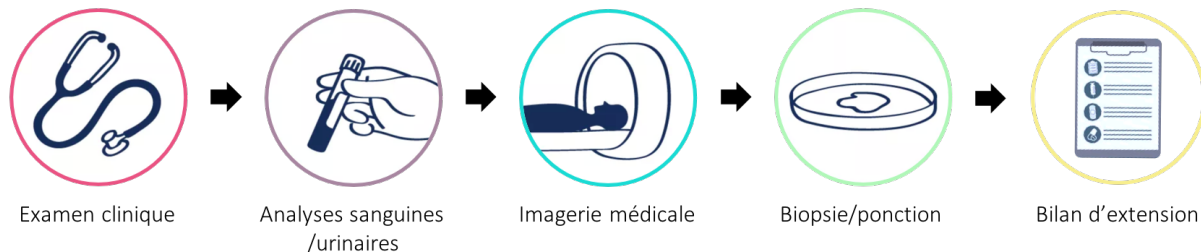
Figure 1. Signes distinctifs du cancer ; figure adaptée d'article.<sup>5</sup>

Ces différences moléculaires sont des cibles potentielles pour le développement de molécules à vocation diagnostique ou thérapeutique. En effet, certaines de ces transformations prennent place précocement dans le développement du cancer et les identifier rapidement permettrait d'améliorer le pronostic vital d'un patient. La nature de ces cibles sera détaillée plus longuement dans la partie III de cette introduction.

Comme dit précédemment, plus le cancer est diagnostiqué précocement, plus la probabilité de survie augmente et plus les traitements sont efficaces. Ces dernières années, des avancées considérables ont été réalisées pour la détection et le traitement de cancers, ce qui, malgré l'augmentation de la population, a permis une diminution du taux de mortalité liée au cancer.<sup>7</sup> Ces points seront abordés dans la partie qui suit.

## I.2. Différentes étapes du diagnostic

L'objectif du diagnostic et du traitement du cancer est de guérir les patients ou, à défaut, de prolonger et d'améliorer leur qualité de vie. Le diagnostic est habituellement réalisé à partir de plusieurs examens cliniques, biologiques et d'imagerie (Figure 2).<sup>8</sup>



**Figure 2.** Différentes étapes du diagnostic du cancer ; figure adaptée d'une page web.<sup>9</sup>

L'examen clinique est souvent conduit par un médecin généraliste et/ou spécialiste qui va examiner le patient. Il permet de diagnostiquer la présence éventuelle de tumeur. Il est en général suivi d'un bilan complet sanguin et/ou urinaire, qui va renseigner le clinicien sur l'état de santé général du patient et permettre aussi de doser des marqueurs tumoraux éventuellement présents. Ces biomarqueurs sont en général des molécules circulantes, bien plus secrétées par les cellules tumorales que par les cellules saines. Les plus courants sont, par exemple, l'antigène carcinoembryonnaire (ACE) produit en quantité abondante lors des cancers du sein, du colon, de la thyroïde, du poumon, du rein, de l'estomac ou des ovaires,<sup>10</sup> l'antigène spécifique de la prostate (PSA) qui permet de détecter le cancer de la prostate,<sup>11</sup> ou encore la calcitonine, caractéristique du cancer de la thyroïde.<sup>12</sup>

L'imagerie médicale permet ensuite aux médecins de confirmer la présence d'une tumeur, sa taille, sa forme et sa localisation exacte, afin de commencer à préparer l'approche thérapeutique. De nombreuses techniques d'imagerie sont disponibles telles que la radiographie, l'échographie, l'imagerie par résonance magnétique ou encore l'imagerie nucléaire. Elles seront décrites dans la partie II de cette introduction.

La biopsie permet ensuite de confirmer le diagnostic et préciser la nature de la lésion cancéreuse. Elle consiste à prélever un échantillon de tissu, à l'analyser par microscopie et à réaliser une caractérisation moléculaire afin de déterminer la nature de la tumeur et orienter l'approche thérapeutique. Le prélèvement de l'échantillon peut se faire par ponction, par endoscopie ou par intervention chirurgicale selon sa localisation.

Enfin, le bilan d'extension permet de préciser l'état d'avancement de la maladie. Il consiste à déterminer l'agressivité de la tumeur et à identifier si elle s'est propagée vers d'autres organes. Pour cela la classification T.N.M est utilisée.<sup>13</sup> Ce système prend en compte l'évolution locale de la tumeur (T1 à T4), son extension aux ganglions lymphatiques voisins

(N0 à N3) et son éventuelle dissémination sous forme de métastases (M0 ou M1). C'est à partir de ce bilan qu'une stratégie thérapeutique adaptée est mise au point.

### I.3. Différentes thérapies possibles

Une proportion importante de cancers peut désormais être guérie, en ayant recours à différents traitements, surtout s'ils sont détectés à un stade précoce. L'objectif de ces traitements est d'éliminer les cellules cancéreuses. Parmi eux on retrouve la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie (externe ou interne), l'hormonothérapie ou encore l'immunothérapie. Ces traitements peuvent être utilisés seuls ou combinés. Ils agissent soit localement (c'est-à-dire principalement sur les cellules tumorales de l'organe touché), c'est le cas de la chirurgie et la radiothérapie externe, soit de façon systémique (c'est-à-dire sur les cellules tumorales présentes dans tout le corps), dans le cas de la chimiothérapie, la radiothérapie interne vectorisée ou l'hormonothérapie.<sup>14-16</sup>

#### I.3.1. Chirurgie

La chirurgie est utilisée dans 80% des cas. C'est en général le premier traitement proposé pour les tumeurs solides. Elle permet d'éliminer la tumeur en prenant soin d'inclure, dans la mesure du possible, des marges chirurgicales suffisamment larges, afin de supprimer d'éventuelles cellules cancéreuses, situées autour de celle-ci, pour éviter une rechute. Cependant, même s'il s'agit du meilleur moyen d'éliminer une tumeur, la chirurgie n'est possible que pour les stades peu avancés, généralement sans métastases.<sup>17</sup> Une des difficultés majeures est la distinction entre les tissus sains et les tissus tumoraux, souvent difficilement visible à l'œil nu.

#### I.3.2. Chimiothérapie

La chimiothérapie consiste à utiliser une substance chimique thérapeutique contre les cellules cancéreuses. Ces médicaments vont permettre soit l'arrêt de la multiplication des cellules cancéreuses, soit leur destruction. De nombreux médicaments anticancéreux sont aujourd'hui disponibles et permettent le traitement des cancers selon différents mécanismes d'action. Plusieurs substances thérapeutiques sont souvent combinées afin d'optimiser leur efficacité. Cette technique permet de toucher les cellules cancéreuses du corps entier, les objectifs étant de réduire la taille d'une tumeur avant opération par exemple, de limiter le risque de récives après la chirurgie ou encore de traiter des zones non atteignables durant l'acte chirurgical. Cependant, deux problèmes majeurs sont observés : le développement d'un phénomène de résistance aux traitements par les cellules cancéreuses et l'importance des effets secondaires. En effet, les cellules saines peuvent aussi être touchées par ces traitements, induisant des effets indésirables tels que la fatigue, les douleurs, la perte des cheveux, les nausées et les troubles cardiaques par exemple.<sup>18</sup>

### I.3.3. Radiothérapie

La radiothérapie est la technique de thérapie cytotoxique la plus efficace pour le traitement de cancers solides localisés. Elle est donc utilisée chez plus de 60% des patients. Elle consiste à exposer les cellules cancéreuses à des rayonnements qui vont stopper la croissance des cellules ou induire leur mort. En effet, ces rayons vont provoquer, directement ou indirectement après radiolyse de l'eau, des dommages à l'ADN tels que des cassures simples brins ou doubles brins, la formation de sites abasiques ou encore des pontages inter- ou intra-brin.<sup>19</sup> Plus les dommages sont importants, plus ils sont difficiles à réparer par la cellule et donc meilleure est l'efficacité du traitement. L'objectif est de détruire un maximum de cellules cancéreuses sans toucher les cellules saines. Comme la chimiothérapie, ce traitement peut s'effectuer en complément, avant ou après la chirurgie.

Il existe deux formes de radiothérapie. La radiothérapie externe consiste à irradier la zone tumorale grâce à un dispositif qui émet des rayonnements ionisants, situé à l'extérieur du corps du patient. Cela nécessite au préalable une délimitation précise de la zone à irradier pour minimiser les effets indésirables. La radiothérapie interne vectorisée consiste à utiliser un radiopharmaceutique émettant des particules cytotoxiques telles que les particules  $\alpha$ , les particules  $\beta^-$  et les électrons Auger.<sup>20</sup> Elles seront présentées en détail dans la partie II de cette introduction. L'iode-131 est par exemple connu pour son émission de particules  $\beta^-$  cytotoxiques. Son accumulation préférentielle au niveau de la thyroïde permet le traitement du cancer thyroïdien.<sup>21</sup> Lorsque le radionucléide est attaché à un anticorps pour cibler spécifiquement les cellules cancéreuses, on parle alors de radioimmunothérapie. Par exemple, le Zevalin® (ibritumomab tiuxétan) est un anticorps monoclonal marqué à l'yttrium-90 pour le traitement du lymphome non-hodgkinien par radioimmunothérapie.<sup>22</sup>

### I.3.4. Hormonothérapie

L'hormonothérapie est aussi un traitement basé sur la prise d'un médicament. Ce traitement est utilisé pour les cancers hormono-dépendants tels que les cancers de la thyroïde, du sein ou de la prostate.<sup>23,24</sup> L'objectif est ici d'utiliser un médicament capable de bloquer la production ou l'activité hormonale responsables de la stimulation des cellules cancéreuses. L'hormonothérapie peut donc réduire la croissance des cellules tumorales mais pas les tuer.

### I.3.5. Immunothérapie

L'immunothérapie est une technique récente qui consiste à stimuler les défenses immunitaires du patient pour attaquer et détruire les cellules cancéreuses.<sup>25</sup> Pour cela, le médicament utilisé cible soit les cellules tumorales, soit les cellules immunitaires. De très bons résultats ont été obtenus pour le traitement du mélanome métastatique, du cancer du poumon non à petites cellules, et les cancers du rein.<sup>26</sup>

Ces dernières années, de nouvelles approches thérapeutiques ont été mises en place afin d'adapter au mieux le traitement donné à chaque patient. On parle désormais de « médecine personnalisée ». En effet, tous les patients sont différents et il existe une grande diversité de cancers, présentant chacun une « signature moléculaire » spécifique et ne répondant pas forcément de la même façon à un traitement donné. Il paraît donc logique d'utiliser une thérapie adaptée à chaque cancer, la thérapie ciblée.<sup>27</sup>

Le développement d'outils pour le diagnostic et la thérapie du cancer est devenu le domaine de recherche principal des entreprises pharmaceutiques afin de permettre, dans l'avenir, une médecine personnalisée propre à chaque cancer et à chaque patient.

## II. L'imagerie médicale

L'imagerie moléculaire est une technique permettant la caractérisation de processus biochimiques aux niveaux cellulaire et moléculaire chez le vivant. Elle aide à la compréhension des phénomènes biologiques et des réactions impliquées dans différents processus physiologiques et pathologiques à l'échelle nanoscopique (études *in vitro* des cellules). Elle peut aussi être combinée à l'imagerie anatomique. On parle d'imagerie médicale lorsqu'elle s'applique à l'Homme. Cet outil non invasif permet de reconstituer des images en deux ou trois dimensions et peut être utilisé à différentes fins. En permettant la visualisation d'un changement caractéristique au niveau moléculaire, elle est très utilisée pour le diagnostic rapide et précis des patients, la stadification (en évaluant la présence ou non de métastases), le suivi des thérapies (en évaluant de façon précoce la réponse ou la résistance à un traitement), ainsi que la détection de récurrence de nombreuses maladies. L'oncologie, la neurologie et la cardiologie sont les trois spécialités médicales ayant le plus recours à l'imagerie médicale.<sup>28</sup> Enfin, l'imagerie médicale est aussi utilisée pour le développement de nouveaux médicaments et l'optimisation de stratégies thérapeutiques.<sup>29,30</sup>

De nombreuses techniques d'imagerie sont disponibles pour les études précliniques et cliniques. Parmi les plus utilisées, on compte l'imagerie par rayons X, l'échographie, l'imagerie par résonance magnétique, l'imagerie nucléaire et l'imagerie optique.<sup>28,31-33</sup>

Selon l'application souhaitée, il est important de bien choisir la technique d'imagerie appropriée. En effet, les modalités d'imagerie diffèrent par le matériel utilisé et leurs propriétés : sensibilité, précision, résolution spatiale et temporelle, pénétration des tissus, quantification, temps d'acquisition et coût (Tableau 1). Un autre paramètre important est la toxicité induite par certaines techniques, due à l'utilisation de rayonnements ionisants.

**Tableau 1.** Caractéristiques des principales techniques d'imagerie ; tableau adapté de revue.<sup>28</sup>

Modalité	Détection	Résolution spatiale	Temps d'acquisition	Pénétration des tissus	Sensibilité	Prix	Profil sécurité
Scanner	Rayons X	50-200 $\mu\text{m}$ (préclinique) 0.5-1 mm (clinique)	min	Pas de limite	-	\$\$	Rayonnements ionisants
IRM	Ondes radio	25-100 $\mu\text{m}$ (préclinique) 1 mm (clinique)	min à h	Pas de limite	$10^{-3}$ à $10^{-5}$ M	\$\$\$	Bonne mais dépend de l'agent de contraste
TEP	Photons d'annihilation	1-2 mm (préclinique) 5-7 mm (clinique)	min	Pas de limite	$10^{-11}$ à $10^{-12}$ M	\$\$\$	Rayonnements ionisants
TEMP	Photons $\gamma$	1-2 mm (préclinique) 8-10 mm (clinique)	min	Pas de limite	$10^{-10}$ à $10^{-11}$ M	\$\$	Rayonnements ionisants
Échographie	Ondes sonores	0.1-2 mm	sec	mm-cm	$10^{-12}$ M (avec microbulles)	\$	Bonne
Optique	Visible et infrarouge	2-3 mm	sec	< 1 cm	$10^{-9}$ à $10^{-12}$ M	\$	Dépend du fluorophore

Certaines techniques nécessitent l'injection de molécules pour réaliser l'imagerie. Deux types de molécules peuvent être injectées. Les agents de contraste améliorent la qualité des images tandis que l'utilisation d'agents d'imagerie moléculaire permet d'imager de façon spécifique un comportement moléculaire propre à une maladie. La quantité de molécule injectée diffère selon la modalité d'imagerie. Il est nécessaire de trouver le bon compromis pour avoir une bonne qualité d'image tout en limitant les effets toxiques.

Il existe deux principaux types d'imagerie : l'imagerie structurale et l'imagerie fonctionnelle.

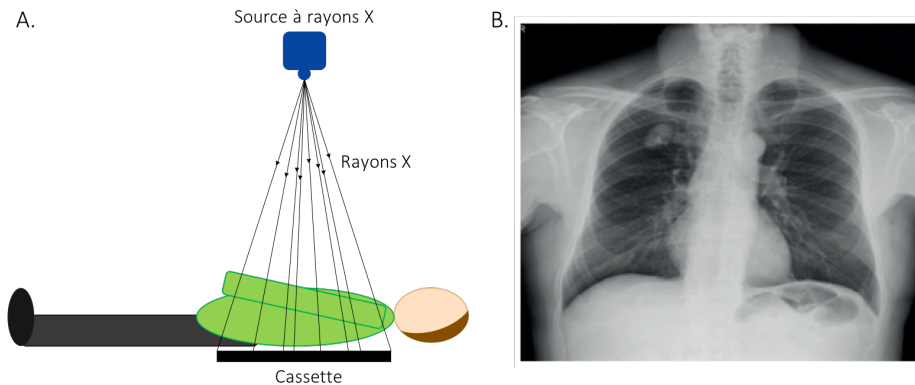
## II.1. Imagerie structurale

L'imagerie structurale, aussi appelée imagerie anatomique, apporte des informations morphologiques sur l'emplacement d'un organe/tissu, sa structure, sa forme et parfois son contenu (structures osseuses, calculs vésicaux, densité aérienne, hydrique, graisseuse). Parmi ces outils, on retrouve la radiographie, la tomodensitométrie, l'imagerie par résonance magnétique et l'échographie.

### II.1.1. Radiographie

La radiographie est une technique utilisant les rayons X. Les rayons X sont générés dans un tube à rayons. Ils sont ensuite envoyés sur une zone précise d'un patient puis recueillis sur un détecteur de radiation (cassette) (Figure 3A). En traversant le corps humain, les rayons vont être atténués selon l'épaisseur de la zone à traverser et la capacité des différents tissus à atténuer les rayons, ce qui conduira au contraste observé sur l'image. L'air n'absorbe pas du tout les rayons X et apparaîtra donc en noir sur une image. En revanche, les os sont les tissus qui absorbent le plus les rayons X et apparaîtront donc en blanc sur une image.<sup>28,31</sup> Les informations recueillies vont permettre la reconstruction d'images bidimensionnelles (Figure 3B).<sup>34</sup> Cette technique est principalement utilisée en orthopédie, rhumatologie ou

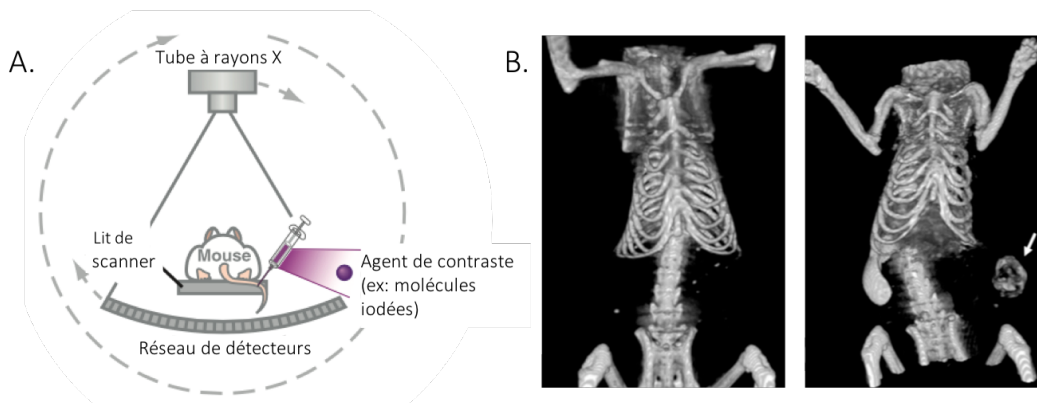
orthodontie afin de diagnostiquer des traumatismes au niveau osseux ou articulaire ainsi que l'implantation des dents. Elle est aussi utilisée en oncologie pour la radiographie des poumons ou la mammographie. Les tissus « pleins » sont plus visibles que les tissus « creux » par cette technique mais l'injection d'agents de contrastes opaques permet leur visualisation.



**Figure 3.** A. Principe de la radiographie ; B. Image obtenue par radiographie des poumons, figure extraite d'article.<sup>35</sup>

### II.1.2. Tomodensitométrie

La tomodensitométrie (TDM), aussi communément appelée scanner (CT), est une autre technique d'imagerie reposant sur la détection des rayons X, ionisants. Des générateurs électriques produisent un faisceau de rayons X couvrant la largeur du patient. En face de cette source de rayons X se trouvent un grand nombre de détecteurs qui, en tournant autour du sujet, permettront la reconstruction d'images (Figure 4A). En effet, en mesurant l'atténuation des rayons X, une image anatomique en trois dimensions va pouvoir être reconstruite (Figure 4B).<sup>28,31</sup>



**Figure 4.** A. Principe de la tomodensitométrie, figure adaptée de revue ;<sup>28</sup> B. Images obtenues par tomodensitométrie d'un rat présentant une tumeur du sein, xénogreffée sur le flanc, sans agent de contraste (gauche) et 3 jours après l'injection d'un agent de contraste iodé (droite) ; figure extraite d'article.<sup>36</sup>

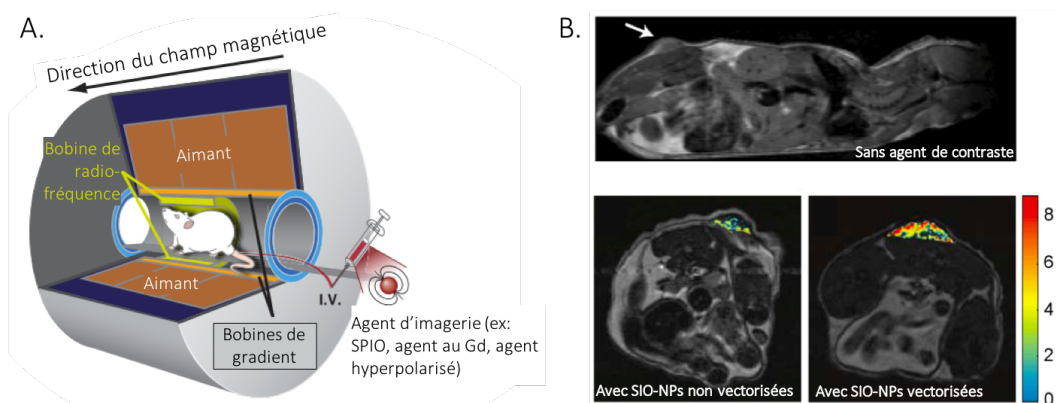
Cette technique d'imagerie permet des acquisitions simples et rapides et une bonne résolution spatiale (0.05 à 0.2 mm en préclinique et 0.5 à 1.0 mm en clinique) à un coût relativement faible. De plus, cette technique est largement disponible et la pénétration des



tissus n'est pas un problème du fait de la forte énergie des rayons X utilisés. En revanche, bien que de nombreux progrès aient été réalisés, la toxicité des rayons X est la limite principale de cette technique. Pour améliorer la qualité de l'image, il est possible d'injecter des agents de contraste de masse atomique élevée de type : nanoparticules, molécules iodées, lanthanides,<sup>36</sup> molécules à base d'or,<sup>37</sup> de bismuth,<sup>38</sup> d'oxyde de tantale,<sup>39</sup> de baryum ou de platine, mais à nouveaux ceux-ci peuvent induire une certaine toxicité s'ils sont injectés à des concentrations trop élevées.<sup>36</sup> Le scanner est la technique d'imagerie anatomique la plus employée chez l'homme. Ces dernières années il a été utilisé pour la détection de nombreuses pathologies telles que le cancer, les lésions cérébrales, l'ischémie, l'embolie pulmonaire et bien d'autres.

### II.1.3. Imagerie par résonance magnétique

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est basée sur les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques. Elle permet de visualiser la structure interne et la morphologie des tissus mous. Pour cette modalité, le patient est placé au centre d'un électroaimant supraconducteur qui va générer un champ magnétique. Les atomes possédant un moment magnétique de spin vont se polariser (s'aligner de façon parallèle ou antiparallèle au champ). L'appareil d'IRM contient des bobines de gradient qui produisent des variations du champ magnétique dans les trois directions tandis que des bobines radiofréquences génèrent des impulsions. Après irradiation, les noyaux vont revenir à leur état initial de deux façons possibles (Figure 5A). On parle de relaxation longitudinale ou relaxation transversale. Selon leur environnement physicochimique, les noyaux n'auront pas les mêmes temps de relaxation et c'est ce signal qui pourra être reconstruit sous forme d'image.<sup>28,31</sup>



**Figure 5.** A. Principe de l'imagerie par résonance magnétique, figure adaptée de revue ;<sup>28</sup> B. Images obtenues par IRM d'une souris présentant un gliome sans agent de contraste, en coupe sagittale (haut), avec agent de contraste nanoparticule d'oxyde de fer superparamagnétique (SPIO) non vectorisé 3 h p.i., en coupe axiale (bas gauche) et avec agent de contraste SPIO vectorisé 3 h p.i., en coupe axiale (bas droite) ; figure extraite d'article.<sup>40</sup>

Les atomes d'hydrogène sont magnétiquement actifs tandis que pour la plupart des autres atomes, seule une très faible proportion l'est (par exemple, l'isotope <sup>13</sup>C représente



seulement 1% du carbone naturel). L'hydrogène étant très répandu dans le corps (63% du corps est constitué d'eau ou de graisse, très riche en hydrogène), c'est le noyau le plus utilisé pour obtenir les images.<sup>31</sup> Contrairement au scanner, plus un tissu est mou, plus il contient d'eau et donc meilleure est la résolution. Il est aussi possible d'utiliser des atomes paramagnétiques tels que le phosphore-31,<sup>41</sup> le carbone-13,<sup>42</sup> le sodium-23,<sup>43</sup> le fluor-19,<sup>44</sup> et l'oxygène-17.<sup>45</sup>

L'injection d'agents de contraste IRM permet de perturber le champ magnétique local ce qui va jouer sur les temps de relaxation longitudinaux T1 ou transversaux T2 et donc améliorer le contraste.<sup>46,47</sup> Parmi eux, les agents de contraste au gadolinium sont les plus répandus.<sup>48-50</sup> Les molécules contenant du gadolinium vont diminuer le T1 en augmentant la vitesse de relaxation des protons, ce qui conduit à des zones plus claires sur les images. On parle d'agents de contraste positifs. Un autre agent de contraste utilisé est les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIO) (Figure 5B).<sup>40,51,52</sup> Les SPIO vont diminuer le T2 et conduire à des zones plus foncées sur les images. Ils sont appelés agents de contraste négatifs. Ces différentes méthodes permettent de visualiser les microvascularisations tumorales, le réseau lymphatique ainsi que les inflammations.

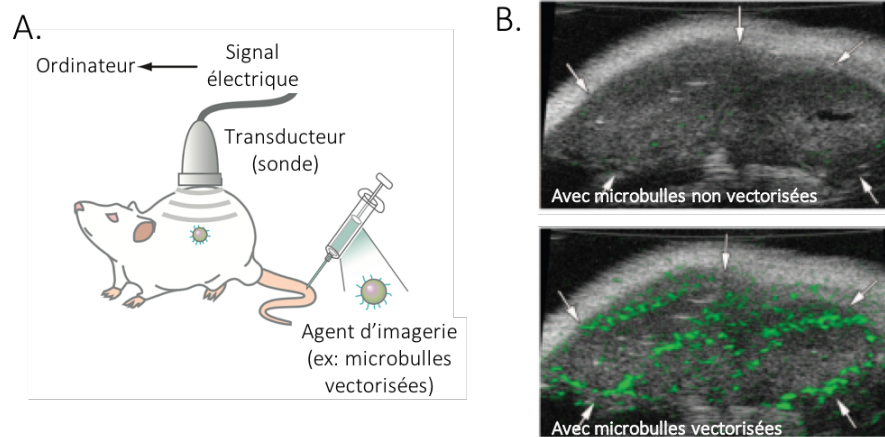
L'injection d'agents de contraste non spécifiques fournit seulement des informations structurales. En revanche, de nombreuses équipes s'intéressent à l'utilisation d'agents de contraste ciblés qui permettent d'obtenir des informations sur des événements biochimiques.

Les principaux avantages de l'IRM sont l'absence de rayonnements ionisants ainsi qu'une excellente résolution spatiale (quelques  $\mu\text{m}$  en préclinique à 1 mm en clinique). De plus, la pénétration des tissus est illimitée et l'utilisation d'agents de contraste permet d'obtenir des informations au niveau moléculaire. En revanche, l'IRM souffre d'une faible sensibilité. En effet, avec une sensibilité de  $10^{-3}$  à  $10^{-5}$  M, les temps d'acquisition sont longs et l'utilisation de quantités importantes d'agent de contraste est nécessaire pour l'obtention d'images de qualité alors que ceux-ci peuvent être toxiques.<sup>53</sup> Malgré sa faible sensibilité, cette technique est très largement utilisée en clinique, principalement pour son excellente résolution spatiale ainsi que les très bons contrastes obtenus pour les tissus mous.

#### II.1.4. Échographie

L'échographie est une technique d'imagerie basée sur la réflexion des ultrasons. Pour cela, une sonde, aussi appelée transducteur, convertit un signal électrique en ondes sonores qui vont pénétrer dans le corps et être réfléchies par les différents tissus biologiques traversés. La sonde détecte les ultrasons renvoyés et les convertit en signaux électriques. Enfin, ces signaux sont analysés et traités afin de construire des images morphologiques bidimensionnelles (Figure 6A). En effet, la distance, l'intensité ainsi que la direction des ondes sonores par rapport à la sonde sont calculées et permettent la retranscription en image.<sup>28,31</sup>

Afin d'améliorer le rapport signal sur bruit-de-fond, il est possible d'injecter des microbulles d'air, de l'ordre du micromètre, enrobées d'une couche de lipides ou de polymères (Figure 6B).<sup>54,55</sup> Ce procédé est efficace mais ne permet pas d'obtenir des informations moléculaires. En revanche, en y associant un vecteur de ciblage, il est possible d'observer des processus tels que l'angiogenèse ou l'inflammation.<sup>56,57,58</sup>



**Figure 6.** A. Principe de l'imagerie par ultrasons, figure adaptée de revue ;<sup>28</sup> B. Images obtenues par ultrasons d'une souris présentant un gliome 5 min après l'injection de microbulles d'air non vectorisées (haut) et de microbulles d'air vectorisées (bas) ; figure extraite d'article.<sup>56</sup>

La résolution est moyenne mais elle peut être améliorée en augmentant les fréquences des ondes sonores. Cependant, ceci se traduit par des longueurs d'onde plus courtes et donc une limitation de la pénétration des tissus. Les principaux avantages de l'imagerie ultrasonore sont la disponibilité, le faible coût et la portabilité du dispositif d'échographie. De plus, cette technique ne présente pas de problème de toxicité et l'injection de microbulles d'air permet d'obtenir une bonne sensibilité ( $10^{-12}$  M). En revanche cet outil ne permet, principalement, que d'obtenir des informations morphologiques bidimensionnelles en détectant seulement les tissus mous. Cette technique est très utilisée en obstétrique et, couplée au doppler, en imagerie vasculaire. Sa faible utilisation en oncologie est due à sa résolution, la difficulté d'interprétation des images, ainsi que sa limite de pénétrabilité. Elle connaîtra probablement dans les années à venir de gros progrès.

## II.2. Imagerie moléculaire

L'imagerie fonctionnelle, aussi appelée imagerie moléculaire, procure des informations sur les fonctions biochimiques et physiologiques au niveau moléculaire, à l'échelle d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe. Parmi ces outils, on retrouve essentiellement l'imagerie nucléaire et l'imagerie optique.

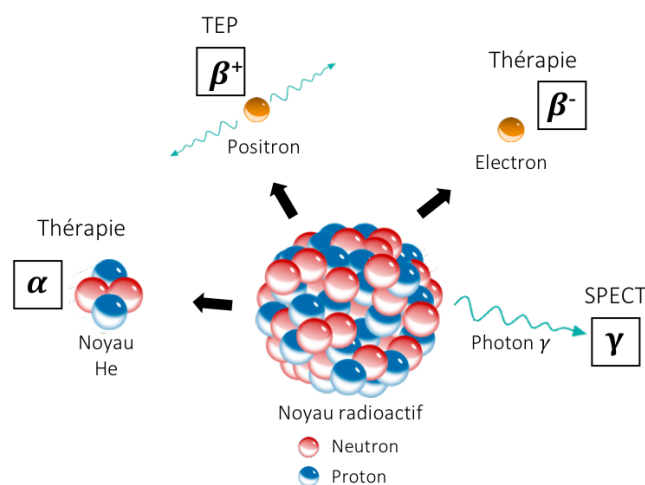
## II.2.1. Imagerie nucléaire

### Bref historique

Irène Curie et son mari Frédéric Joliot ont découvert, dans les années 1930, la radioactivité artificielle.<sup>59</sup> Cette découverte, qui fut suivie, en 1932, de la construction du premier cyclotron par Ernest Lawrence, a ouvert la porte vers la production de nombreux radionucléides issus de quasiment tous les éléments du tableau périodique.<sup>60</sup> Cette avancée a permis aux chercheurs de concevoir des radiotraceurs pour l'étude de processus biochimiques. Les frères Lawrence ont, pour la première fois, utilisé le phosphore-32 pour le traitement d'un patient atteint de leucémie.<sup>61</sup> Werner a découvert en 1948 que l'iode-131 s'accumulait de façon spécifique dans la thyroïde et qu'il pouvait être détecté et quantifié par un compteur Geiger.<sup>62</sup> À cette découverte a suivi l'invention de la gamma caméra par Hal Anger en 1958, établissant ainsi le réel début de l'ère de la médecine nucléaire.<sup>63</sup> En 1968, Wagner a défini la médecine nucléaire comme étant une discipline basée sur l'utilisation de matériaux radioactifs pour l'étude, le diagnostic et la thérapie de maladies.

### Radioactivité

La radioactivité est un phénomène physique par lequel un radionucléide (atome instable) va se transformer en une autre entité (stable ou instable) en émettant des particules de matière (électrons, neutrons, hélium) et de l'énergie (photons et énergie cinétique). La radioactivité se mesure en Becquerel (Bq), correspondant au nombre de désintégrations par seconde d'un atome. On appelle période radioactive ou temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) le temps au bout duquel la moitié des noyaux radioactifs d'un échantillon s'est transformée en un autre nucléide. En se désintégrant, un noyau radioactif peut produire différents types de rayonnements ionisants : les émissions alpha ( $\alpha$ ), bêta + ( $\beta^+$ ), bêta - ( $\beta^-$ ), gamma ( $\gamma$ ) et les électrons Auger (Figure 7). Ceux-ci diffèrent par leur énergie, leur rayon d'action, et la nature de l'émission.



**Figure 7.** Représentation schématique des modes de désintégration d'un noyau radioactif.

L'émission  $\alpha$  est caractérisée par le relargage d'un atome d'hélium (deux protons et deux neutrons). Ces particules ont un rayon d'action très court avec une pénétration des tissus de moins de 100  $\mu\text{m}$ . Elles possèdent un transfert linéique d'énergie (TLE) très élevé, c'est-à-dire que l'énergie délivrée à la matière par cette particule est importante (80  $\text{keV}/\mu\text{m}$ ), ce qui permet donc de faire de la thérapie. Dans l'air, ces particules ne traversent que quelques centimètres et peuvent être arrêtées par une feuille de papier.<sup>20</sup>

L'émission  $\beta$  est caractérisée par l'émission d'un électron. Il en existe deux types : l'émission  $\beta^-$  qui est l'émission d'un électron ordinaire et l'émission  $\beta^+$  qui est l'émission d'un électron positif aussi appelé positon. Les  $\beta^-$  ont un TLE inférieur à celui des particules  $\alpha$  (0.2  $\text{keV}/\mu\text{m}$ ) mais un rayon d'action plus élevé (0.1-12 mm). Ils vont donc aussi pouvoir être utilisés pour la thérapie.<sup>20</sup> Pour ce qui est de l'émission  $\beta^+$ , les particules chargées positivement vont parcourir une courte distance dans le tissu (< 2 mm) avant de rentrer en collision avec un électron du milieu. On parle d'annihilation. Ce phénomène va conduire à l'émission de deux photons  $\gamma$  de 511 keV dans des directions diamétralement opposées. Ceux-ci vont pouvoir être détectés en coïncidence par une caméra à but diagnostique. Ces rayonnements peuvent parcourir quelques dizaines de centimètres de matière et sont arrêtés par le plomb.

L'émission  $\gamma$  est, quant à elle, une radiation électromagnétique. Son rayon d'action est élevé contrairement à son TLE. En effet, ces rayons  $\gamma$  peuvent parcourir quelques centaines de mètres dans l'air. La détection de ces photons par une caméra est utilisée en imagerie médicale pour le diagnostic de maladie.

Lors de la désintégration de certains atomes radioactifs, il peut se former une vacance au niveau de la couche interne électronique. Ce vide va être rempli par un électron d'une couche supérieure et ainsi de suite jusqu'à déplacer la vacance au niveau de la dernière couche électronique. Chaque transition électronique entraîne une émission d'énergie qui peut être transmise à un électron qui sera éjecté de l'atome. On parle d'émission d'électron Auger (Figure 8).<sup>20</sup> Les électrons Auger ont un TLE compris entre celui des  $\beta^-$  et celui des particules  $\alpha$  (4-26  $\text{keV}/\mu\text{m}$ ) et leur rayon d'action est très court (2-500 nm). Les particules  $\alpha$  et électrons Auger sont donc plus destructrices que les particules  $\beta^-$ .

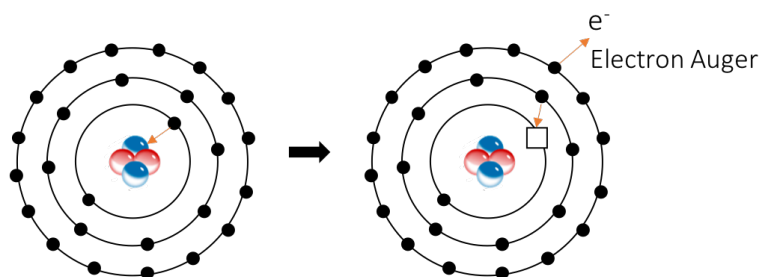


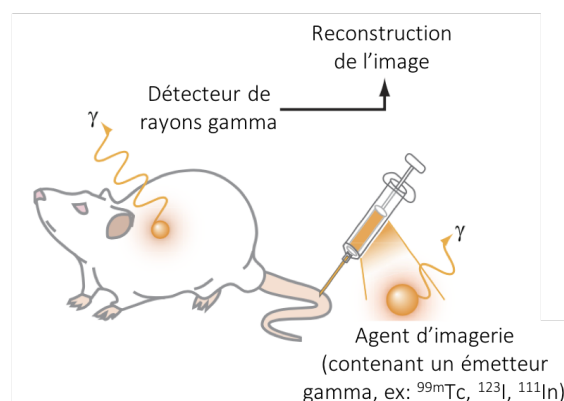
Figure 8. Représentation schématique de la production d'électrons Auger ; figure adaptée d'une page web.<sup>64</sup>

## Imagerie

Maintenant qu'une courte introduction sur la radioactivité a été faite, nous allons passer aux dispositifs d'imagerie nucléaire. Ces techniques sont basées sur la détection d'un signal radioactif. Il en existe deux principaux types :

- la tomographie par émission monophotonique (TEMP ou « *single photon emission computed tomography* », SPECT en anglais) ;
- la tomographie par émission de positons (TEP ou « *positron emission tomography* », PET en anglais).

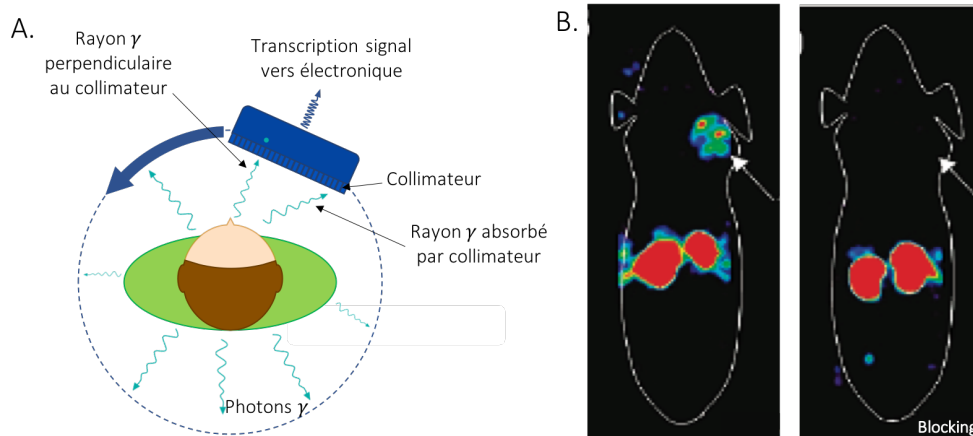
Ces modalités ont pour but de faciliter le diagnostic de différentes pathologies grâce à un dispositif d'imagerie et à un radionucléide lié ou non à une molécule ciblante. En effet, elles nécessitent au préalable l'injection d'un radiopharmaceutique. Elles diffèrent par le mode de désintégration du radionucléide injecté et l'instrumentation utilisée. Ces deux types d'imagerie sont basés sur la détection de photons  $\gamma$  provenant de la désintégration d'un radionucléide (Figure 9). La première  $\gamma$ -caméra a été développée en 1958.<sup>65</sup> Elle permettait d'obtenir des images en deux dimensions.



**Figure 9.** Principe de l'imagerie nucléaire ; figure adaptée de revue.<sup>28</sup>

## Imagerie TEMP

La première caméra TEMP a été développée en 1963.<sup>66</sup> Pour la TEMP il est nécessaire d'injecter un radionucléide émetteur de photons  $\gamma$ . Les photons  $\gamma$  émis vont être détectés par un réseau de détecteurs situé dans l'imageur, capable de tourner à 360° autour du patient. Sur ces détecteurs se trouvent des collimateurs qui vont permettre de récolter seulement les rayons  $\gamma$  leur arrivant perpendiculairement. Enfin, en identifiant l'emplacement des radionucléides, une image tridimensionnelle peut être reconstruite (Figure 10A). La présence des collimateurs améliore la résolution mais, du fait de la perte de nombreux signaux, une diminution de sensibilité est observée.<sup>28,31</sup>



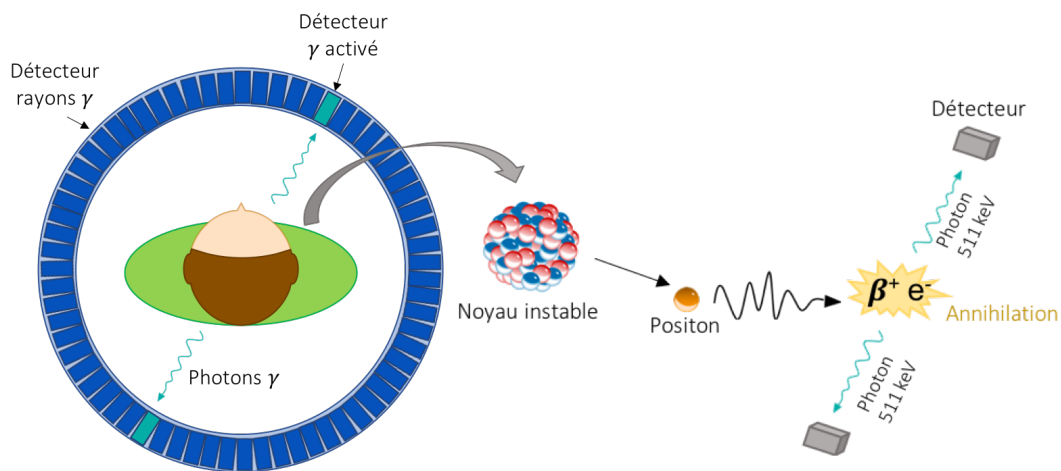
**Figure 10.** A. Représentation schématique du dispositif d'imagerie TEMP, figure adaptée de revue ;<sup>31</sup> B. Images obtenues par microTEMP d'une souris présentant une xénogreffe de tumeur de la prostate 4 h après l'injection d'un analogue de la bombésine marqué au  $^{99m}\text{Tc}$  sans *blocking* (gauche) et avec *blocking* (droite) ; figure extraite d'article.<sup>67</sup>

Malgré de nombreux progrès, la résolution spatiale de la TEMP reste encore relativement faible en clinique (< 1 mm en préclinique et 8 à 12 mm en clinique) et le signal est semi-quantitatif en clinique contrairement aux appareils destinés à la recherche préclinique. De plus, les temps d'acquisition sont relativement longs ce qui peut être source d'inconfort pour le patient. En revanche, la sensibilité est élevée ( $10^{-11}$  M), la pénétration des tissus est illimitée, les contrastes sont bons et de nombreux radionucléides sont disponibles. La TEMP est particulièrement utilisée en cardiologie mais aussi en oncologie et neurologie (Figure 10B).<sup>68-70</sup> Cette modalité d'imagerie est donc, à ce jour très utilisée en préclinique et en clinique malgré une moins bonne résolution que la TEP.<sup>71</sup>

### Imagerie TEP

La tomographie par émission de positons (TEP) a été découverte en 1962 avec le développement des premiers instruments TEP.<sup>66,72</sup> Anger a démontré la possibilité de détecter les deux photons issus de l'annihilation d'un positon en utilisant deux caméras reliées.<sup>72</sup> La toute première caméra TEP pour l'étude du corps entier est développée par Hoffman et Phelps en 1974.<sup>73</sup> La TEP nécessite l'injection d'un radionucléide émettant des positons.<sup>31,74</sup> En effet, ceux-ci vont s'annihiler avec un électron et émettre deux photons  $\gamma$  de 511 keV, qui vont être détectés en simultané par des détecteurs (sous forme de cristaux) qui forment un anneau (couronne) autour du patient. La détection des deux coïncidences va permettre de réduire le bruit-de-fond et connaître le lieu d'annihilation de façon précise (Figure 11). En revanche, une erreur de quelques millimètres est tout de même présente du fait de la distance que parcourt le positon avant de rencontrer un électron. L'acquisition d'un grand nombre d'évènements de coïncidence permet ensuite de reconstruire une image tridimensionnelle.<sup>28,31,75,76</sup> Contrairement à la TEMP, il n'y a pas besoin de collimateur. Du fait

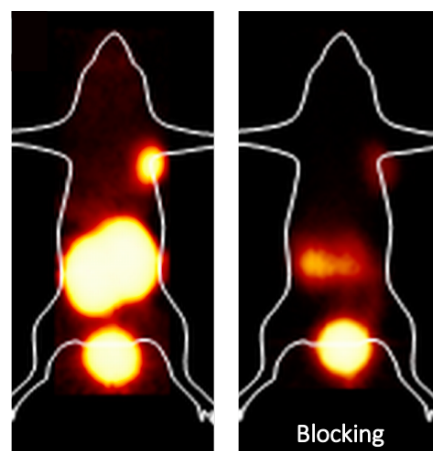
de la détection en coïncidence de deux photons contrairement à un seul pour la TEMP, les activités injectées sont inférieures à celles utilisées en TEMP.



**Figure 11.** Représentations schématiques du dispositif d'imagerie TEP et du mode de désintégration d'un radionucléide  $\beta^+$  ; figure adaptée d'une revue.<sup>31</sup>

Cette technique permet une meilleure résolution en clinique (1 mm en préclinique et 3 à 4 mm en clinique) ainsi qu'une meilleure sensibilité ( $10^{-11}$  à  $10^{-12}$  M) que la TEMP.<sup>28,75</sup> Les concentrations de radionucléides injectés sont très faibles (pM à nM) et la quantification du signal radioactif est possible.<sup>77</sup> Enfin, il n'y a pas de limite de pénétration des tissus.

Du fait de ces nombreux avantages, la TEP est très utilisée en préclinique et en clinique. En effet, la précision de cette technique permet de suivre des processus à l'échelle moléculaire tels que l'interaction d'un ligand avec son récepteur, ce qui la rend très utile pour le diagnostic et le suivi de nombreuses pathologies. Cet outil d'imagerie est très utilisé en oncologie pour le diagnostic, la caractérisation tumorale, la stadification ainsi que le suivi thérapeutique des patients (Figure 12).<sup>78</sup>



**Figure 12.** Images obtenues par microTEP d'une souris présentant une xénogreffe de tumeur de la prostate 1 h après l'injection d'un analogue de la PSMA marqué au  $^{68}\text{Ga}$  sans *blocking* (gauche) et avec *blocking* (droite) ; figure extraite d'article.<sup>79</sup>

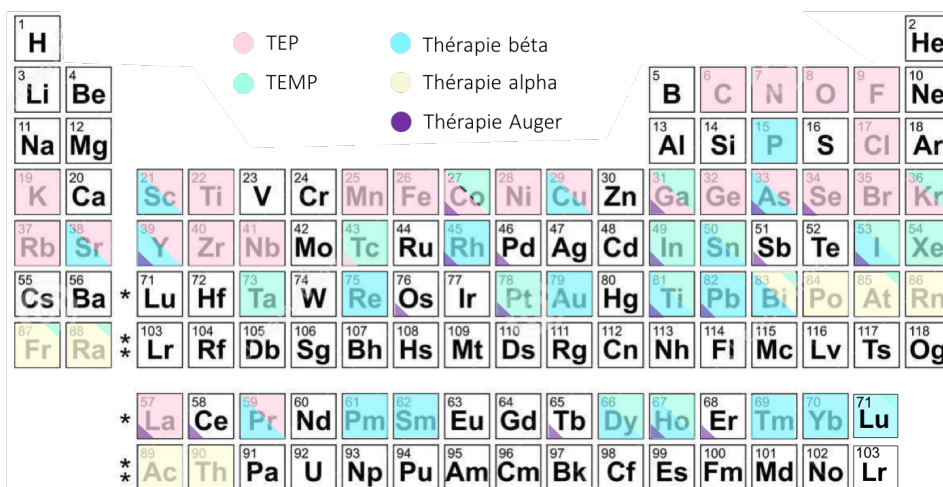


La TEP est aussi utilisée pour la détection de l'inflammation et d'infections,<sup>80</sup> ou encore, en cardiologie pour étudier le métabolisme et la viabilité du myocarde ainsi que pour suivre une perfusion myocardique ou l'athérosclérose.<sup>81,82</sup> La neurologie a aussi beaucoup recours à cette technique pour le diagnostic et le suivi de différentes pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou encore des pathologies vasculaires cérébrales.<sup>83,84</sup> À nouveau, cette technique facilite aussi le développement et l'évaluation de nouveaux médicaments.<sup>30</sup> De nombreux radionucléides sont disponibles pour cette modalité et c'est ce que nous allons détailler par la suite.

Pour résumer, ces deux techniques d'imagerie présentent de moins bonnes résolutions spatiales que le scanner et l'IRM mais une bien meilleure sensibilité. Deux limitations principales sont observées pour ces techniques. La première est l'exposition à des rayonnements ionisants. En effet, malgré les faibles quantités à injecter nécessaires pour l'imagerie, les rayonnements ionisants limitent le nombre et la fréquence d'examen par patient. La deuxième contrainte est la courte demi-vie des radionucléides, qui implique que la synthèse du radiopharmaceutique, l'injection au patient, et l'examen par imagerie doivent être effectués en un temps limité.

### Radionucléides

Au cours de ces dernières décennies, l'utilisation de radionucléides en médecine s'est considérablement développée, afin de devenir une spécialité clinique intégrant à la fois l'imagerie (détection) ainsi que le traitement de pathologies. Depuis la découverte des radionucléides pour l'imagerie et la thérapie jusqu'au développement d'instrumentations de pointe telles que la TEP et la TEMP ainsi que les cyclotrons, la médecine nucléaire n'a fait qu'évoluer. Durant cette période, le nombre de radionucléides disponibles, produits par des cyclotrons, des réacteurs nucléaires et des générateurs, a explosé et couvre aujourd'hui tout le tableau périodique (Figure 13). Blower parle dans sa revue de « *nuclear chocolate box* ». <sup>74</sup>





Les radionucléides ont des propriétés différentes (temps de demi-vie, type d'émission, énergie, périmètre d'action, production, disponibilité, coût ...). Ce sont tous ces paramètres qui vont influencer sur le choix du radionucléide à utiliser selon l'application envisagée (Tableau 2).<sup>74,86-88</sup>

**Tableau 2.** Principaux radionucléides utilisés en imagerie et thérapie, leur demi-vie, leur mode de désintégration, leur mode de production et leur application.

Radionucléide	$t_{1/2}$	radiation	production	application
<sup>11</sup> C	20.3 min	$\beta^+$ (100%)	cyclotron	TEP
<sup>68</sup> Ga	67.8 min	$\beta^+$ (89%)	générateur	TEP
<sup>18</sup> F	109.8 min	$\beta^+$ (97%)	cyclotron	TEP
<sup>64</sup> Cu	12.7 h	$\beta^+$ (19%)	cyclotron	TEP/ thérapie
<sup>86</sup> Y	14.7 h	$\beta^+$ (32%)	cyclotron	TEP
<sup>124</sup> I	99.6 h	$\beta^+$ (23%)	cyclotron	TEP
<sup>89</sup> Zr	3.3 j	$\beta^+$ (23%)	cyclotron	TEP
<sup>99m</sup> Tc	6.0 h	$\gamma$ (99%)	générateur	TEMP
<sup>123</sup> I	13.2 h	$\gamma$ (83%)	cyclotron	TEMP
<sup>111</sup> In	67.9 h	$\gamma$ (100%)	cyclotron	TEMP
<sup>67</sup> Ga	78.3 h	$\gamma$ (100%)	cyclotron	TEMP
<sup>177</sup> Lu	6.7 j	$\beta^-$ (100%)	réacteur	TEMP/ thérapie
<sup>67</sup> Cu	61.9 h	$\beta^-$ (100%)	cyclotron	Thérapie
<sup>90</sup> Y	64.8 h	$\beta^-$ (100%)	générateur	Thérapie
<sup>131</sup> I	8 j	$\beta^-$ (90%)	réacteur	Thérapie
<sup>32</sup> P	14.3 j	$\beta^-$ (100%)	cyclotron	Thérapie
<sup>225</sup> Ac	9.9 j	$\alpha$	générateur	Thérapie
<sup>212</sup> Pb	10.64 h	$\alpha$	générateur	Thérapie

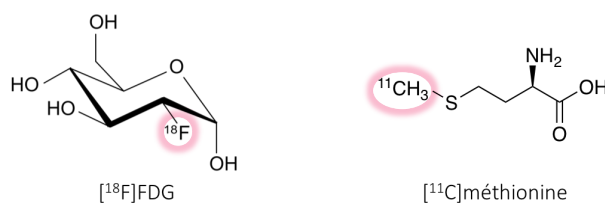
Pour le diagnostic, il faut plutôt se tourner vers des radionucléides émettant des rayons  $\gamma$  émis directement par les émetteurs  $\gamma$  ou indirectement par les émetteurs  $\beta^+$  car leur rayon d'action est élevé, tandis que leur énergie est faible (toxicité moins importante). La période radioactive doit être suffisamment longue pour avoir le temps de synthétiser le radiotracer et de réaliser l'examen d'imagerie, mais pas trop pour ne pas irradier inutilement le patient. De même, les noyaux issus du produit de désintégration ne doivent pas être toxiques. Pour l'imagerie TEP, on retrouve principalement le carbone-11, le gallium-68, le fluor-18, le cuivre-64 et le zirconium-89. Pour l'imagerie TEMP, c'est le technétium-99m et l'indium-111 qui sont les plus utilisés (Tableau 2).

Si l'application souhaitée est la thérapie, dans ce cas l'émetteur doit être de type  $\alpha$ , électron d'Auger ou  $\beta^-$ .<sup>89,90,91</sup> En effet, leur rayon d'action est court mais avec une énergie très élevée.

Le temps de demi-vie doit être suffisamment long pour permettre une bonne irradiation des cellules et tissus cibles. Par contre, un temps trop long entraînerait des dommages trop importants aux organes sains. La quantité de radionucléide injectée est limitée par la radiosensibilité de certains organes tels que la moelle osseuse, les reins ou encore les gonades. Parmi les radionucléides utilisés en thérapie, on retrouve le lutécium-177, l'yttrium-90, l'iode-131, et depuis peu, l'actinium-225 et le plomb-212 (Tableau 2).

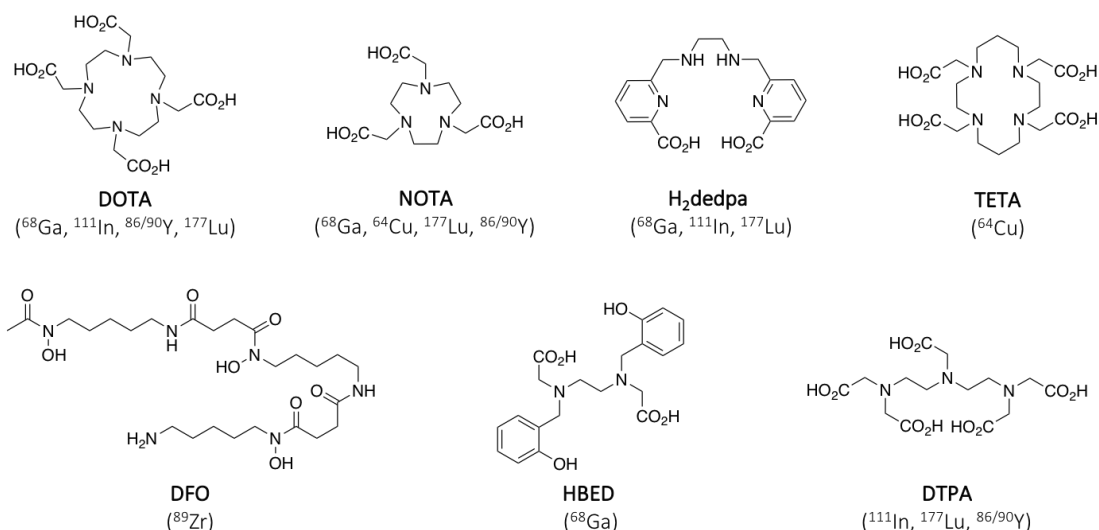
D'autres aspects à prendre en compte sont la faisabilité et la facilité du radiomarquage ainsi que le comportement *in vivo*. En effet, il existe deux types de radionucléides : les éléments métalliques et les non-métalliques. Leur fixation à un vecteur de ciblage se fera de façon différente.

Les éléments non-métalliques tels que le carbone-11, le fluor-18 ou l'iode seront accrochés au vecteur de façon covalente. Ils ont l'avantage d'être de petite taille. Le peu (ou l'absence) de modification apportée à la structure de la molécule permet de conserver ses propriétés. En revanche, les conditions de radiomarquage sont souvent difficiles (haute température, pH acide ou basique) ce qui les rend incompatibles avec des molécules fragiles dans ces conditions.<sup>92,93</sup> Enfin, le radiomarquage direct covalent nécessite la mise au point d'un nouveau protocole de radiosynthèse pour chaque nouvelle molécule. On peut citer pour exemple le [<sup>18</sup>F]fluorodésoxyglucose (FDG) utilisé pour le diagnostic TEP de nombreux cancers et la [<sup>11</sup>C]méthionine utilisée pour le diagnostic de glioblastomes (Figure 14).



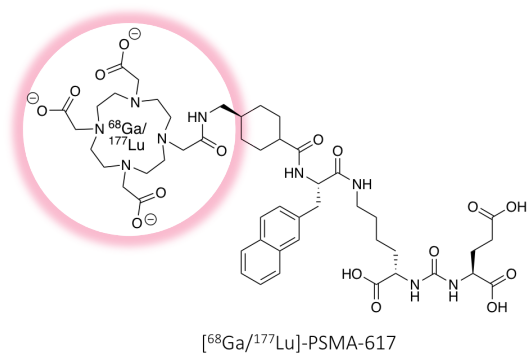
**Figure 14.** Représentation des molécules [<sup>18</sup>F]FDG et [<sup>11</sup>C]méthionine.

Pour les éléments métalliques tels que le gallium, le cuivre, l'indium, le technétium ou le lutécium, la fixation à la molécule vectrice ne se fait pas de façon covalente mais par complexation. Ceci nécessite l'introduction d'un agent chélatant, qui, par sa taille importante, va modifier de façon non négligeable le vecteur et donc altérer ses propriétés pharmacocinétiques, voire modifier sa biodistribution. Cependant, le radiomarquage est en général réalisé dans des conditions plus douces et donc compatibles avec les molécules fragiles telles que les biomolécules. De nombreux agents chélatants sont disponibles et le choix de l'agent chélatant se fait en fonction du radionucléide choisi (Figure 15).<sup>94,95</sup> Le DOTA (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique) est le plus utilisé.



**Figure 15.** Exemples d'agents chélatants utilisés pour la complexation de radionucléides métalliques.

Certains agents chélatants ont la capacité de pouvoir accueillir différents radiométaux, permettant ainsi d'utiliser une même molécule marquée avec des radionucléides différents pour le diagnostic ou la thérapie. On peut alors parler de couple radiothéragnostique. C'est par exemple le cas de la PSMA-617. Elle porte un DOTA comme agent chélatant et peut être marquée au gallium-68 ou au lutécium-177 pour le diagnostic ou la thérapie du cancer de la prostate respectivement (Figure 16).<sup>96</sup>

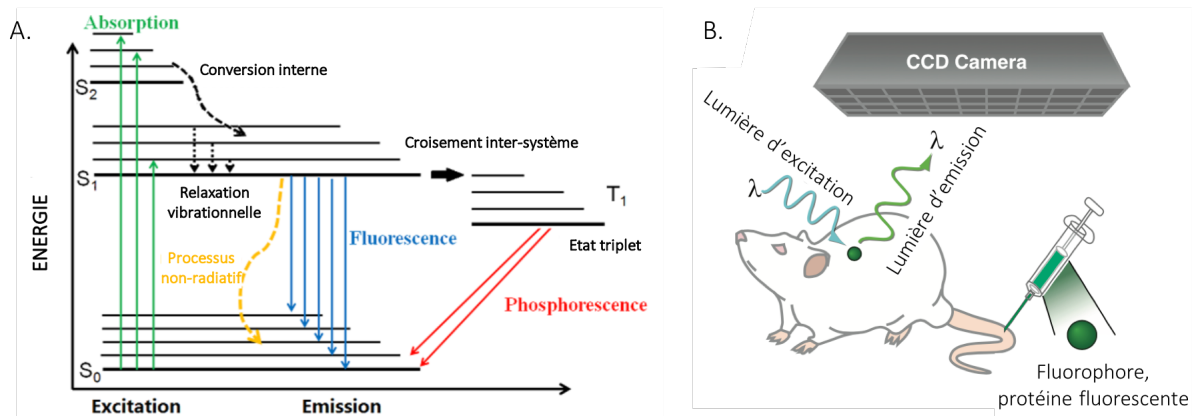


**Figure 16.** Structure du composé PSMA-617 marqué au  $^{68}\text{Ga}$  ou  $^{177}\text{Lu}$ .

## II.2.2. Imagerie optique

L'imagerie optique est une autre technique procurant des informations fonctionnelles, basée sur la détection d'un signal optique. On distingue deux modalités différentes : la fluorescence et la chimiluminescence. La chimiluminescence est l'émission de lumière après une réaction chimique conduisant à la production d'énergie lumineuse. On parle de bioluminescence lorsque cela a lieu dans une cellule ou un organisme. La fluorescence, quant à elle, est un phénomène nécessitant l'injection d'une molécule fluorescente. Dans cette thèse nous nous intéresserons seulement à l'imagerie de fluorescence.

Lorsqu'un fluorophore est excité, il va capter un ou plusieurs photons. On parle d'absorption. Lors de cette excitation, les électrons passent d'un état fondamental à un état excité singulet de plus haute énergie. Ces électrons vont ensuite se désexciter de différentes façons pour retourner à l'état fondamental. L'émission rapide par relaxation vibrationnelle conduit au phénomène de fluorescence tandis que l'émission plus lente, *via* un état triplet, conduit à la phosphorescence (Figure 17A). Les photons émis par la fluorescence (dans le domaine visible ou infrarouge) peuvent ensuite être détectés par une caméra optique (Figure 17B).<sup>28,31</sup>

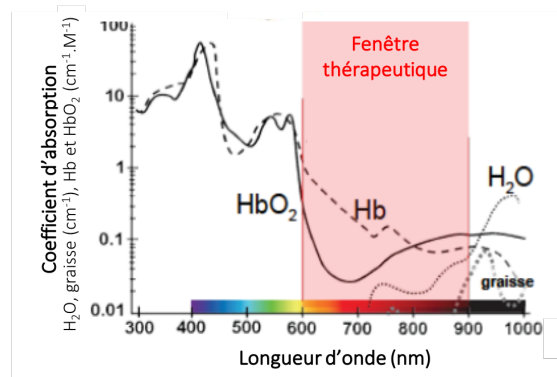


**Figure 17.** A. Diagramme de Perrin-Jablonski, figure adaptée d'une page web ;<sup>97</sup> B. Principe de l'imagerie optique, figure adaptée de revue.<sup>28</sup>

Cette technique d'imagerie permet d'obtenir des images avec une très bonne sensibilité ( $10^{-9}$  à  $10^{-16}$  M) et une résolution spatiale assez bonne (2-3 mm). Du fait de la bonne sensibilité, les concentrations de fluorophores injectées sont faibles (nM), ce qui limite le risque de toxicité.<sup>98</sup> De plus, les temps d'acquisition sont courts, ce qui permet de suivre un processus en temps réel. Enfin, les caméras sont facilement disponibles et peu onéreuses. En revanche, la plus grosse limite de cette technique est la faible pénétrabilité des tissus (quelques mm à 1 cm).<sup>99</sup> De ce fait, à ce jour, l'imagerie optique est principalement utilisée pour la microscopie cellulaire, l'analyse d'échantillons de biopsie, ou l'examen de tissus de surface tels que la peau ou l'œil.

Par ailleurs, certaines molécules du corps humain ont la capacité d'émettre de la fluorescence (on parle d'autofluorescence), ce qui peut conduire à un bruit-de-fond élevé en imagerie. Pour cette raison, pour améliorer la qualité des images, on privilégie l'emploi de fluorophores dont les maxima d'excitation et d'émission se situent dans une gamme de longueurs d'onde où les tissus absorbent très peu la lumière. On parle de fenêtre thérapeutique ou fenêtre de transparence des tissus. Celle-ci se trouve dans le domaine du proche infrarouge (*near-infrared* ou NIR en anglais). Deux fenêtres sont décrites : NIR-I entre 650 à 950 nm et NIR-II entre 950 et 1400 nm (Figure 18).

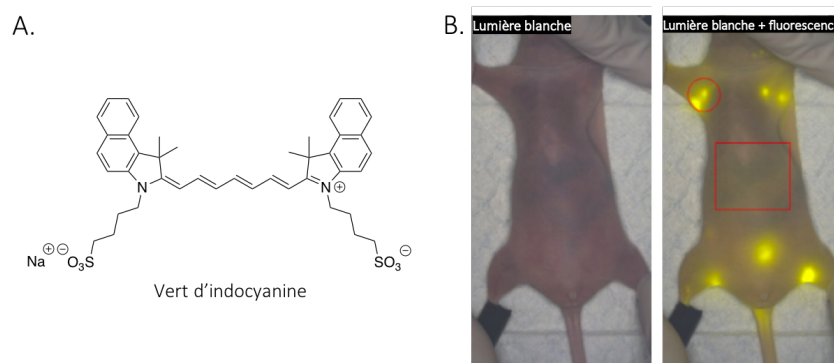
Aujourd'hui, à cause de cette faible pénétrabilité des tissus, l'imagerie optique est très utilisée en préclinique mais encore très peu en clinique hormis pour l'endoscopie<sup>101</sup> ou la chirurgie guidée par fluorescence.<sup>102</sup>



**Figure 18.** Absorption de différentes molécules endogènes et représentation de la fenêtre thérapeutique NIR-I ; figure adaptée d'une page web.<sup>100</sup>

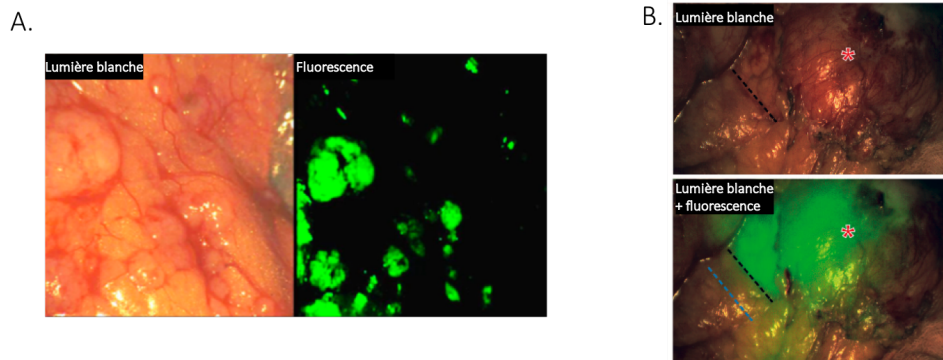
### Chirurgie guidée par fluorescence

Ces dernières années, l'imagerie par fluorescence a suscité un intérêt particulier avec le développement de la chirurgie guidée par fluorescence. En effet, lors de la chirurgie, il peut être difficile pour le chirurgien de discriminer les tissus sains des tissus cancéreux. Il a été décrit que la présence de tissus tumoraux résiduels après une chirurgie entraînait un taux de rechute élevé.<sup>103</sup> Les progrès dans le développement de dispositifs pour l'imagerie de fluorescence ont permis de mettre au point des caméras optiques pour l'imagerie intra-opératoire. Le processus consiste à injecter un fluorophore puis, à l'aide d'une caméra optique, à détecter le signal en temps réel. Plusieurs études ont montré que l'injection d'un fluorophore spécifique des cellules tumorales permettait d'améliorer la visibilité des marges tumorales et donc la qualité de la résection tumorale durant la chirurgie.<sup>102,104</sup> La fluorescence augmente aussi la qualité de la chirurgie car elle permet de préserver plus de tissus sains tels que les nerfs par exemple.<sup>105</sup> Grâce à ce dispositif, il est aussi possible de discerner les ganglions lymphatiques ainsi que des petites métastases invisibles à l'œil nu. Deux types de sondes fluorescentes peuvent être injectées. Elles peuvent être non vectorisées, c'est le cas du vert d'indocyanine (ICG). Il est très utilisé depuis les années 1950 en cardiologie, ophtalmologie, neurochirurgie, et pour l'identification des ganglions lymphatiques sentinelles en oncologie (Figure 19).<sup>106,107</sup>



**Figure 19.** A. Structure du vert d'indocyanine ; B. Images d'une souris lors de l'imagerie des ganglions lymphatiques en lumière blanche (gauche) et superposition lumière blanche/fluorescence (droite) ; figure extraite de revue.<sup>107</sup>

Les sondes fluorescentes peuvent aussi être vectorisées afin d'obtenir une meilleure spécificité pour les cellules tumorales (Figure 20).<sup>104,108</sup>



**Figure 20.** A. Images en lumière blanche et fluorescence de tissu de cancer ovarien, figure extraite d'article,<sup>104</sup> B. Images en lumière blanche et superposition lumière blanche/fluorescence d'une tumeur du pancréas (les lignes noires en pointillés représentent la ligne de résection proposée sur la base de l'inspection visuelle et de la palpation ; la ligne bleue en pointillés représente la ligne de résection proposée sur la base des données de la fluorescence) ; figure extraite de revue.<sup>108</sup>

L'utilisation de sondes  $\gamma$  (gamma-probes), pour la détection de la radioactivité au cours de la chirurgie est aussi possible et basée sur le même principe.<sup>109,110</sup> À ce jour, cet outil est surtout utilisé pour la résection des ganglions sentinelles mais reste peu développé car il est moins précis que la fluorescence. En effet, la radioactivité détectée est transcrite en un signal sonore ou en une valeur numérique et donc moins claire pour le chirurgien. De plus, cette technique entraîne l'exposition du chirurgien aux rayonnements ionisants, contrairement à la fluorescence.

### Sondes fluorescentes

De nombreuses sondes fluorescentes sont actuellement disponibles. Une sonde fluorescente est caractérisée par plusieurs propriétés photophysiques :

- les longueurs d'onde d'excitation ( $\lambda_{exc}$ ) et d'émission ( $\lambda_{em}$ ) ;
- le déplacement de Stokes, c'est-à-dire la différence entre les maxima des spectres d'excitation et d'émission ;
- le coefficient d'extinction molaire  $\epsilon$ , caractérisant la capacité à absorber la lumière ;
- le rendement quantique de fluorescence  $\phi$ , correspondant à l'efficacité d'émission du fluorophore ;
- la brillance, représentant l'intensité de la fluorescence ( $\epsilon \times \phi$ ) ;
- le photoblanchiment, caractérisant la perte de fluorescence d'une molécule.

Une bonne sonde fluorescente doit avoir des longueurs d'onde d'excitation et d'émission dans la fenêtre thérapeutique (entre 650 et 1450 nm) pour obtenir le meilleur contraste possible. Le déplacement de Stokes doit être le plus élevé possible pour réduire les interférences. Le coefficient d'extinction molaire ainsi que le rendement quantique doivent être les plus élevés

possibles pour obtenir une bonne sensibilité et enfin le fluorophore doit être peu sensible au photoblanchiment. D'autres paramètres sont aussi à prendre en compte. En effet, la sonde doit être stable dans les conditions physiologiques, elle doit être hydrosoluble pour éviter l'agrégation et enfin, elle doit posséder une fonction de greffage si on souhaite la fixer à une molécule vectrice.<sup>111</sup>

Il existe deux types de fluorophores : les fluorophores inorganiques (lanthanides, nanoparticules semi-conductrices (*quantum dots*), complexes métal de transition-ligand...) et les fluorophores organiques. Les lanthanides sont une famille d'éléments du tableau périodiques pouvant être utilisés pour former des complexes émettant dans le proche infrarouge-II (NIR-II), c'est-à-dire entre 950 et 1450 nm, ce qui permet d'obtenir des images de bonne qualité avec un ratio signal sur bruit-de-fond élevé. Ces fluorophores sont utilisés depuis peu.<sup>112</sup> La majeure partie des fluorophores organiques émettent dans le domaine proche infrarouge-I (NIR-I), c'est-à-dire entre 650 et 950 nm. De nombreuses familles existent telles que les molécules possédant un cœur xanthène (fluorescéines, rhodamines et éosines), les BODIPY, les cyanines, les porphyrines, etc (Figure 21).<sup>113</sup>

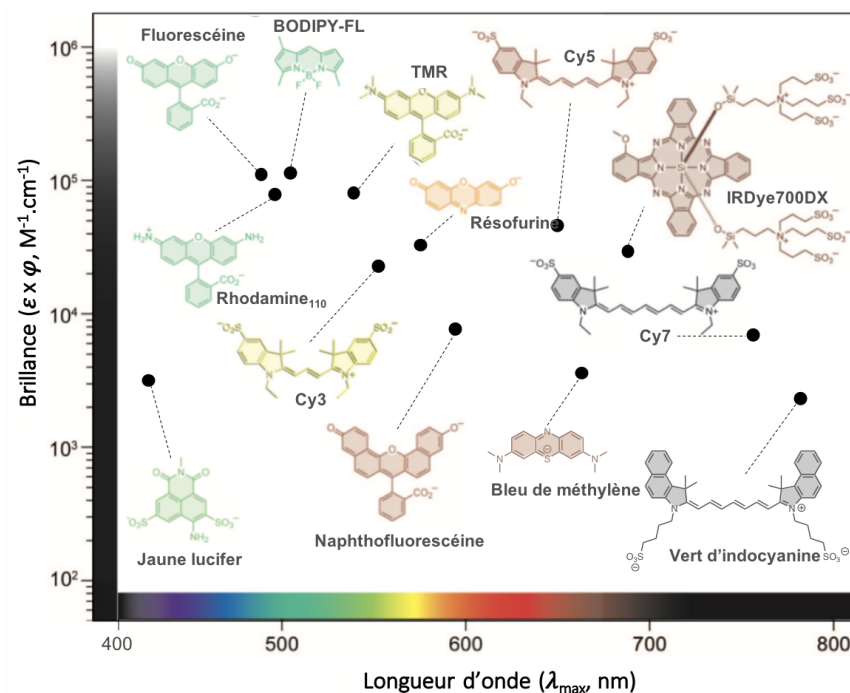


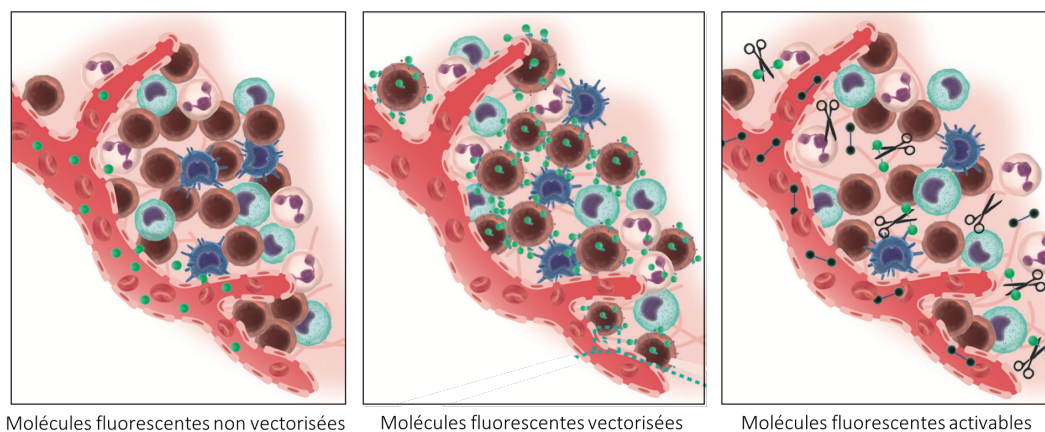
Figure 21. Exemples de fluorophores utilisés pour l'imagerie optique ; figure adaptée de revue.<sup>113</sup>

Seuls le vert d'indocyanine (ICG), le bleu de méthylène, la fluorescéine et le 5-ALA et ses dérivés (Metvixia et l'Hexvix) sont approuvés par la FDA (*Food and Drug Administration*).<sup>107,114,115</sup> Le vert d'indocyanine est le plus utilisé dans le domaine médical (angiographie ophtalmique, marqueur dans l'évaluation de la perfusion des tissus et des organes, assistance pour la biopsie des ganglions lymphatiques sentinelles avec tumeurs). Ses longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont aux alentours de 800 nm ce qui permet l'obtention d'images de qualité. En revanche, ce composé présente quelques inconvénients :



il est peu stable chimiquement et photochimiquement et il est peu vectorisable. Plusieurs essais cliniques sont en cours sur des molécules fluorescentes telles que BZL-100 ou OTL38.

Plusieurs techniques permettent l'obtention d'images avec un meilleur rapport signal sur bruit-de-fond. La première est l'utilisation d'une molécule qui s'accumulera de façon préférentielle dans un tissu donné, la deuxième est la conjugaison à un vecteur qui permettra d'emmener la molécule jusqu'à sa cible et enfin, la troisième est l'utilisation de molécules activables par un stimulus au niveau de la cible (Figure 22).<sup>116</sup>



**Figure 22.** Représentation schématique des différents types de sondes fluorescentes ; figure adaptée de revue.<sup>108</sup>

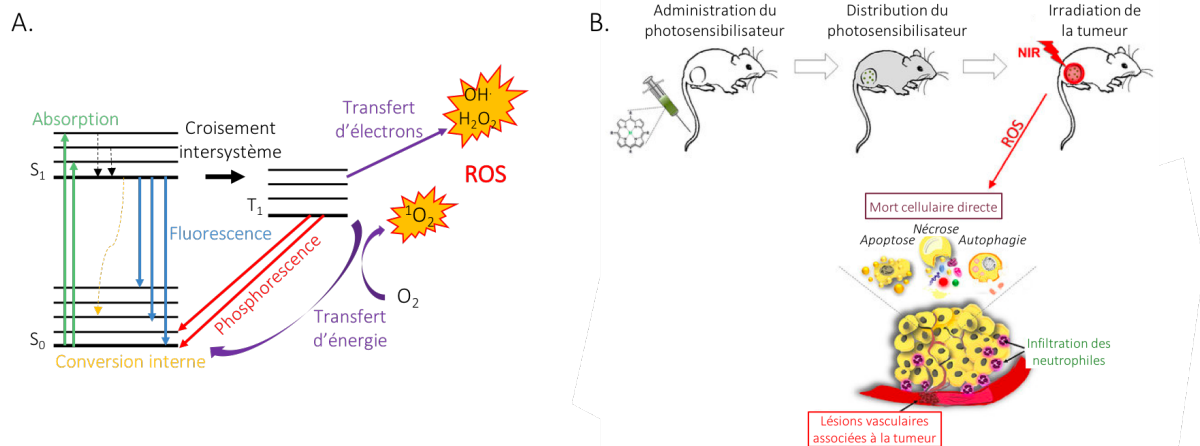
Les deux premières techniques seront expliquées plus en détails dans la partie III.3 de cette introduction. Pour la troisième approche, on parle d'agents d'imagerie dits *off/on* ou sondes intelligentes. En effet, ces molécules ne sont pas fluorescentes lorsqu'elles sont injectées, mais, une fois leur cible atteinte, elles vont être activées et générer de la fluorescence. L'activation peut se faire de différentes façons, soit par modification de paramètres physico-chimiques (pH, potentiel redox...),<sup>117</sup> soit par clivage d'un lien entre le fluorophore et un *quencher* par une enzyme.<sup>118,119</sup> De nombreux fluorophores destinés à ces différentes approches sont en cours de développement afin d'améliorer la qualité des images de fluorescence. Quelques-uns sont déjà en étude clinique.<sup>120</sup>

### **Thérapie photodynamique**

La thérapie photodynamique (photodynamic therapy ou PDT en anglais) consiste à administrer à un patient une molécule organique, appelée photosensibilisateur, puis à l'exciter à une certaine longueur d'onde par un laser. Cette excitation va permettre de faire passer le photosensibilisateur dans un état excité et son retour à son état fondamental sera accompagné d'un transfert d'énergie aux molécules de dioxygène environnantes *via* un croisement intersystème. Ceci conduit à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) que sont l'oxygène singulet, des radicaux libres ou encore des peroxydes (Figure 23A).<sup>121,122</sup> L'oxygène singulet possède une demi-vie très courte, inférieure à 40 ns, et son rayon d'action

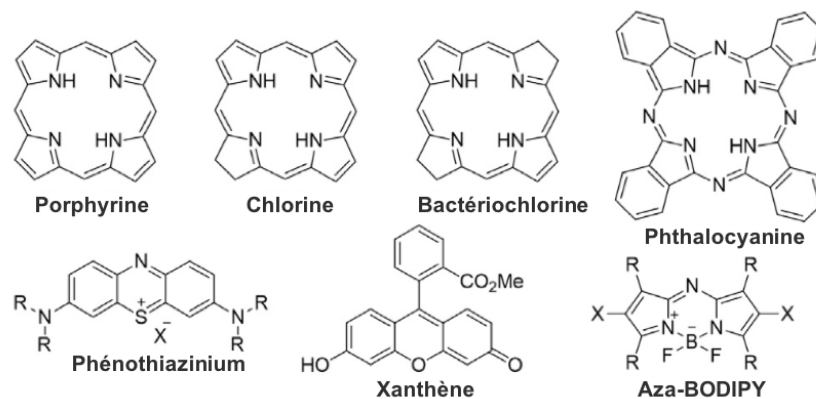


est inférieur à 20 nm.<sup>123</sup> Ces espèces très réactives sont toxiques pour les cellules car elles vont conduire à la peroxydation et à la fragmentation des lipides, protéines ou acides nucléiques. Les dommages cellulaires créés vont conduire à la mort cellulaire par trois voies possibles, l'apoptose, la nécrose ou l'autophagie (Figure 23B). Si le photosensibilisateur se trouve dans les mitochondries ou dans le cytoplasme, c'est la voie apoptotique qui entre en jeu.<sup>124</sup> En revanche, si le photosensibilisateur se trouve au niveau de la membrane plasmatique, il y aura induction de la nécrose.<sup>125</sup> Une augmentation de la phototoxicité est observée lorsque le photosensibilisateur est lié à la membrane.<sup>126</sup>



**Figure 23.** A. Diagramme de Jablonski montrant la production de ROS, figure adaptée de revue ;<sup>127</sup> B. Principe de la thérapie photodynamique ; figure adaptée d'une revue.<sup>128</sup>

Il existe plusieurs familles de photosensibilisateurs (Figure 24). Les plus connues sont les porphyrines et chlorines, les phthalocyanines, les xanthènes ou encore les BODIPY.<sup>129</sup> Les plus courantes sont les porphyrines et les phthalocyanines.



**Figure 24.** Exemples de photosensibilisateurs utilisés pour la thérapie photodynamique ; figure adaptée de revue.<sup>129</sup>

Parmi eux, plusieurs sont déjà utilisés en clinique pour le traitement de cancers,<sup>122,130</sup> de maladies infectieuses, de maladies ophtalmiques ou dermatologiques.<sup>127</sup> On retrouve par exemple le Photofrin®, Visudyne®, Levulan®, Metvixia®, Bremachlorin®, Tookad et Foscan®.<sup>130,131</sup>

Cette technique est de plus en plus utilisée en oncologie. En effet, cette approche thérapeutique permet de traiter localement des cancers tout en étant sélectif et peu invasif par rapport à la chirurgie. La PDT présente également des avantages par rapport aux chimiothérapies existantes. Plus sélective, elle induit moins d'effets secondaires, et aucune résistance n'est observée. En effet ce processus entraîne la mort immédiate des cellules contrairement à la chimiothérapie.<sup>132,133</sup> De plus, l'émission de ROS est souvent accompagnée par une émission de fluorescence ce qui fait des sondes PDT des molécules traçables pour l'imagerie et la thérapie.<sup>131</sup> Un des problèmes majeurs est que les photosensibilisateurs sont relativement peu solubles dans l'eau. Pour éviter une phototoxicité au niveau de la peau, il peut être intéressant de vectoriser ces molécules. Au vu de leur taille importante, elles sont souvent fixées sur des biomolécules vectrices de haut poids moléculaire, pour avoir un ratio poids moléculaire du photosensibilisateur sur poids moléculaire de la molécule vectrice correct. De nombreux photosensibilisateurs sont en cours de développement afin d'améliorer la sélectivité et le taux de production d'oxygène singulet.<sup>134</sup>

### II.3. Imagerie multimodale

Nous avons pu constater dans cette deuxième partie que les différentes techniques d'imagerie présentent des propriétés distinctes, chacune ayant des avantages et des limitations (Figure 25). Afin d'obtenir des informations complémentaires, de bénéficier des points forts et de pallier les limites d'une technique d'imagerie par rapport à une autre, il est possible de combiner plusieurs modalités. On parle alors d'imagerie multimodale. Il est ainsi possible d'associer imagerie fonctionnelle et structurale mais aussi de combiner deux modalités fonctionnelles ou deux modalités structurales. Enfin, l'approche théranostique consiste à associer une modalité imageante et une modalité thérapeutique.

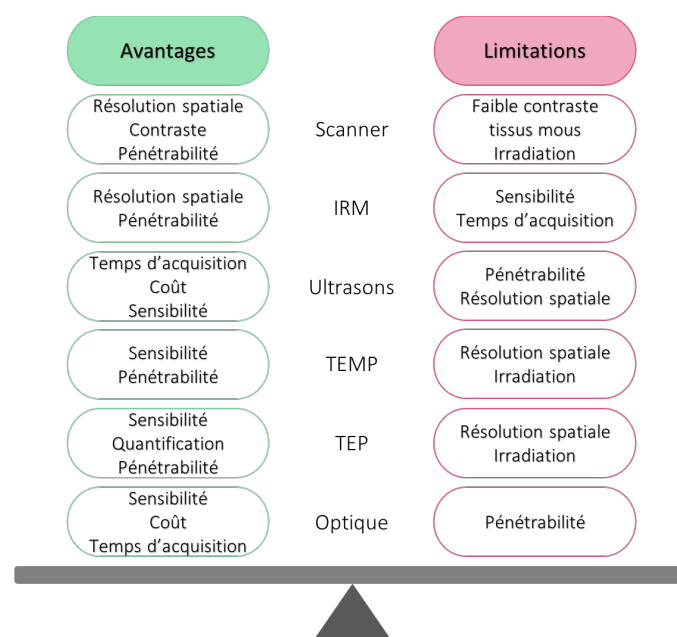
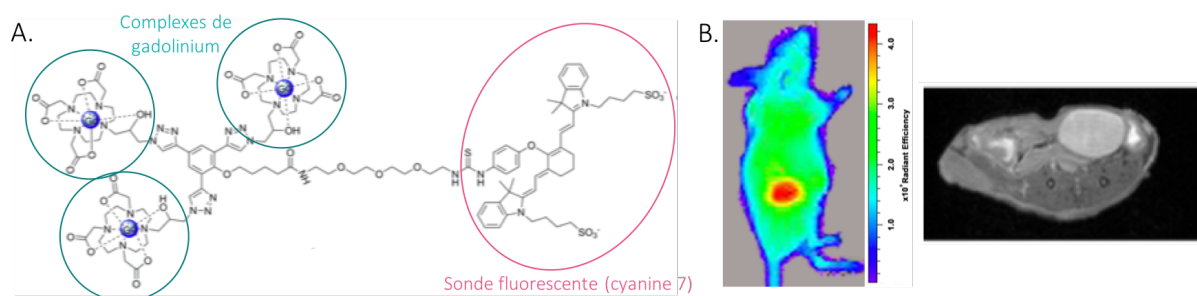


Figure 25. Avantages et limites de chaque modalité d'imagerie ; figure adaptée de revue.<sup>31</sup>

L'imagerie bimodale nécessite l'utilisation de deux sondes d'imagerie distinctes. Deux approches sont alors envisageables : deux molécules (contenant chacune une modalité) peuvent être co-injectées, ou les deux modalités peuvent être introduites directement sur une même molécule qui sera ensuite injectée. Cette dernière stratégie présente un intérêt supérieur car la molécule bimodale présentera un comportement pharmacocinétique identique pour les deux modalités contrairement à l'approche basée sur deux sondes séparées. Cela permettra donc une parfaite corrélation entre les deux modalités.

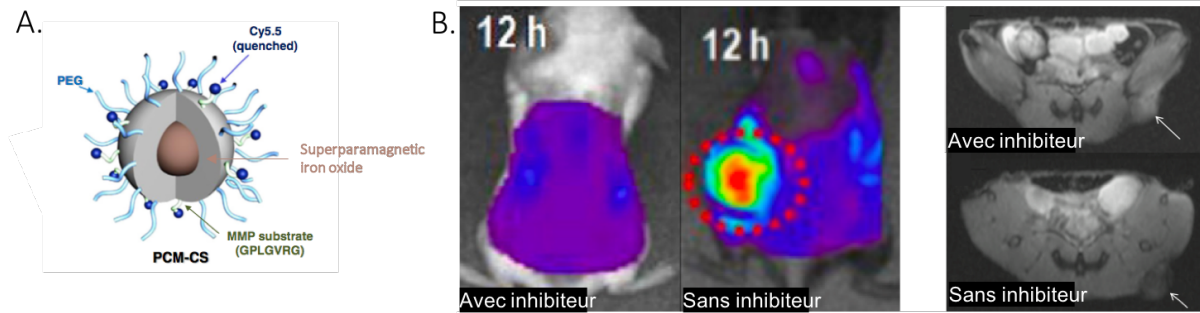
De plus, l'utilisation de sondes multimodales permet d'obtenir plus d'informations en moins de temps et ceci avec seulement une injection. Cette approche permet aussi de faciliter le développement d'agents d'imagerie car le processus de développement sera effectué qu'une seule fois, ce qui est moins onéreux et plus économique en temps.

Cependant, comme nous l'avons souligné précédemment, toutes les techniques ne présentent pas les mêmes sensibilités, ce qui peut poser problème lors de l'élaboration d'un composé bimodal. En effet, l'imagerie optique et l'imagerie nucléaire sont bien plus sensibles que la TDM et l'IRM. Plusieurs solutions peuvent être mises en œuvre pour pallier ce problème. La première est d'introduire un nombre différent de chaque type de sonde. C'est, par exemple, ce qu'a fait Harrison et son équipe en introduisant trois complexes de gadolinium pour une sonde fluorescente afin de faire l'IRM et l'imagerie optique d'une souris portant un modèle de xénogreffe du cancer du sein (Figure 26).<sup>135</sup>



**Figure 26.** A. Structure du composé contenant une sonde fluorescente pour trois complexes de gadolinium ; B. Imagerie bimodale optique (gauche) et IRM (droite) d'une souris porteuse de tumeur du sein, 4 h après l'injection du composé bimodal ; figure extraite d'article.<sup>135</sup>

Il est aussi possible d'utiliser des structures plus volumineuses de types nanostructures telles que des nanoparticules métalliques (Figure 27),<sup>136,137</sup> des liposomes ou micelles,<sup>138</sup> des cérasomes,<sup>139–141</sup> des dendrimères<sup>142</sup> ou encore des *quantum dots*, sur lesquelles plusieurs éléments peuvent être introduits.<sup>143</sup> Ces outils ont montré de bons résultats mais présentent certains inconvénients tels que leur toxicité (pour les *quantum dots* par exemple) et leur taille. En effet, la caractérisation de tels nanoobjets est compliquée et leur biodistribution n'est pas toujours optimale.



**Figure 27.** A. Structure d'une nanoparticule d'oxyde de fer PEGylée fonctionnalisée avec une cyanine 5.5 et un peptide, substrat de métalloprotéases de la matrice (MMP) ; B. Imagerie bimodale optique (gauche) et IRM (droite) avec inhibiteur ou sans inhibiteur de MMP de souris porteuse de tumeur, 12 h après l'injection de la nanoparticule vectorisée, figure extraite d'article.<sup>137</sup>

### II.3.1. Combinaison de l'imagerie fonctionnelle et structurale

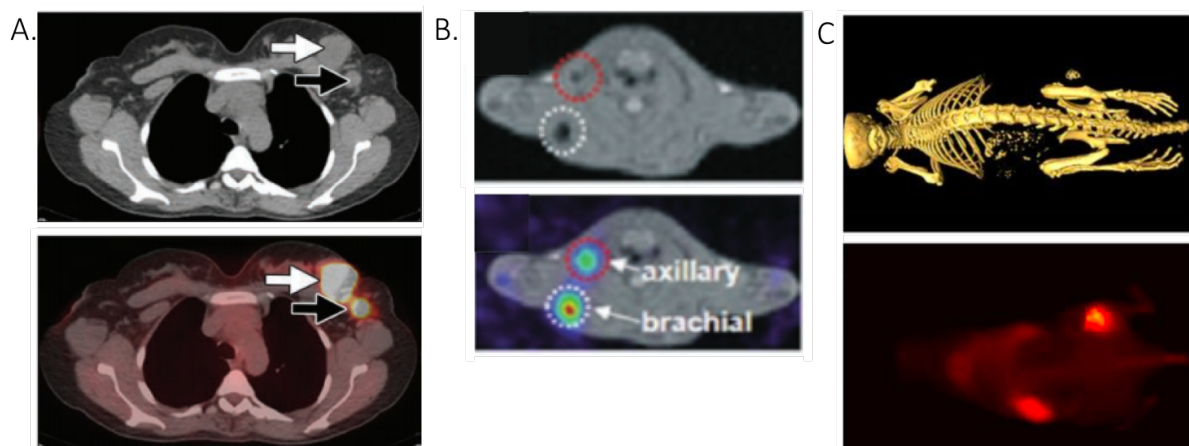
Il est intéressant de combiner imagerie fonctionnelle et structurale afin de faciliter la localisation d'un signal dans l'organisme. Une des possibilités est la combinaison d'une modalité nucléaire à la tomodensitométrie (Figure 28A). Cette combinaison est un outil très puissant permettant d'obtenir des informations à la fois moléculaires et morphologiques, qui améliorent le repérage d'anomalies et donc le diagnostic.<sup>144</sup> À ce jour, le dispositif TEMP/TDM est le plus utilisé. En effet, il est plus accessible et moins coûteux que la TEP/TDM et de nombreux radiotraceurs TEMP, marqués au  $^{99m}\text{Tc}$  ou  $^{111}\text{In}$ , sont approuvés par la FDA. Cependant, la technologie TEP/TDM a connu une progression fulgurante ces dernières années ce qui conduit à une diminution des prix et au développement important de nouveaux traceurs TEP. En effet, cette technologie permet une meilleure résolution, une bonne quantification du signal ainsi que des temps d'acquisition plus courts.<sup>145,146</sup> Aujourd'hui, la totalité des examens cliniques TEP sont effectués en TEP/TDM. Ceci permet d'améliorer considérablement les diagnostics et la prise de décision clinique, ce qui en fait une technique de choix en oncologie<sup>147</sup> mais aussi dans d'autres domaines comme la cardiologie.<sup>148</sup>

L'imagerie nucléaire peut aussi être combinée à l'IRM (Figure 28B). L'IRM permet d'obtenir des images de meilleures qualités pour les tissus mous que la TDM. La combinaison TEP/IRM est donc de plus en plus utilisée en clinique, en neurologie ou en oncologie pour le cancer du sein, de la prostate et du foie.<sup>149-153</sup> Cependant, cette technologie montre encore quelques limites.<sup>154,155</sup>

Quelques études ont décrit la combinaison de l'imagerie optique et de la TDM (Figure 28C). Du fait de la différence de sensibilité entre ces modalités d'imagerie, les nanotechnologies semblent être des outils de choix pour concevoir des agents de contrastes adaptés.<sup>156,157,158</sup> Plusieurs études ont également rapporté la combinaison imagerie optique et IRM. À nouveau, la différence de sensibilité obtenue malgré l'ajout d'agents de contraste doit être palliée par l'introduction d'un nombre supérieur d'agent de contraste IRM comparé au fluorophore.<sup>135,159</sup>

Un autre problème, pouvant être rencontré, est l'incompatibilité des propriétés physiques des fluorophores et des agents de contraste IRM (par exemple, l'oxyde de fer est un *quencher* de fluorescence). Cependant, il a été montré que le *quenching* de la fluorescence dépendait de la taille de la nanoparticule.<sup>160</sup> En augmentant la taille de celle-ci, la fluorescence peut être retrouvée. Il est donc possible de combiner nanoparticule d'oxyde de fer et sonde fluorescente,<sup>129</sup> mais aussi d'utiliser d'autres types de nanoparticules (*quantum dots* par exemple).<sup>132</sup>

Enfin, il est à noter que certaines équipes vont jusqu'à développer des agents trimodaux.<sup>162,163</sup>

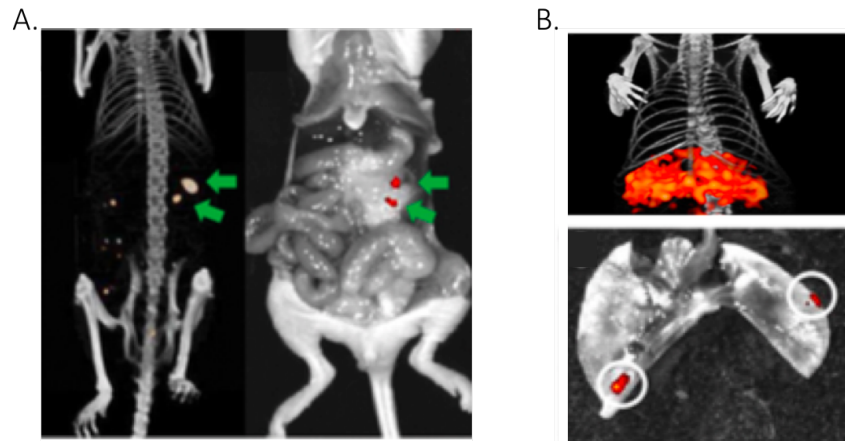


**Figure 28.** A. Imagerie bimodale TEP/TDM, imagerie TDM (haut) et superposition TEP/TDM (bas) d'une patiente porteuse de tumeur du sein après l'injection de  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ , figure extraite d'article ;<sup>161</sup> B. Imagerie bimodale TEP/IRM, imagerie IRM (haut) et superposition TEP/IRM (bas) des ganglions lymphatiques d'une souris après l'injection d'une nanoparticule bimodale  $[^{124}\text{I}]\text{-SA-MnMEIO}$ , figure extraite d'article ;<sup>153</sup> C. Imagerie bimodale TDM/fluorescence, imagerie TDM (haut) et fluorescence (bas) d'une souris porteuse de tumeur du col de l'utérus après l'injection d'une huile contenant de l'iode et des *quantum dots*, figure extraite d'article.<sup>157</sup>

### II.3.2. Combinaison de modalités d'imagerie fonctionnelle

Les combinaisons de deux modalités structurales telles que IRM/TDM et US/TDM sont très peu utilisées. En revanche, l'association de deux modalités fonctionnelles, telles que l'imagerie nucléaire et l'imagerie optique, est un domaine de recherche en pleine expansion, ayant déjà montré de très bons résultats précliniques (Figure 29).<sup>164-167</sup>

Contrairement aux combinaisons précédentes, le développement de sondes bimodales nucléaire/optique est plus simple car les sensibilités sont similaires. De plus, chaque modalité d'imagerie permet une application différente. L'imagerie TEP ou TEMP permet d'établir le diagnostic, de stadifier les patients, de détecter et localiser les tumeurs et métastases et de sélectionner les patients éligibles pour la chirurgie. La modalité optique permet, quant à elle, de délimiter avec précision les marges tumorales et de localiser les éventuelles métastases invisibles à l'œil nu, dans le cadre d'une chirurgie guidée par fluorescence. Enfin la modalité nucléaire peut à nouveau être utilisée afin de faire un bilan post-chirurgie.



**Figure 29.** A. Imagerie bimodale TEMP/fluorescence, TEMP/TDM (gauche) et fluorescence (droite) d'une souris porteuse de tumeur LS174T, 3 jours après l'injection d'un anticorps (MN-14) ciblant l'antigène carcinoembryonnaire (CEA) contenant l'IRDye800CW et marqué à l'indium-111, figure extraite d'article<sup>168</sup>. B. Imagerie bimodale TEMP/fluorescence, TEMP/TDM (haut) et fluorescence (bas) d'une souris porteuse de micrométastases non détectables en TEMP 3 semaines après l'injection d'un anticorps (labetuzumab) ciblant l'antigène CEA contenant l'IRDye800CW et marqué à l'indium-111 ; figure extraite d'article.<sup>169</sup>

Les sondes bimodales doivent être spécifiques du tissu d'intérêt et, au vu de leur taille importante, elles sont souvent conjuguées à des molécules vectrices de haut poids moléculaire (anticorps, biomolécules, peptides). De nombreux agents bimodaux TEMP/fluorescence sont également basés sur des nanotechnologies (liposomes, micelles, cérasomes) et ceci car les profils pharmacocinétiques sont plus en accord avec les longs temps de demi-vie des radionucléides TEMP. La plupart des sondes bimodales TEP/fluorescence sont utilisées en oncologie mais elles peuvent aussi trouver des applications dans d'autres domaines telles que la détection et le suivi d'hémorragies et lésions intracrâniennes,<sup>170</sup> l'étude de la perfusion du myocarde,<sup>171</sup> ou encore le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.<sup>172</sup>

### II.3.3. Théranostique

Le terme théranostique est issu de la contraction entre les mots « thérapie » et « diagnostic ». Cette approche a pour objectif d'utiliser l'imagerie pour localiser les cellules cancéreuses et les éliminer au moyen d'une thérapie ciblée. Il existe trois types d'agents théranostiques faisant appel à la médecine nucléaire.

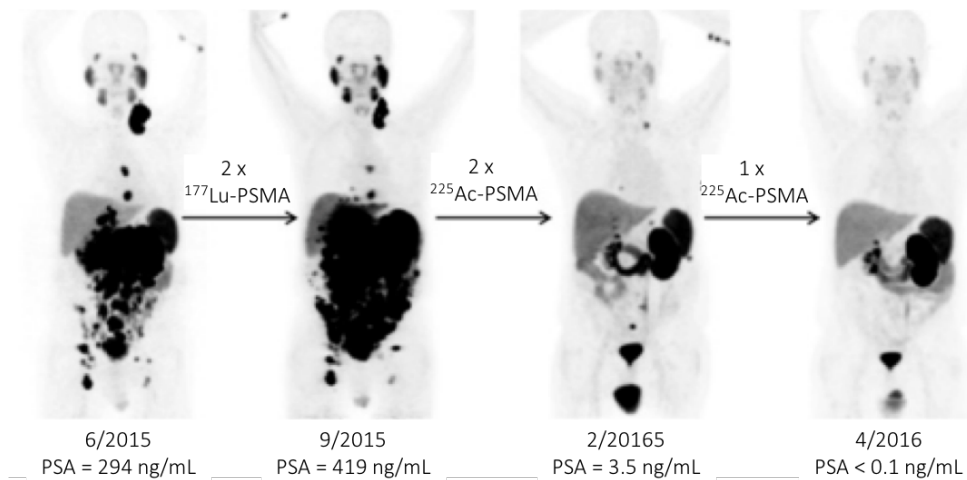
Le premier consiste à utiliser un radionucléide émettant à la fois des photons  $\gamma$  pour le diagnostic et des particules  $\alpha$  ou  $\beta^-$  pour la thérapie, ce qui en fait un outil théranostique puissant. On peut citer par exemple le cas du lutécium-177 ou du rhénium-186.<sup>173</sup>

La deuxième possibilité est de marquer une molécule avec des isotopes différents d'un même élément selon l'application souhaitée. C'est par exemple le cas de l'iode, qui possède quatre radioisotopes :  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$  pour l'imagerie, et  $^{131}\text{I}$  pour la thérapie.<sup>174</sup> Il en va de même pour le cuivre ( $^{64}\text{Cu}$  pour l'imagerie et  $^{67}\text{Cu}$  pour la thérapie)<sup>175</sup> ou encore le terbium ( $^{149}\text{Tb}$ ,  $^{152}\text{Tb}$ ,  $^{155}\text{Tb}$  pour l'imagerie et  $^{161}\text{Tb}$  pour la thérapie). On parle alors de paire théranostique. Ceci permet de conserver exactement la même biodistribution pour l'agent théranostique.



La troisième possibilité est de marquer une même molécule avec des radionucléides différents selon l'application souhaitée. Par exemple, on peut envisager l'utilisation du gallium-68 pour le diagnostic, suivi du lutécium-177 pour la thérapie. Ce couple de radionucléides est utilisé pour le traitement du cancer de la prostate avec un ligand PSMA (Figure 16),<sup>176</sup> ou pour le traitement de tumeurs neuroendocrines avec un ligand des récepteurs à la somatostatine, DOTATOC.<sup>177</sup> Le couple technétium-99m pour le diagnostic et rhénium-186 pour la thérapie est aussi utilisé.<sup>178</sup>

Actuellement, après l'iode-131, le radionucléide le plus utilisé pour la radiothérapie est le lutécium-177. En effet, cet émetteur  $\beta^-$  est un outil très puissant car il présente un temps de demi-vie assez long (6.7 jours), adapté à la thérapie. Il émet des particules  $\beta^-$  permettant la thérapie et des photons  $\gamma$  pouvant être utilisés pour l'imagerie ou pour des études de dosimétrie. Il est principalement utilisé dans le cadre de RLT (*radioligand therapy*) pour le traitement de petites tumeurs et métastases car l'énergie de ses particules est assez faible (498 keV). Il est moins toxique que l'yttrium-90 pour le patient et le personnel (énergie pouvant aller jusqu'à 2280 keV).<sup>179</sup> L'utilisation de radionucléides émetteurs  $\alpha$ , tels que l'actinium-225, a montré des résultats très encourageants pour le traitement de patients atteints du cancer de la prostate (Figure 30).<sup>180</sup>



**Figure 30.** Imagerie TEP/TDM d'un patient atteint du cancer métastatique de la prostate, après traitement au [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 et au [<sup>225</sup>Ac]Ac-PSMA-617. Chez ce patient, la réponse au [<sup>225</sup>Ac]Ac-PSMA-617 a été bien meilleure ; figure extraite d'article.<sup>180</sup>

Le lutécium-177 est utilisé pour traiter de nombreux cancers tels que le cancer du côlon,<sup>181</sup> le lymphome non-hodgkinien,<sup>182</sup> le cancer du poumon,<sup>183</sup> le cancer des ovaires,<sup>184</sup> le cancer de la prostate,<sup>176,185</sup> ou les tumeurs neuroendocrines.<sup>186</sup> De nombreux autres radionucléides peuvent être utilisés pour l'élaboration d'agents théranostiques.<sup>187</sup>

### III. Ciblage

Comme vu précédemment, le développement d'un cancer résulte de nombreuses modifications aux niveaux moléculaire, cellulaire et tissulaire. Il est donc intéressant d'utiliser ces changements pour localiser et traiter la pathologie. L'emploi d'agents pharmaceutiques capables de cibler le phénomène que l'on souhaite détecter, en général les cellules cancéreuses, permet d'améliorer la qualité du diagnostic (contraste, précision) et la réponse thérapeutique tout en limitant les effets indésirables et le développement de résistance aux traitements. (Figure 31).<sup>188,189</sup>

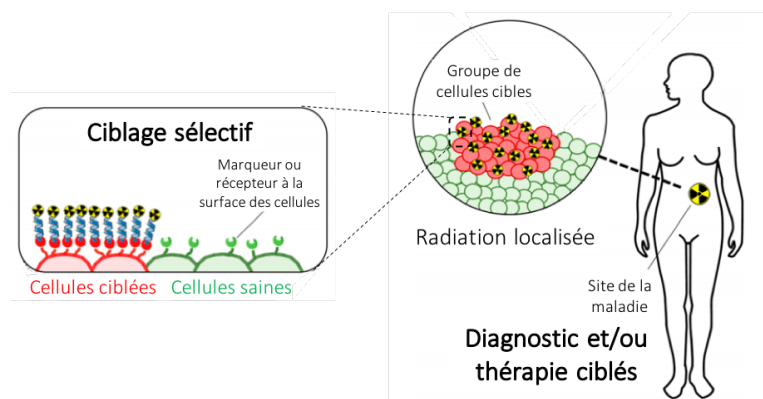


Figure 31. Illustration simplifiée d'un agent pharmaceutique vectorisé ; figure adaptée de revue.<sup>85</sup>

Le développement d'un agent d'imagerie ou d'un agent thérapeutique vectorisé implique de nombreuses étapes (Figure 32).

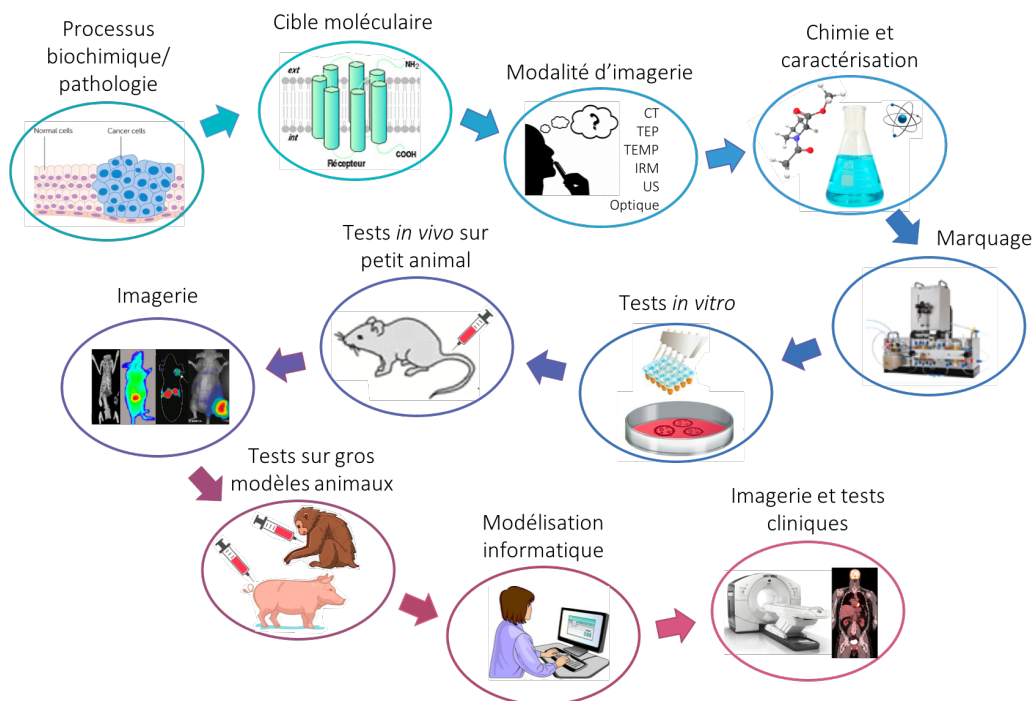


Figure 32. Schéma du processus de développement d'un agent pharmaceutique ; figure adaptée de revue.<sup>28</sup>



La première étape consiste à identifier un processus biochimique spécifique de la pathologie ciblée. Ensuite, il faut choisir une cible pertinente, caractéristique du phénomène d'intérêt, pour le visualiser. Le choix peut se tourner vers une cible moléculaire spécifique ou un processus moléculaire (apoptose, hypoxie...). L'imagerie d'une cible moléculaire permet d'obtenir des informations très spécifiques et donc limitées à un type de pathologie. En revanche, l'imagerie d'un processus moléculaire permet d'appliquer une technique à différentes indications, mais de façon moins spécifique.

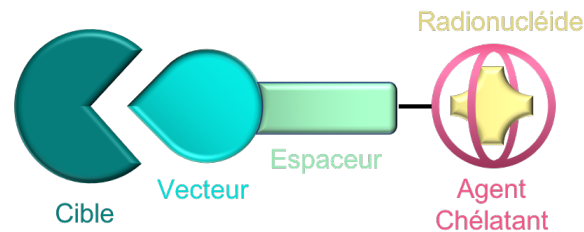
Ensuite, selon l'application souhaitée (imagerie ou thérapie) et la question étudiée, il faut élaborer le *design* de la molécule. Cette étape comprend le choix de la modalité d'imagerie en prenant en compte les points forts et limites de chaque technique mais aussi le type de molécule utilisée pour atteindre la cible. Puis, vient la partie chimie et radiochimie pour synthétiser et caractériser cette molécule d'intérêt. De nombreux tests *in vitro* (basés sur la biologie moléculaire et cellulaire) doivent ensuite être effectués pour une première étape de validation du composé. Ceux-ci consistent à évaluer la spécificité et la sélectivité du composé pour la cible/processus ainsi que son affinité, sa capacité à se lier aux protéines plasmatiques et sa stabilité. Ces tests se révèlent très utiles mais ne fournissent pas d'information quant à la biodistribution et aux propriétés pharmacocinétiques d'un composé.

Il faut donc ensuite réaliser des tests *in vivo* sur petit animal. En effet, ces modèles permettent de mimer (bien qu'imparfaitement) les processus physiopathologiques retrouvés chez l'homme et donc d'évaluer précliniquement l'action d'agents pharmaceutiques pour de nombreuses pathologies. Les rongeurs sont très utilisés pour ces tests car leur génome est totalement connu et leur élevage est facile. Les souris représentent 90% des modèles mammifères utilisés. De plus, les outils d'imagerie chez l'animal sont beaucoup plus précis qu'en clinique. Des premiers tests peuvent être effectués sur animaux sains afin d'obtenir des informations quant à la biodistribution, la stabilité et la toxicité des composés, puis l'utilisation de modèles d'animaux pathologiques pertinents permet d'évaluer la spécificité, la sélectivité et l'efficacité du composé. L'étude de biodistribution *ex vivo* est réalisée afin d'analyser la quantité de signal présente dans chaque organe. Enfin, si l'objectif final est l'étude clinique, des études de dosimétrie et de toxicité seront nécessaires, ainsi qu'une évaluation du composé sur animaux plus gros, non rongeurs et un recours à certains modèles et algorithmes mathématiques, avant de passer chez l'homme.<sup>28</sup>

Il faut savoir que lorsqu'un agent pharmaceutique est administré à un organisme, il va suivre un processus d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion (ADME), qui va définir ses propriétés pharmacocinétiques. Ceci est très important et impacte énormément le développement d'un agent pharmaceutique.

### III.1. Les radiopharmaceutiques

Un radiopharmaceutique est une molécule sur laquelle un radionucléide a été introduit afin d'être utilisé pour le diagnostic ou la thérapie. Il est constitué classiquement de plusieurs parties ayant des rôles différents (Figure 33).



**Figure 33.** Structure schématique d'un radiopharmaceutique.

- Le vecteur permet le ciblage spécifique d'un phénomène caractéristique des tissus pathologiques. Cela peut être une cible moléculaire ou un processus biochimique. Le vecteur doit avoir une bonne affinité et une bonne spécificité pour cette cible. L'approche utilisée pour lier l'agent chélatant au vecteur peut nettement impacter le profil de biodistribution du composé. Plusieurs techniques (modifications aléatoires, site-spécifiques, *pretargeting*, ...) seront exposées dans le chapitre 3.
- Le radionucléide permet de faire de l'imagerie ou de la thérapie. Il peut être non-métallique et dans ce cas lié directement au vecteur, ou métallique et dans ce cas un agent chélatant sera nécessaire à sa fixation. La période radioactive du radionucléide doit être adaptée à la pharmacocinétique du vecteur. En effet, si la molécule vectrice possède un temps de demi-vie relativement court, il faut dans ce cas plutôt utiliser le gallium-68, le fluor-18 ou le technétium-99m par exemple. En revanche, si son temps de demi-vie est long, il faut plutôt choisir des éléments possédant une plus longue période radioactive (zirconium-89, indium-111, ...).
- L'agent chélatant permet la complexation du radionucléide métallique. Le complexe formé doit être stable dans les conditions physiologiques. De nombreux agents chélatants sont disponibles et permettent des radiomarquages de qualité dans des conditions douces. Nous les décrirons dans le chapitre 2.
- Enfin, un espaceur peut être introduit entre l'agent chélatant et le vecteur afin de limiter l'encombrement stérique mais aussi modifier les propriétés pharmacocinétiques du radiopharmaceutique.<sup>190</sup>

Chaque élément doit être choisi de façon méticuleuse et influencera le comportement *in vivo* du radiopharmaceutique. Les facteurs principaux sont la taille, la charge et la lipophilie de la molécule. De plus, le développement d'un radiopharmaceutique nécessite de prendre en compte la facilité et la rapidité du radiomarquage, le niveau de pureté radiochimique et la stabilité du complexe. Il doit également être résistant à la dégradation *in vivo*, présenter une

faible immunogénicité, et une bonne sélectivité et spécificité pour la cible, afin d'obtenir des images ou réponses thérapeutiques idéales.

Le développement de radiopharmaceutiques a débuté en 1970 avec le tout premier anticorps ciblant l'hormone chorionique gonadotrope (HCG), marqué à l'iode-125 et évalué chez le rat pour l'imagerie du choriocarcinome.<sup>191</sup> Depuis, de nombreux radiopharmaceutiques ciblant diverses fonctions biologiques ou phénomènes moléculaires ont été développés et certains sont maintenant disponibles en clinique.

En 2013, une étude de la base de données *Molecular Imaging and Contrast Agent Database* (MICAD) a montré que parmi les radiopharmaceutiques décrits dans la littérature, 42% étaient destinés à la TEP et 31% à la TEMP. Concernant la TEP, 41% utilisent le fluor-18, 31% le carbone-11 et seulement 28% utilisent des radiométaux. En ce qui concerne la TEMP, 42% sont marqués au technétium-99m, 29% à l'indium-111 et 29% avec d'autres radionucléides tels que l'iode ou le lutécium.<sup>192</sup>

Les radiométaux sont à ce jour encore assez peu utilisés de par leur développement récent mais, comme nous l'avons vu précédemment, ils présentent de nombreux avantages. En effet, il en existe un grand nombre, ce qui permet d'adapter facilement leur temps de demi-vie à celui du vecteur.<sup>82</sup> Ils ont récemment permis le développement de couples radiothéranostiques montrant de grands succès scientifiques et commerciaux tels que le Lutathera et la PSMA par exemple. L'industrie pharmaceutique montre de plus en plus d'intérêt pour le développement de tels radiopharmaceutiques.

Il existe plusieurs façons de classer les radiopharmaceutiques. Une première approche est de les classer en fonction de leur taille. On distingue notamment les petites molécules, les peptides, les petites protéines (comme les Affibodies), les aptamères oligonucléotidiques, les anticorps et diverses nanoparticules (Figure 34).<sup>28</sup> Chacun de ces types d'agent d'imagerie se situe dans une fourchette de taille différente et possède donc des propriétés pharmacocinétiques et de liaison différentes.

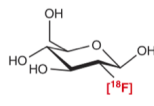
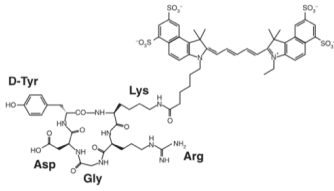
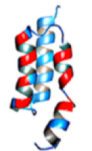

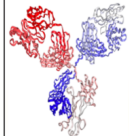
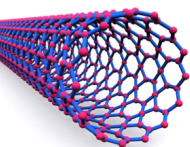
Classe	Petites molécules	Peptides	Affibodies	Aptamères	Anticorps	Nanoparticules
Taille	<1 nm <0.5 kDa	~1–4 nm ~0.5–2 kDa	~5–10 kDa	~5–15 kDa	~150 kDa	~10-200 nm (pas plus grand que 1000 nm)
Exemples	 [ <sup>18</sup> F]FDG	 RGD-Cy5.5	 [ <sup>68</sup> Ga]-DOTA-MUT-DS	 Balise moléculaire	 ICG-Trastuzumab	 RGD-SWNT

Figure 34. Exemples des différents vecteurs ; figure adaptée de revue.<sup>28</sup>

En général, plus une molécule est petite et hydrophile, plus elle est éliminée rapidement et par voie rénale. En revanche, plus une molécule est grosse et lipophile, plus elle circulera longtemps dans l'organisme et sera éliminée par voie hépatique.<sup>193</sup>

Les radiopharmaceutiques peuvent aussi être classés selon la stratégie de ciblage mise en jeu. En effet, certains vont s'accumuler dans la zone d'intérêt grâce à leurs propriétés physico-chimiques, on parle de ciblage passif, tandis que d'autres s'accumulent dans la zone d'intérêt grâce à un vecteur reconnaissant une cible caractéristique. On parle alors de ciblage actif.

## III.2. Ciblage passif

Le ciblage passif consiste en l'accumulation d'une molécule dans une zone cible grâce à ses propriétés physico-chimiques. L'accumulation peut aussi se faire par effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) pour les macromolécules ou nanoparticules.

### III.2.1. Effet EPR

Durant la croissance tumorale, on observe une augmentation de la perméabilité vasculaire, due à l'angiogenèse.<sup>5</sup> En effet, les tumeurs développent la capacité à construire de nouveaux vaisseaux sanguins, qui vont les irriguer et leur apporter tous les éléments nécessaires à leur développement (acides aminés, oxygène, sucres...). Ceci engendre une désorganisation vasculaire et rend l'endothélium des vaisseaux tumoraux plus perméable que celui des tissus sains. Du fait de la présence de pores dans l'endothélium vasculaire, certaines macromolécules peuvent diffuser et s'accumuler dans la tumeur. De plus, les tissus tumoraux présentent une déficience du système de drainage lymphatique ce qui permet la rétention des molécules au sein de la tumeur. C'est l'effet EPR (Figure 35).<sup>194</sup>

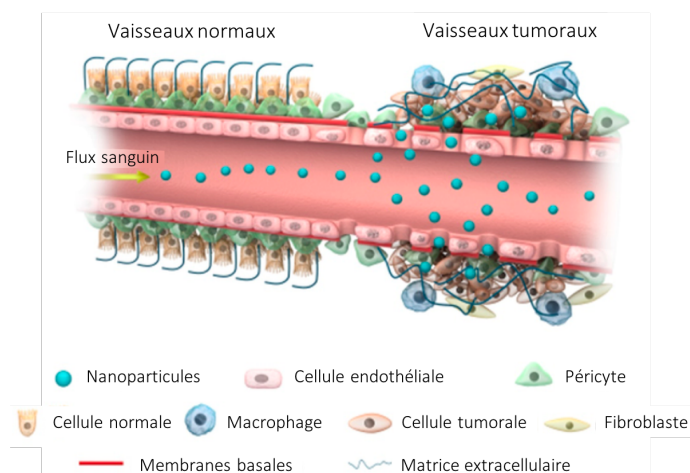
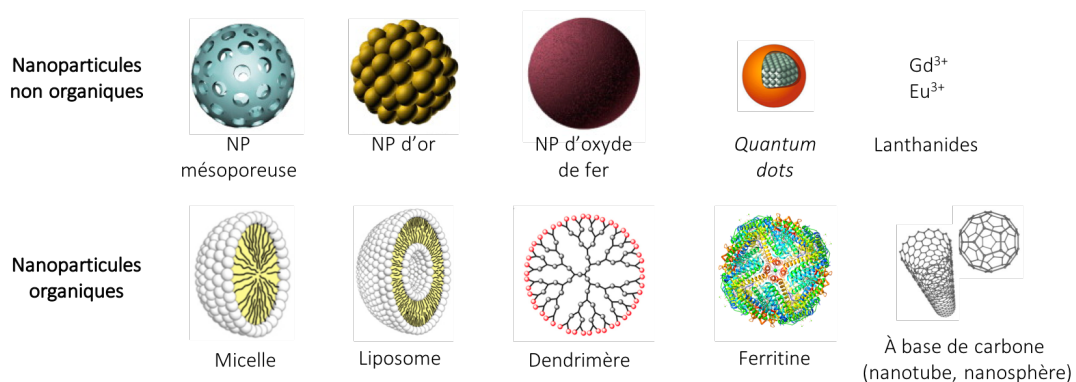


Figure 35. Illustration de l'effet EPR ; figure adaptée de revue.<sup>194</sup>

Ce phénomène a été décrit en 1986 et a montré son importance et son efficacité pour le ciblage spécifique des tumeurs solides.<sup>195</sup> Un meilleur effet EPR a été observé sur des tumeurs de petites tailles, probablement dû à une densité de vaisseaux supérieure dans celles-ci. Cependant, à ce jour, l'efficacité de l'effet EPR pour le ciblage de tumeur chez l'homme est remise en question.<sup>196</sup> En effet, malgré de très bons résultats chez les petits animaux, les effets sont plus contrastés chez l'homme. Ceci est dû aux nombreuses différences observées entre les modèles de tumeurs chez le rongeur et chez l'homme : la vitesse de développement, la taille par rapport à l'hôte et le microenvironnement (structure de l'endothélium tumoral, des membranes, zones hypoxiques...). Seules certaines tumeurs présentent un fort effet EPR en clinique (sarcome de Kaposi, tumeurs de la tête et du cou...).

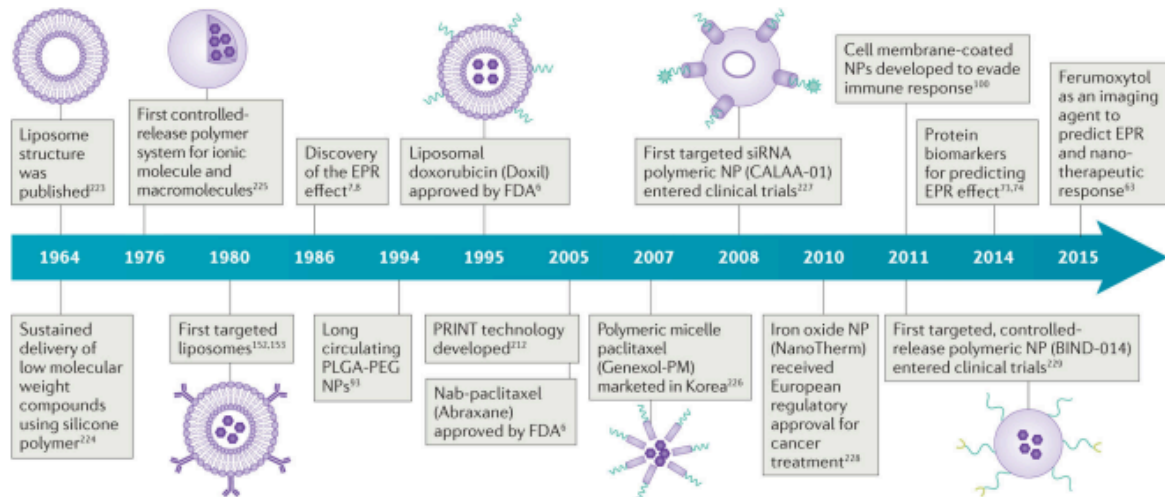
### III.2.2. Types de vecteurs

Les molécules suffisamment larges (> 4 nm ou 30 kDa) sont concernées par l'effet EPR.<sup>197</sup> Ceci concerne donc les grosses protéines (albumine, anticorps) et les nanoobjets tels que les nanoparticules, les liposomes et micelles, les dendrimères et les gros polymères (dextrane) (Figure 36).<sup>193</sup>



**Figure 36.** Exemples des différents types de nanoobjets.

Durant ces dernières années de nombreux radiopharmaceutiques de ce type ont été développés. Les nanoparticules et liposomes sont les plus communément utilisés.<sup>194,198</sup> En effet, les nanoparticules présentent de nombreux avantages car leur composition leur permet d'agir comme agents radiosensibilisants par exemple (nanoparticules d'or, d'oxyde de fer, d'oxyde de gadolinium...), et il est possible d'y fixer des sondes d'imagerie, des molécules thérapeutiques et même d'y ajouter un vecteur afin de combiner ciblage passif et ciblage actif. De nombreuses nanostructures sont déjà en études précliniques ou cliniques pour la délivrance de médicament (Figure 37).<sup>199,196</sup> Cependant, au vu de la taille de ces molécules, elles sont difficiles à caractériser et plusieurs études ont mis en évidence une certaine toxicité ce qui ralentit leur développement.<sup>200,201</sup>



**Figure 37.** Historique des découvertes et avancées dans le développement de nanotechnologies à destinée oncologique ; figure extraite de revue.<sup>202</sup>

De façon générale, le ciblage passif ne permet pas une imagerie très précise. Par contre, il peut être utilisé pour imager un même processus dans différentes pathologies ou différents types de cancer par exemple, contrairement au ciblage actif qui nécessite de développer un nouvel agent pour chaque nouvelle cible.

### III.3. Ciblage actif

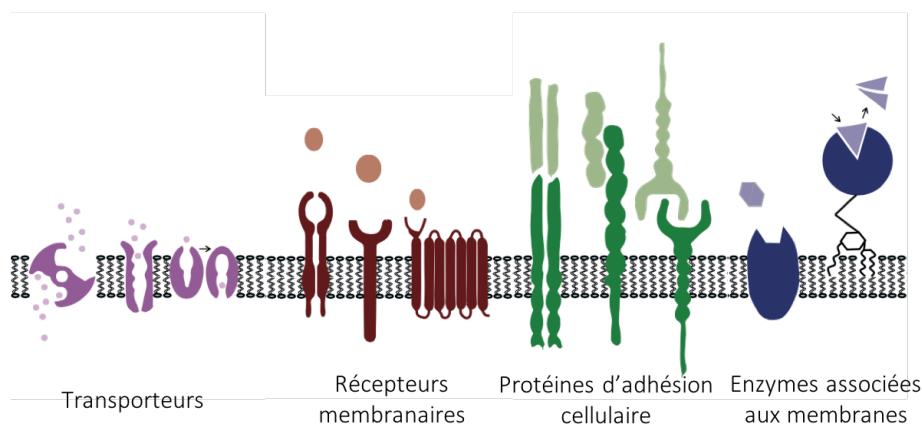
Le ciblage actif consiste à utiliser un vecteur capable de reconnaître spécifiquement une cible d'intérêt. Ce vecteur va circuler dans le système sanguin puis, après reconnaissance de sa cible, s'accumuler de façon spécifique au niveau du tissu tumoral. On parle de ciblage actif direct si la cible se trouve sur les cellules tumorales et de ciblage actif indirect si elle est surexprimée sur les néo-vaisseaux.

#### III.3.1. Types de cibles

La cible fait partie des éléments clés pour le développement d'un agent pharmaceutique. Elle doit donc être choisie avec précaution. Elle doit être spécifique de la pathologie, c'est-à-dire qu'elle doit être plus présente au niveau des cellules cancéreuses que des cellules saines, en de nombreuses copies par cellule, et répartie de façon homogène au sein de l'ensemble des cellules tumorales. Cependant, ce dernier point est assez rare car les cellules tumorales sont connues pour être très hétérogènes. Elle doit être accessible et donc se situer préférentiellement à la surface des cellules et, si possible, proche de la circulation sanguine, même si certaines molécules sont capables de traverser la membrane et peuvent donc cibler des protéines intracellulaires.<sup>203,204</sup> Enfin, il est préférable que la cible soit exprimée chez un

grand nombre de patients afin de développer un agent pharmaceutique accessible à une large population.

Comme nous l'avons décrit précédemment, de nombreux changements se manifestent lors du développement d'un cancer. Parmi eux, on compte la modification du métabolisme, la surexpression de récepteurs membranaires et d'antigènes, la modification des protéines membranaires ou encore celle du microenvironnement des tumeurs.<sup>205</sup> Toutes ces différences constituent donc des cibles potentielles. Les cibles peuvent être exprimées dans un ou plusieurs types de cancer et sont plus ou moins spécifiques. On retrouve quatre catégories majeures de cibles : les transporteurs, les récepteurs membranaires, les protéines d'adhésion cellulaire et les enzymes associées aux membranes (Figure 38).



**Figure 38.** Représentation schématique des différentes cibles potentielles pour le développement d'agent pharmaceutique vectorisé ; figure adaptée de revue.<sup>205</sup>

### **Transporteurs**

Les transporteurs du glucose (GLUT) sont une cible très utilisée pour le diagnostic de cancers. En effet, le taux de croissance des cellules cancéreuses est élevé, ce qui engendre une modification du métabolisme impliquant une glycolyse accentuée et se traduit par une augmentation de la consommation du glucose et un accroissement de l'expression des transporteurs du glucose (notamment GLUT1) dans les tumeurs.<sup>206,207</sup> Le [<sup>18</sup>F]fluorodésoxyglucose ([<sup>18</sup>F]FDG) est un analogue du glucose dont un groupement hydroxy a été remplacé par le radionucléide <sup>18</sup>F. Le [<sup>18</sup>F]FDG a obtenu une autorisation de mise sur le marché en 1998. À ce jour, c'est le radiopharmaceutique le plus utilisé pour le diagnostic et le suivi du cancer avec 90% des examens TEP.<sup>208</sup> En effet, son mode d'action non-spécifique permet de détecter de nombreuses pathologies en oncologie, neurologie, cardiologie ainsi que les processus d'inflammation et d'infection. Le [<sup>18</sup>F]FDG présente cependant quelques limitations. Certains cancers à faible taux de croissance utilisent peu le glucose et sont donc indétectables par l'injection du [<sup>18</sup>F]FDG. C'est le cas du cancer de la prostate, des tumeurs neuroendocrines et des carcinomes hépatocellulaires. De plus, de par son manque de



spécificité, tous les organes ayant un fort métabolisme (tels que le cerveau ou les intestins) montrent une activité importante en imagerie, ce qui va réduire les contrastes et empêcher le diagnostic de pathologies situées aux alentours de ces tissus. Enfin, il est difficile de différencier les tissus tumoraux des tissus inflammés ou infectés.<sup>209</sup>

Les récepteurs de folate (FR) ou récepteur à l'acide folique sont un ensemble de deux protéines membranaires liées à la membrane par un glycolipide. Ces récepteurs sont absents dans la plupart des tissus normaux mais fréquemment observés dans divers types de cancers humains.<sup>216</sup> Ces récepteurs sont considérés comme une cible pour le traitement du cancer depuis plus d'une décennie. L'utilisation de l'acide folique comme vecteur a été étudiée en préclinique et en clinique.<sup>217-219</sup>

### **Récepteurs membranaires**

Un grand nombre de récepteurs membranaires est surexprimé au niveau des cellules tumorales, ce qui en fait de bonnes cibles. De plus, des ligands endogènes s'y fixent avec de très bonnes affinités et sélectivités. Ils constituent donc des points de départ intéressants pour la conception de radiopharmaceutiques. Il existe différents types de récepteurs.

Les récepteurs couplés aux protéines G, aussi appelés RCPG, sont les plus utilisés. Ils sont en effet présents à la surface des cellules et peu présents dans les tissus sains, ce qui en fait des cibles intéressantes pour le développement d'agents pharmaceutiques pour le diagnostic et la thérapie.<sup>204,210,211</sup> Parmi eux, les récepteurs à la somatostatine sont les plus étudiés. On retrouve aussi les récepteurs à la bombésine, à la gastrine, à la cholécystokinine, et aux neurokinines qui sont impliqués dans de nombreuses tumeurs neuroendocrines.<sup>212</sup>

Pour finir, les récepteurs des facteurs de croissances appartiennent à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinases (RTK). Parmi eux, les récepteurs EGFR et HER2 sont impliqués dans les tumeurs épithéliales telles que le cancer du sein ou de l'estomac.

### **Récepteurs nucléaires**

Les récepteurs hormonaux sont une autre classe de récepteurs situés au niveau du noyau des cellules. Ils sont impliqués dans le cancer du sein, des ovaires et de la prostate. On compte parmi eux les récepteurs aux œstrogènes ou à la progestérone.<sup>213</sup>

### **Protéines d'adhésion cellulaire**

Les protéines d'adhésion cellulaire (CAM) constituent une autre famille. Parmi ces molécules on retrouve les intégrines qui sont impliquées dans de nombreuses étapes du cancer, allant de la croissance et la migration tumorale à la formation de métastases, et ceci dans un très grand nombre de cancers.<sup>214</sup> L'antigène carcinoembryonnaire (ACE ou CEA en anglais) est



utilisé comme marqueur de cancer gastro-intestinal et principalement pour la détection du cancer colorectal et de ses métastases hépatiques.<sup>215</sup>

### Enzymes associées aux membranes

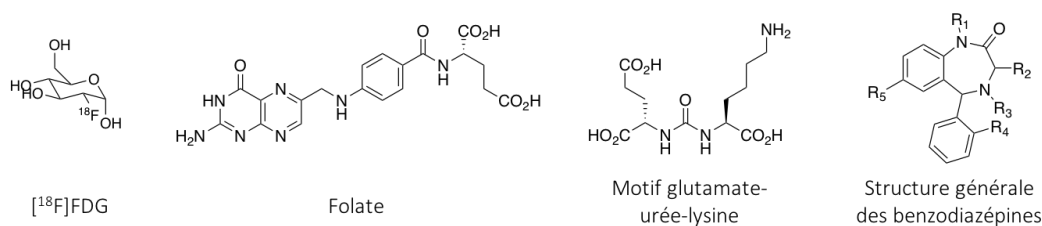
Parmi les enzymes membranaires, on retrouve la grande famille des protéases. Elles sont, entre autres, impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire pendant la migration et l'invasion. Parmi elles, on distingue la glutamate carboxypeptidase 2, communément appelée antigène membranaire spécifique de la prostate (PSMA), l'aminopeptidase N (CD13) et les métalloprotéinases de la matrice (MMPs). Hormis les protéases, on retrouve aussi d'autres enzymes telles que l'anhydrase carbonique 9 (CAIX) qui est induite par l'hypoxie et régule le pH extracellulaire.<sup>205</sup>

### III.3.2. Types de vecteurs

Comme pour le choix de la cible, la sélection du vecteur est importante. Celui-ci doit présenter une excellente affinité et spécificité pour sa cible afin de minimiser l'accumulation non-spécifique. Il doit aussi être stable et avoir de bonnes propriétés physico-chimiques. Il existe plusieurs classes de vecteurs pour le ciblage actif, souvent divisées en fonction de leur taille : les petites molécules, les peptides, les anticorps et leurs fragments, et les aptamères.<sup>28</sup>

#### Petites molécules

Les petites molécules possèdent des propriétés intéressantes. En effet, elles présentent souvent une bonne affinité pour leur récepteur, sont facilement synthétisables, fonctionnalisables et robustes. Elles peuvent parfois traverser la barrière hémato-encéphalique ce qui les rend intéressantes en neurologie. Du fait de leur petite taille, leur pharmacocinétique est très rapide et elles sont souvent éliminées par voie rénale. Cependant, un des inconvénients principaux est que l'introduction d'une sonde imageante volumineuse peut considérablement impacter leurs propriétés pharmacocinétiques et leur affinité pour leur récepteur. C'est pourquoi elles sont souvent marquées par du fluor-18 ou du carbone-11 afin de minimiser les modifications de structure. De nombreuses petites molécules sont utilisées en oncologie, en préclinique et clinique. On citera comme exemple le [<sup>18</sup>F]FDG, les dérivés de folates, les dérivés du motif glutamate-urée-lysine (EuK, ligand de la PSMA), ou encore les dérivés de benzodiazépines (Figure 39).<sup>197,220</sup>



**Figure 39.** Exemples de petites molécules utilisées comme vecteur.

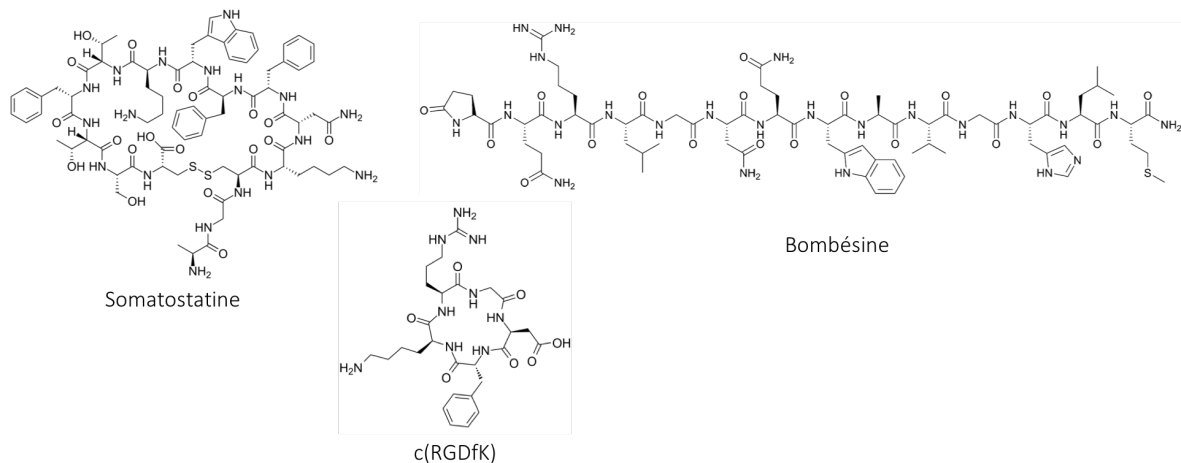
## Peptides

Les peptides sont des petits polymères d'acides aminés. De nombreuses tumeurs surexpriment des récepteurs peptidiques et particulièrement des RCPG.<sup>221</sup> Les peptides de régulations sont des peptides endogènes qui vont se lier à ces récepteurs et jouer le rôle de modulateur. On les retrouve au niveau du cerveau, du système gastro-intestinal, du système endocrinien ou vasculaire et des tissus lymphoïdes. À titre d'exemple, l'octréotide est un analogue de la somatostatine qui a été marqué à l'iode-123 en 1980, pour le diagnostic des tumeurs neuroendocrines.<sup>222</sup> Depuis ce jour, de nombreux peptides et leur récepteur ont fait l'objet de recherches pour le développement de radiopharmaceutiques à vocation diagnostique ou thérapeutique.

En effet, les peptides présentent de très nombreux avantages.<sup>204,223</sup> Pour commencer, leur synthèse et leur modification sont faciles, accessibles et robustes grâce à la chimie et à la synthèse sur phase solide (SPPS). Leur coût de production est relativement faible et nettement inférieur à celui des anticorps par exemple. Ces qualités permettent de synthétiser des bibliothèques de molécules rapidement et à des coûts raisonnables. Leur radiomarquage est en général efficace et des conditions assez drastiques peuvent être utilisées sans risquer d'altérer la molécule, contrairement aux biomolécules telles que les protéines. D'autre part, les peptides ont une excellente affinité et sélectivité pour leur récepteur (de l'ordre du nanomolaire), souvent meilleures que celles des petites molécules. Du fait de leur petite taille, leur pharmacocinétique est rapide, permettant un accès rapide aux tumeurs grâce à une bonne pénétrabilité des tissus et une clairance rapide, généralement par voie rénale. Leur petite taille leur permet aussi de pénétrer facilement au cœur des tissus tumoraux, contrairement aux grosses molécules telles que les anticorps. Des sondes d'imagerie assez volumineuses peuvent être introduites sans trop impacter la liaison aux récepteurs. La principale limite des peptides est leur sensibilité aux enzymes de type protéases qui vont rapidement les dégrader. Cependant, il est possible de réduire leur reconnaissance et leur dégradation par ces enzymes en modifiant la structure des peptides, tout en conservant une bonne affinité pour leur récepteur.<sup>224</sup> Les analogues peptidiques ayant une structure similaire aux peptides endogènes, leur immunogénicité est faible. Ces composés ne traversent habituellement pas la barrière hémato-encéphalique, ce qui les rend inutilisables pour le ciblage de tumeurs du cerveau.<sup>204</sup> À ce jour, de nombreux peptides sont étudiés en phase préclinique et en clinique pour le diagnostic ou la thérapie de très nombreux cancers (Tableau 3). Parmi eux, on retrouve les analogues de la somatostatine, de la bombésine, de la gastrine, de la neurotensine, et bien d'autres encore (Figure 40).<sup>204,210-212,225</sup>

**Tableau 3.** Exemples de peptides utilisés comme vecteurs et leur implication dans les cancers ; tableau adapté de revue.<sup>225</sup>

Récepteur	Peptide	Type de tumeur	Application
Récepteurs à la somatostatine (sst1-sst2)	Somatostatine	Tumeurs neuroendocrines, gastroentéropancréatique, lymphome non-Hodgkinien, gangliome, mélanome, cancer du sein, du cerveau, du poumon à petites cellules	Application clinique
Récepteur de peptide libérant la gastrine (BB2/GRPR)	Bombésine	Cancer de la prostate, du sein, du pancréas, du poumon à petites cellules, du colon	Étude clinique
Cholécystokinine B/récepteur à la gastrine (CCK <sub>2</sub> /CCK-B)	CCK/gastrine	Cancer de la thyroïde, du poumon à petites cellules, gastrointestinale, ovarien	Étude clinique
Récepteur au glucagon (GLP-1R)	Exendine	Insulinomes, gastrinomes, phéochromocytomes, paragangliomes et carcinomes de la thyroïde	Étude clinique
Intégrine $\alpha_v\beta_3$	c(RGDfK)	Cancer du cerveau, des poumons, des ovaires, du sein, de la peau	Étude clinique
Récepteur 1 à la mélanocortine (MC1R)	$\alpha$ -MSH	Mélanomes	Étude clinique
Récepteur à la neurotensine (NTS1)	Neurotensine	Cancer du poumon à petites cellules, du colon, du pancréas, du sein, de la prostate, sarcome d'Ewing	Étude préclinique
Récepteur au neuropeptide Y (Y1)	NPY	Cancer du sein et de la prostate	Étude préclinique
Récepteur LHRH (LHRH-R)	LHRH	Cancer de la prostate, du sein, carcinome ovarien et endométrial	Étude préclinique
Récepteur à la neurokinine (NK-1R)	Substance P	Glioblastome, astrocytome, cancer de la thyroïde, du sein, des vaisseaux sanguins	Étude clinique
Récepteur 4 de chimiokines (CXCR4)	SDF-1	Cancer lymphatique, des poumons, du sein et de la prostate	Étude clinique

**Figure 40.** Exemples de différents peptides.

## Anticorps

Les anticorps monoclonaux sont des glycoprotéines complexes constituées classiquement de quatre chaînes protéiques dont deux sont dites lourdes (H) et deux sont dites légères (L) (Figure 41). Elles sont reliées entre elles grâce à des ponts disulfures et forment un Y. L'anticorps est constitué d'un domaine constant (C) et aux extrémités des chaînes lourdes et

légères se trouve un domaine variable (V), aussi appelé paratope, qui permet la reconnaissance de l'antigène. Ces molécules, dont le poids moléculaire est d'environ 150 kDa, font partie de la famille des immunoglobulines.

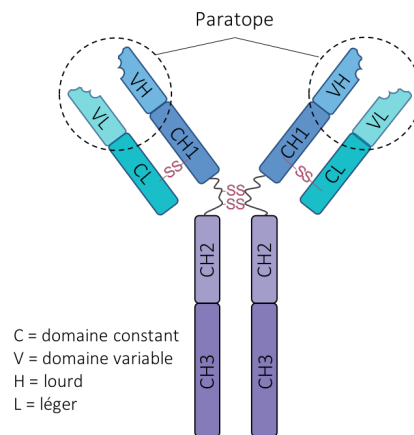


Figure 41. Représentation schématique d'un anticorps.

Cette famille de molécules présente d'excellentes affinités et un niveau de spécificité inégalé pour leur cible. Du fait de leur taille importante, leur temps de circulation est élevé ce qui permet une meilleure accumulation dans les tissus cibles, mais peut aussi être à l'origine d'une certaine toxicité pour les tissus sains. Les anticorps nécessitent l'emploi d'un radionucléide avec un temps de demi-vie long, compatible avec le leur (plusieurs jours).<sup>226</sup> L'introduction de sondes d'imagerie n'impacte que peu les propriétés pharmacocinétiques contrairement aux petites molécules. En revanche, la production des anticorps est assez difficile et onéreuse. De plus, ces molécules sont très sensibles aux conditions physico-chimiques (température, pH, concentration), ce qui les rend parfois délicates à manipuler et à radiomarquer. Les premières générations d'anticorps étaient immunogènes et déclenchaient des effets secondaires indésirables, mais les progrès et avancées technologiques ont permis le développement d'anticorps chimériques (rituximab, cetuximab), humanisés (trastuzumab, bevacizumab) ou humain (panitumumab), ce qui a nettement réduit leur toxicité.<sup>227</sup>


Les anticorps sont désormais utilisés comme vecteurs pour l'imagerie et la thérapie. Le premier anticorps pour l'imagerie du cancer colorectal et cancer du sein, [<sup>111</sup>In]In-satumomab-pendetide, a été approuvé par la FDA en 1992.<sup>228</sup> Depuis, de nombreux autres anticorps ont été approuvés et utilisés pour le diagnostic ou la thérapie de nombreux cancers ainsi que d'autres pathologies.<sup>229</sup> Initialement, la plupart des anticorps étaient marqués avec des radionucléides pour l'imagerie TEMP, bien que la TEP donne une meilleure sensibilité et résolution spatiale.<sup>230</sup> De nos jours, l'immunoTEP se développe de plus en plus avec le radiomarquage des anticorps au zirconium-89.<sup>231</sup> De par leur bonne accumulation et leur long temps de rétention dans la tumeur, les anticorps constituent une bonne stratégie pour la thérapie. L'introduction d'une molécule cytotoxique sur un anticorps conduit à la famille des « *antibody-drug conjugates* » (ADC). De très nombreuses études sur les ADC ont vu le jour ces dernières années.<sup>232-236</sup> Quelques ADC sont déjà approuvés par la FDA, on retrouve par exemple le gemtuzumab-ozogamicine pour le traitement de la leucémie, l'ibritumomab

marqué à l'yttrium-90 ou le vedotin-brentuximab pour le traitement de lymphome non-Hodgkinien.<sup>227</sup> De nombreux anticorps sont aussi développés à visée théranostique.<sup>237</sup>

Afin de bénéficier des avantages (excellentes affinité, sélectivité et stabilité métabolique) des anticorps, sans leurs inconvénients (long temps de circulation), de nouvelles familles de vecteurs ont été développées. Il s'agit de fragments d'anticorps ou de petites protéines d'affinité artificielles (non-basées sur une structure immunoglobuline), plus petits que les anticorps mais conservant les mêmes propriétés de liaison.

### **Fragments, petites protéines et aptamères**

La production des fragments d'anticorps consiste à supprimer les domaines constants C des anticorps et à conserver les domaines variables,  $V_H$  et/ou  $V_L$ , capables de reconnaître l'antigène et de s'y lier. Cela simplifie les molécules et permet d'obtenir des composés plus petits qui auront une bonne affinité, tout en ayant un temps de demi-vie inférieur aux anticorps. L'objectif est ici d'améliorer la qualité des images en réduisant le temps de circulation et la rétention dans les organes sains, *via* l'augmentation de la vitesse de clairance. Ces fragments d'anticorps sont obtenus par digestion enzymatique des anticorps ou par bioingénierie, sous forme recombinante. Parmi eux, on retrouve les  $F(ab')_2$ , les minibody, les Fab, les diabody, les scFv et les nanobody (Figure 42).<sup>238,239</sup>



Format	Composition	Valence	Taille (kDa)	$t_{1/2}$ serum	Elimination
IgG intact	-	Bivalent	150	1 à 3 semaines	Hépatique
$F(ab')_2$	$(V_H C_{H1} + V_L C_L)_2$	Bivalent	110	8-10 h	Hépatique
Minibody	$(scFv + C_{H3})_2$	Bivalent	75	5-10 h	Hépatique
Fab	$V_H C_{H1} + V_L C_L$	Monovalent	55	12-20 h	Rénale
Diabody	$(scFv)_2$	Bivalent	50	3-5 h	Rénale
scFv	$V_H + V_L$	Monovalent	28	2-4 h	Rénale
Nanobody	$V_H H$ (chameau)	Monovalent	12-15	30-60 min	Rénale

**Figure 42.** Représentation et caractéristiques des différents fragments d'anticorps ; figure adaptée de revue.<sup>240</sup>

Plusieurs études utilisant des fragments d'anticorps ont montré que ce type de vecteur présentait une vitesse de clairance rapide, avec une clairance par voie rénale pour les composés de moins de 60 kDa et permettait donc l'obtention d'images avec de meilleurs contrastes à des temps plus courts post-injection (< 24 h).<sup>240</sup> De nombreuses études se portent sur l'utilisation de  $F(ab')_2$ ,<sup>241-243</sup> minibody,<sup>244</sup> Fab,<sup>245</sup> diabody<sup>246</sup> et les scFv pour le diagnostic de cancers.<sup>247</sup>

Les nanobody ou  $V_H H$  sont les plus petites structures d'un anticorps capables de lier un antigène (12-15 kDa).<sup>248,249</sup> Ils sont constitués d'une seule chaîne lourde d'anticorps de

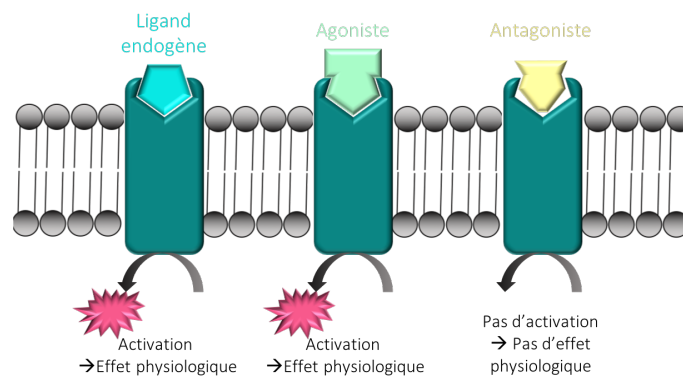
chateau. De nombreuses équipes étudient ces V<sub>H</sub>H pour l'imagerie ou la thérapie de cancers.<sup>250–252</sup>

Une alternative à l'utilisation de fragments d'anticorps est le développement de nouvelles protéines par bioingénierie. Ces molécules sont basées sur la structure de protéines robustes auxquelles quelques modifications vont être apportées afin de générer des régions de reconnaissance et présenter de bonnes affinité et spécificité pour l'antigène. De par leur petite taille, ces molécules peuvent pénétrer dans les tumeurs et leur clairance est plus rapide que celle d'un anticorps. De plus, ce sont des molécules robustes, capables de résister aux conditions dures parfois nécessaires au radiomarquage, et de retrouver aisément leur structure tridimensionnelle bioactive.<sup>253,254</sup> Les familles des Affibodies<sup>255,256</sup> et DARPins<sup>257</sup> sont très étudiées pour le diagnostic ou la thérapie de diverses pathologies.

Les aptamères constituent une autre classe de vecteurs. Ce sont des oligonucléotides d'ADN ou ARN simple brin constitués de 20 à 100 nucléotides. Ils possèdent une très bonne capacité de ciblage, leur synthèse chimique est aisée et ils ne présentent pas d'immunogénicité. Cependant ils présentent des problèmes de stabilité *in vivo* et leur taille et leur charge (polyphosphodiester) ne leur permettent pas de passer les membranes. Ces composés commencent à se trouver une place dans la pharmacopée. Un premier aptamère, Pegaptanib, a été approuvé par la FDA en 2004 pour le traitement de la dégénérescence maculaire.<sup>28</sup> À ce jour, plusieurs articles décrivent l'étude d'aptamères comme agents d'imagerie.<sup>258</sup>

### III.4. Agonistes et antagonistes

Les molécules vectrices ciblant les récepteurs membranaires peuvent être classées en deux grandes catégories : les molécules agonistes et les molécules antagonistes. Il est important de prendre cela en considération lors du développement d'un agent d'imagerie. Une molécule agoniste se lie à son récepteur et l'active en mimant l'action du ligand endogène, ce qui va induire des effets physiologiques. En revanche, une molécule antagoniste va se lier au récepteur et bloquer ou diminuer les effets physiologiques (Figure 43).



**Figure 43.** Représentation schématique d'un agoniste et d'un antagoniste.

À des doses thérapeutiques, une molécule agoniste peut induire des effets secondaires en activant le récepteur mais, aux doses utilisées en imagerie nucléaire, cet effet est négligeable.<sup>223,225,259</sup> L'utilisation d'agonistes a longtemps été privilégiée car les molécules agonistes peuvent être internalisées dans les cellules, ce qui présente un intérêt majeur pour l'imagerie ou la thérapie. En effet, le radionucléide s'accumule dans la cellule, ce qui ralentit son élimination. Cependant, de récentes études ont montré que les antagonistes présentaient également des avantages. H. Maecke, J.C. Reubi et leurs collaborateurs ont évalué deux composés marqués à l'indium-111, un agoniste et l'autre antagoniste des récepteurs à la somatostatine. Malgré une affinité moins bonne de l'antagoniste pour le récepteur, sa rétention tumorale a été deux fois supérieure.<sup>260</sup> Ces résultats ont été confirmés dans une autre étude comparant un agoniste et un antagoniste des récepteurs à la bombésine marqués au technétium-99m.<sup>261</sup> Une explication de ce phénomène serait que les sites de liaisons des antagonistes aux récepteurs sont plus nombreux et indépendants de l'état d'activation du récepteur.<sup>262</sup> En 2011, l'équipe de Wild a montré pour la première fois qu'il est possible d'imager des tumeurs endocrines chez l'homme grâce à un antagoniste des récepteurs à la somatostatine.<sup>263</sup>

## IV. Optimisation des sondes d'imagerie

Comme nous l'avons montré tout au long de cette introduction, de nombreux critères doivent être pris en considération lors de l'élaboration d'un nouvel agent pharmaceutique et de nombreux facteurs peuvent influencer les performances d'un composé.

En résumé, le radiopharmaceutique idéal doit pouvoir être préparé par une voie de synthèse simple et facile à développer. Il doit aussi être facilement radiomarquable ou robuste, afin de supporter des conditions de radiomarquage assez dures. De plus, l'affinité ainsi que la spécificité pour sa cible doivent être élevées. Le composé doit aussi présenter des propriétés physico-chimiques lui permettant de pénétrer dans les tumeurs et montrer un bon profil pharmacocinétique. On entend par là qu'il doit s'accumuler rapidement et en grande quantité dans la tumeur, mais aussi montrer une rapide clairance des tissus sains et du sang. La voie d'élimination rénale est privilégiée par rapport à la voie hépatique. Enfin, le radiopharmaceutique doit être stable dans les conditions physiologiques, ne pas être immunogène et ne pas engendrer d'effets secondaires.

Les problèmes les plus fréquemment rencontrés lors du développement d'un radiopharmaceutique sont :

- le manque d'affinité ou de spécificité pour la cible. En effet l'ajout de sondes imageantes ou thérapeutiques sur une molécule peut grandement modifier sa structure et donc son affinité ;

- une faible accumulation dans la tumeur et un temps de circulation dans les organes sains et le sang trop élevé. Ceci est souvent dû aux propriétés physico-chimiques de la molécule (charge, lipophilie, taille) ;
- une mauvaise stabilité métabolique due à une dégradation par les enzymes endogènes.

Pour pallier ces problèmes, plusieurs possibilités pour optimiser un radiopharmaceutique existent. Il est possible de jouer sur la structure et la taille du vecteur pour améliorer l'affinité et la stabilité. Les points d'attachement ainsi que les techniques utilisées pour lier le vecteur et les sondes d'imagerie peuvent aussi faire varier l'affinité. La charge et la lipophilie globales de la molécule sont aussi des paramètres modifiables pour améliorer les propriétés pharmacocinétiques.

## V. Projets de recherche

Comme nous avons pu le voir dans cette introduction, le développement d'agents de ciblage efficaces pour la détection et le traitement du cancer nécessite une attention toute particulière. L'objectif de ces trois années de recherche a donc été de concevoir, d'optimiser et de développer de nouveaux agents d'imagerie à visée diagnostique et/ou thérapeutique pour le cancer.

Dans cette optique, le premier projet a consisté à développer un agent d'imagerie bimodal TEP et fluorescence, et d'optimiser ses propriétés pharmacocinétiques afin de permettre le diagnostic et la chirurgie assistée par fluorescence du cancer du pancréas (Figure 44). Comme nous l'avons vu précédemment, la lipophilie et l'introduction de sondes imageantes volumineuses peuvent largement impacter le profil pharmacocinétique d'une molécule. C'est pourquoi, sur un vecteur de type peptide agoniste, ont été introduits un chélate, plusieurs sondes fluorescentes différentes et des espaceurs de taille variable afin de modifier les profils de biodistribution. Les différents composés ont été évalués *in vitro* et *in vivo* pour conduire à l'élaboration d'un composé prometteur. Ces travaux seront présentés dans le chapitre 1.

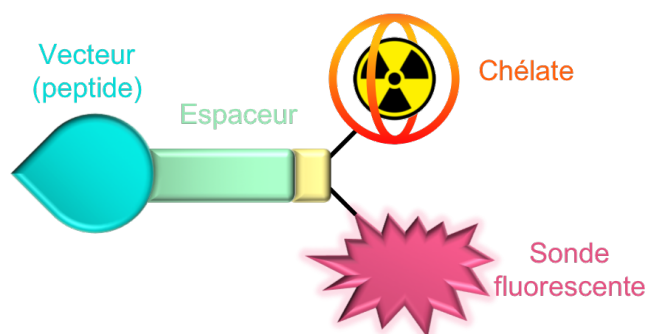
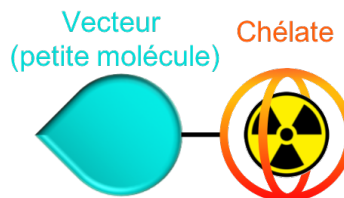


Figure 44. Représentation schématique du composé bimodal développé dans le chapitre 1.



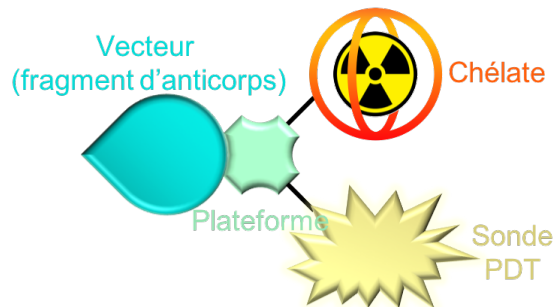
La lipophilie ainsi que la charge globale d'une molécule sont deux paramètres influençant la biodistribution d'un composé. Le deuxième chapitre présentera un projet consistant à optimiser une petite molécule antagoniste en évaluant de nombreux agents chélatants et leur impact sur les propriétés pharmacocinétiques du composé, afin de concevoir un agent d'imagerie TEP pour le diagnostic du cancer du pancréas (Figure 45). L'évaluation *in vitro* et *in vivo* de ces composés sera présentée dans ce deuxième chapitre.



---

**Figure 45.** Représentation schématique du composé développé dans le chapitre 2.

Enfin, le troisième chapitre présente le développement et l'évaluation *in vitro* et *in vivo* d'un conjugué bimodal destiné au diagnostic TEMP et à la thérapie photodynamique du cancer du sein. En utilisant une approche plateforme, les deux modalités ont été introduites de façon site-spécifique sur un fragment d'anticorps (Figure 46).



---

**Figure 46.** Représentation schématique du composé bimodal développé dans le chapitre 3.

## Références

- (1) OMS | Cancer <http://www.who.int/topics/cancer/fr/> (accessed Apr 3, 2020).
- (2) Cancer today <http://gco.iarc.fr/today/home> (accessed Apr 10, 2020).
- (3) Cancer Statistics - National Cancer Institute <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics> (accessed Apr 10, 2020).
- (4) Danaei, G.; Vander Hoorn, S.; Lopez, A. D.; Murray, C. J. L.; Ezzati, M.; Comparative Risk Assessment collaborating group (Cancers). Causes of Cancer in the World: Comparative Risk Assessment of Nine Behavioural and Environmental Risk Factors. *Lancet* **2005**, *366* (9499), 1784–1793. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67725-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67725-2).
- (5) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- (6) McAllister, S. S.; Weinberg, R. A. Tumor-Host Interactions: A Far-Reaching Relationship. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28* (26), 4022–4028. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.4257>.
- (7) Welch, H. G.; Kramer, B. S.; Black, W. C. Epidemiologic Signatures in Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381* (14), 1378–1386. <https://doi.org/10.1056/NEJMSr1905447>.
- (8) Cancer : le diagnostic | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer <https://www.fondation-arc.org/cancer-le-diagnostic> (accessed Apr 3, 2020).
- (9) How a Brain Tumor Is Diagnosed <https://www.verywellhealth.com/diagnosing-brain-tumors-2488741> (accessed Apr 9, 2020).
- (10) Beauchemin, N.; Arabzadeh, A. Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecules (CEACAMs) in Cancer Progression and Metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **2013**, *32* (3–4), 643–671. <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9444-6>.
- (11) Zhang, S.-J.; Sun, Z.-Y. [Correlation of prostate-specific antigen with the progression and metastasis of human prostate cancer]. *Zhonghua Nan Ke Xue* **2018**, *24* (5), 457–461.
- (12) Esfandiari, N. H.; Papaleontiou, M. Biochemical Testing in Thyroid Disorders. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **2017**, *46* (3), 631–648. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2017.04.002>.
- (13) Telloni, S. M. Tumor Staging and Grading: A Primer. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1606*, 1–17. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6_1).
- (14) Traitements du cancer | Fondation contre le Cancer <https://www.cancer.be/le-cancer/traitements-du-cancer> (accessed Apr 3, 2020).
- (15) Cancer : les traitements et les soins de support | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer <https://www.fondation-arc.org/traitements-soins-cancer/cancer-traitements-soins-de-support> (accessed Apr 3, 2020).
- (16) Traitement cancer - Les différents traitements du cancer | Roche <https://www.roche.fr/fr/patients/info-patients-cancer/traitement-cancer/traitements-cancer.html> (accessed Apr 3, 2020).
- (17) Wyld, L.; Audisio, R. A.; Poston, G. J. The Evolution of Cancer Surgery and Future Perspectives. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2015**, *12* (2), 115–124. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.191>.
- (18) Tukagoshi, S. [Cancer chemotherapy; past, present and future--from the aspect of fundamental studies]. *Gan To Kagaku Ryoho* **2003**, *30* (10), 1398–1403.
- (19) Schaeue, D.; McBride, W. H. Opportunities and Challenges of Radiotherapy for Treating Cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2015**, *12* (9), 527–540. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.120>.
- (20) Kassis, A. I.; Adelstein, S. J. Radiobiologic Principles in Radionuclide Therapy. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46* (Suppl 1), 4S-12S.
- (21) Wyszomirska, A. Iodine-131 for Therapy of Thyroid Diseases. Physical and Biological Basis. *Nucl. Med. Rev. Cent. East. Eur.* **2012**, *15* (2), 120–123.
- (22) Rizzieri, D. Zevalin® (Ibritumomab Tiuxetan): After More than a Decade of Treatment Experience, What Have We Learned? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2016**, *105*, 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.07.008>.

- (23) Bertelli, G.; Paridaens, R. Optimal Sequence of Hormonotherapy in Advanced Breast Cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **2006**, *18* (6), 572–577. <https://doi.org/10.1097/01.cco.0000245313.97638.1d>.
- (24) Pronzato, P.; Rondini, M. Hormonotherapy of Advanced Prostate Cancer. *Ann. Oncol.* **2005**, *16 Suppl 4*, iv80–84. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdi913>.
- (25) Yang, Y. Cancer Immunotherapy: Harnessing the Immune System to Battle Cancer. *J. Clin. Invest.* **2015**, *125* (9), 3335–3337. <https://doi.org/10.1172/JCI83871>.
- (26) Granier, C.; Karaki, S.; Roussel, H.; Badoual, C.; Tran, T.; Anson, M.; Fabre, E.; Oudard, S.; Tartour, E. [Cancer immunotherapy: Rational and recent breakthroughs]. *Rev. Med. Interne* **2016**, *37* (10), 694–700. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2016.05.023>.
- (27) Jackson, S. E.; Chester, J. D. Personalised Cancer Medicine. *Int. J. Cancer* **2015**, *137* (2), 262–266. <https://doi.org/10.1002/ijc.28940>.
- (28) James, M. L.; Gambhir, S. S. A Molecular Imaging Primer: Modalities, Imaging Agents, and Applications. *Physiol. Rev.* **2012**, *92* (2), 897–965. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2010>.
- (29) Weissleder, R. Molecular Imaging in Cancer. *Science* **2006**, *312* (5777), 1168–1171. <https://doi.org/10.1126/science.1125949>.
- (30) Murphy, P. S.; McCarthy, T. J.; Dzik-Jurasz, A. S. K. The Role of Clinical Imaging in Oncological Drug Development. *Br. J. Radiol.* **2008**, *81* (969), 685–692. <https://doi.org/10.1259/bjr/16768437>.
- (31) Law, G.-L.; Wong, W.-T. An Introduction to Molecular Imaging. In *The Chemistry of Molecular Imaging*; John Wiley & Sons, Ltd, 2014; pp 1–24. <https://doi.org/10.1002/9781118854754.ch1>.
- (32) Jaffer, F. A.; Weissleder, R. Molecular Imaging in the Clinical Arena. *JAMA* **2005**, *293* (7), 855–862. <https://doi.org/10.1001/jama.293.7.855>.
- (33) Pichler, B. J.; Wehrl, H. F.; Judenhofer, M. S. Latest Advances in Molecular Imaging Instrumentation. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49* (Suppl 2), 5S-23S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.045880>.
- (34) Perry, R. L. Principles of Conventional Radiography and Fluoroscopy. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **1993**, *23* (2), 235–252. [https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(93\)50026-8](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(93)50026-8).
- (35) Bansal, T.; Beese, R. Interpreting a Chest X-Ray. *Br. J. Hosp. Med. (Lond)* **2019**, *80* (5), C75–C79. <https://doi.org/10.12968/hmed.2019.80.5.C75>.
- (36) Lusic, H.; Grinstaff, M. W. X-Ray-Computed Tomography Contrast Agents. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (3), 1641–1666. <https://doi.org/10.1021/cr200358s>.
- (37) Reuveni, T.; Motiei, M.; Romman, Z.; Popovtzer, A.; Popovtzer, R. Targeted Gold Nanoparticles Enable Molecular CT Imaging of Cancer: An in Vivo Study. *Int. J. Nanomedicine* **2011**, *6*, 2859–2864. <https://doi.org/10.2147/IJN.S25446>.
- (38) Rabin, O.; Manuel Perez, J.; Grimm, J.; Wojtkiewicz, G.; Weissleder, R. An X-Ray Computed Tomography Imaging Agent Based on Long-Circulating Bismuth Sulphide Nanoparticles. *Nat. Mater.* **2006**, *5* (2), 118–122. <https://doi.org/10.1038/nmat1571>.
- (39) Lu, Y.-C.; Yang, C.-X.; Yan, X.-P. Radiopaque Tantalum Oxide Coated Persistent Luminescent Nanoparticles as Multimodal Probes for in Vivo Near-Infrared Luminescence and Computed Tomography Bioimaging. *Nanoscale* **2015**, *7* (42), 17929–17937. <https://doi.org/10.1039/C5NR05623C>.
- (40) Sun, C.; Veisoh, O.; Gunn, J.; Fang, C.; Hansen, S.; Lee, D.; Sze, R.; Ellenbogen, R. G.; Olson, J.; Zhang, M. In Vivo MRI Detection of Gliomas by Chlorotoxin-Conjugated Superparamagnetic Nanoprobes. *Small* **2008**, *4* (3), 372–379. <https://doi.org/10.1002/sml.200700784>.
- (41) Rodgers, C. T.; Clarke, W. T.; Snyder, C.; Vaughan, J. T.; Neubauer, S.; Robson, M. D. Human Cardiac 31P Magnetic Resonance Spectroscopy at 7 Tesla. *Magn. Reson. Med.* **2014**, *72* (2), 304–315. <https://doi.org/10.1002/mrm.24922>.
- (42) Gallagher, F. A.; Kettunen, M. I.; Brindle, K. M. Imaging PH with Hyperpolarized 13C. *NMR Biomed.* **2011**, *24* (8), 1006–1015. <https://doi.org/10.1002/nbm.1742>.
- (43) Regatte, R. R. Advances in Sodium MRI: Biomedical Applications from Head to Foot. *NMR Biomed* **2016**, *29* (2), 94–95. <https://doi.org/10.1002/nbm.3407>.
- (44) Tirota, I.; Dichiarante, V.; Pigliacelli, C.; Cavallo, G.; Terraneo, G.; Bombelli, F. B.; Metrangolo, P.; Resnati, G. (19)F Magnetic Resonance Imaging (MRI): From Design of Materials to Clinical Applications. *Chem. Rev.* **2015**,

115 (2), 1106–1129. <https://doi.org/10.1021/cr500286d>.

(45) Liu, Y.; Zhang, Y.; Wu, C.; Zhu, J.; Wang, C.; Tomko, N.; Linetsky, M. D.; Salomon, R. G.; Ramos-Estebanez, C.; Wang, Y.; Yu, X. High-Resolution Dynamic Oxygen-17 MR Imaging of Mouse Brain with Golden-Ratio-Based Radial Sampling and k-Space-Weighted Image Reconstruction. *Magn. Reson. Med.* **2018**, *79* (1), 256–263. <https://doi.org/10.1002/mrm.26669>.

(46) Cheng, W.; Ping, Y.; Zhang, Y.; Chuang, K.-H.; Liu, Y. Magnetic Resonance Imaging (MRI) Contrast Agents for Tumor Diagnosis. *J. Healthc. Eng.* **2013**, *4* (1), 23–45. <https://doi.org/10.1260/2040-2295.4.1.23>.

(47) Lohrke, J.; Frenzel, T.; Endrikat, J.; Alves, F. C.; Grist, T. M.; Law, M.; Lee, J. M.; Leiner, T.; Li, K.-C.; Nikolaou, K.; Prince, M. R.; Schild, H. H.; Weinreb, J. C.; Yoshikawa, K.; Pietsch, H. 25 Years of Contrast-Enhanced MRI: Developments, Current Challenges and Future Perspectives. *Adv. Ther.* **2016**, *33* (1), 1–28. <https://doi.org/10.1007/s12325-015-0275-4>.

(48) Caravan, P. Strategies for Increasing the Sensitivity of Gadolinium Based MRI Contrast Agents. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35* (6), 512–523. <https://doi.org/10.1039/B510982P>.

(49) Ibrahim, M. A.; Hazhirkarzar, B.; Dublin, A. B. Magnetic Resonance Imaging (MRI) Gadolinium. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2020.

(50) Yon, M.; Bilotey, C.; Marty, J.-D. Gadolinium-Based Contrast Agents: From Gadolinium Complexes to Colloidal Systems. *Int. J. Pharm.* **2019**, *569*, 118577. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118577>.

(51) Vuong, Q. L.; Gillis, P.; Roch, A.; Gossuin, Y. Magnetic Resonance Relaxation Induced by Superparamagnetic Particles Used as Contrast Agents in Magnetic Resonance Imaging: A Theoretical Review. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2017**, *9* (6). <https://doi.org/10.1002/wnan.1468>.

(52) Dulińska-Litewka, J.; Łazarczyk, A.; Hałubiec, P.; Szafranski, O.; Karnas, K.; Karewicz, A. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles-Current and Prospective Medical Applications. *Materials (Basel)* **2019**, *12* (4). <https://doi.org/10.3390/ma12040617>.

(53) Rogosnitzky, M.; Branch, S. Gadolinium-Based Contrast Agent Toxicity: A Review of Known and Proposed Mechanisms. *Biometals* **2016**, *29* (3), 365–376. <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9931-7>.

(54) de Leon, A.; Perera, R.; Nittayacharn, P.; Cooley, M.; Jung, O.; Exner, A. A. Ultrasound Contrast Agents and Delivery Systems in Cancer Detection and Therapy. *Adv. Cancer Res.* **2018**, *139*, 57–84. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2018.04.002>.

(55) Hunt, D.; Romero, J. Contrast-Enhanced Ultrasound. *Magn. Reson. Imaging. Clin. N. Am.* **2017**, *25* (4), 725–736. <https://doi.org/10.1016/j.mric.2017.06.004>.

(56) Willmann, J. K.; Paulmurugan, R.; Chen, K.; Gheysens, O.; Rodriguez-Porcel, M.; Lutz, A. M.; Chen, I. Y.; Chen, X.; Gambhir, S. S. US Imaging of Tumor Angiogenesis with Microbubbles Targeted to Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Type 2 in Mice. *Radiology* **2008**, *246* (2), 508–518. <https://doi.org/10.1148/radiol.2462070536>.

(57) Wang, J.; Qin, B.; Chen, X.; Wagner, W. R.; Villanueva, F. S. Ultrasound Molecular Imaging of Angiogenesis Using Vascular Endothelial Growth Factor-Conjugated Microbubbles. *Mol. Pharm.* **2017**, *14* (3), 781–790. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b01033>.

(58) Deshpande, N.; Pysz, M. A.; Willmann, J. K. Molecular Ultrasound Assessment of Tumor Angiogenesis. *Angiogenesis* **2010**, *13* (2), 175–188. <https://doi.org/10.1007/s10456-010-9175-z>.

(59) The Nobel Prize in Chemistry 1935 <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1935/summary/> (accessed Apr 4, 2020).

(60) Lawrence, E. O.; Livingston, M. S. The Production of High Speed Light Ions Without the Use of High Voltages. *Phys. Rev.* **1932**, *40* (1), 19–35. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.40.19>.

(61) Long, T. Dec. 24, 1936: Radiation Used to Treat Disease for the First Time. *Wired*. December 24, 2007.

(62) Werner, S. C.; Quimby, E. The Use of Radioactive Iodine (I131) in the Study of Normal and Disordered Thyroid Function in Man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1948**, *8* (7), 597.

(63) Gottschalk, A. The Early Years with Hal Anger. *Semin Nucl Med* **1996**, *26* (3), 171–179. [https://doi.org/10.1016/s0001-2998\(96\)80022-5](https://doi.org/10.1016/s0001-2998(96)80022-5).

(64) Auger electron spectroscopy <https://www.maths.tcd.ie/~bmurphy/thesis/thesis1.html> (accessed Apr 9, 2020).

- (65) Bonte, F. J. Commentary: The Evolution of Nuclear Medicine. *J. Nucl. Med.* **1995**, *36* (10), 26N-27N.
- (66) Kuhl, D. E.; Edwards, R. Q. Image Separation Radioisotope Scanning. *Radiology* **1963**, *80* (4), 653–662. <https://doi.org/10.1148/80.4.653>.
- (67) Ananias, H. J. K.; Yu, Z.; Dierckx, R. A.; van der Wiele, C.; Helfrich, W.; Wang, F.; Yan, Y.; Chen, X.; de Jong, I. J.; Elsinga, P. H. 99mTechnetium-HYNIC(Tricine/TPPTS)-Aca-Bombesin(7–14) as a Targeted Imaging Agent with MicroSPECT in a PC-3 Prostate Cancer Xenograft Model. *Mol. Pharmaceutics* **2011**, *8* (4), 1165–1173. <https://doi.org/10.1021/mp200014h>.
- (68) Henzlova, M. J. SPECT: Workhorse of State of the Art Nuclear Cardiology. *J. Nucl. Cardiol.* **2018**, *25* (1), 195–197. <https://doi.org/10.1007/s12350-017-1001-1>.
- (69) Abikhzer, G.; Keidar, Z. SPECT/CT and Tumour Imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2014**, *41* Suppl 1, S67-80. <https://doi.org/10.1007/s00259-013-2534-4>.
- (70) Ciarmiello, A.; Giovannini, E.; Meniconi, M.; Cuccurullo, V.; Gaeta, M. C. Hybrid SPECT/CT Imaging in Neurology. *Curr. Radiopharm.* **2014**, *7* (1), 5–11. <https://doi.org/10.2174/1874471007666140821152401>.
- (71) Rahmim, A.; Zaidi, H. PET versus SPECT: Strengths, Limitations and Challenges. *Nucl. Med. Commun.* **2008**, *29* (3), 193–207. <https://doi.org/10.1097/MNM.0b013e3282f3a515>.
- (72) Anger, H.; Gottschalk, A. Localization of Brain Tumors with the Positron Scintillation Camera. *J. Nucl. Med.* **1963**, *4*, 326–330.
- (73) Phelps, M. E.; Hoffman, E. J.; Mullani, N. A.; Ter-Pogossian, M. M. Application of Annihilation Coincidence Detection to Transaxial Reconstruction Tomography. *J. Nucl. Med.* **1975**, *16* (3), 210–224.
- (74) Blower, P. J. A Nuclear Chocolate Box: The Periodic Table of Nuclear Medicine. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (11), 4819–4844. <https://doi.org/10.1039/C4DT02846E>.
- (75) Ziegler, S. I. Positron Emission Tomography: Principles, Technology, and Recent Developments. *Nuclear Physics A* **2005**, *752*, 679–687. <https://doi.org/10.1016/j.nuclphysa.2005.02.067>.
- (76) Vaquero, J. J.; Kinahan, P. Positron Emission Tomography: Current Challenges and Opportunities for Technological Advances in Clinical and Preclinical Imaging Systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2015**, *17* (1), 385–414. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071114-040723>.
- (77) Ametamey, S. M.; Honer, M.; Schubiger, P. A. Molecular Imaging with PET. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (5), 1501–1516. <https://doi.org/10.1021/cr0782426>.
- (78) Kumar, R.; Halanaik, D.; Malhotra, A. Clinical Applications of Positron Emission Tomography-Computed Tomography in Oncology. *Indian J. Cancer* **2010**, *47* (2), 100–119. <https://doi.org/10.4103/0019-509X.62997>.
- (79) Gourni, E.; Canovas, C.; Goncalves, V.; Denat, F.; Meyer, P. T.; Maecke, H. R. (R)-NODAGA-PSMA: A Versatile Precursor for Radiometal Labeling and Nuclear Imaging of PSMA-Positive Tumors. *PLoS ONE* **2015**, *10* (12), e0145755. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145755>.
- (80) Kumar, V.; Boddeti, D. K. (68)Ga-Radiopharmaceuticals for PET Imaging of Infection and Inflammation. *Recent Results Cancer Res.* **2013**, *194*, 189–219. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-27994-2\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-642-27994-2_11).
- (81) Werner, R. A.; Chen, X.; Rowe, S. P.; Lapa, C.; Javadi, M. S.; Higuchi, T. Recent Paradigm Shifts in Molecular Cardiac Imaging-Establishing Precision Cardiology through Novel 18F-Labeled PET Radiotracers. *Trends Cardiovasc. Med.* **2020**, *30* (1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2019.02.007>.
- (82) Anderson, C. J.; Bulte, J. W. M.; Chen, K.; Chen, X.; Khaw, B.-A.; Shokeen, M.; Wooley, K. L.; VanBrocklin, H. F. Design of Targeted Cardiovascular Molecular Imaging Probes. *J. Nucl. Med.* **2010**, *51* Suppl 1, 3S-17S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.068130>.
- (83) Herholz, K.; Heiss, W. D. Positron Emission Tomography in Clinical Neurology. *Mol. Imaging Biol.* **2004**, *6* (4), 239–269. <https://doi.org/10.1016/j.mibio.2004.05.002>.
- (84) Xiong, K.-L.; Yang, Q.-W.; Gong, S.-G.; Zhang, W.-G. The Role of Positron Emission Tomography Imaging of Beta-Amyloid in Patients with Alzheimer's Disease. *Nucl. Med. Commun.* **2010**, *31* (1), 4–11. <https://doi.org/10.1097/mnm.0b013e32833019f3>.
- (85) Kostelnik, T. I.; Orvig, C. Radioactive Main Group and Rare Earth Metals for Imaging and Therapy. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 902–956. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00294>.
- (86) Anderson, C. J.; Welch, M. J. Radiometal-Labeled Agents (Non-Technetium) for Diagnostic Imaging. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (9), 2219–2234. <https://doi.org/10.1021/cr980451q>.



- (87) Bhattacharyya, S.; Dixit, M. Metallic Radionuclides in the Development of Diagnostic and Therapeutic Radiopharmaceuticals. *Dalton Trans.* **2011**, *40* (23), 6112–6128. <https://doi.org/10.1039/C1DT10379B>.
- (88) Brasse, D.; Nonat, A. Radiometals: Towards a New Success Story in Nuclear Imaging? *Dalton Trans.* **2015**, *44* (11), 4845–4858. <https://doi.org/10.1039/C4DT02911A>.
- (89) Qaim, S. M. Therapeutic Radionuclides and Nuclear Data. *Radiochim. Acta* **2001**, *89* (4–5). <https://doi.org/10.1524/ract.2001.89.4-5.297>.
- (90) Yeong, C.-H.; Cheng, M.; Ng, K.-H. Therapeutic Radionuclides in Nuclear Medicine: Current and Future Prospects. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2014**, *15* (10), 845–863. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1400131>.
- (91) Makvandi, M.; Dupis, E.; Engle, J. W.; Nortier, F. M.; Fassbender, M. E.; Simon, S.; Birnbaum, E. R.; Atcher, R. W.; John, K. D.; Rixe, O.; Norenberg, J. P. Alpha-Emitters and Targeted Alpha Therapy in Oncology: From Basic Science to Clinical Investigations. *Target Oncol.* **2018**, *13* (2), 189–203. <https://doi.org/10.1007/s11523-018-0550-9>.
- (92) Deng, X.; Rong, J.; Wang, L.; Vasdev, N.; Zhang, L.; Josephson, L.; Liang, S. H. Chemistry for Positron Emission Tomography: Recent Advances in 11 C-, 18 F-, 13 N-, and 15 O-Labeling Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (9), 2580–2605. <https://doi.org/10.1002/anie.201805501>.
- (93) Miller, P. W.; Long, N. J.; Vilar, R.; Gee, A. D. Synthesis of 11C, 18F, 15O, and 13N Radiolabels for Positron Emission Tomography. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47* (47), 8998–9033. <https://doi.org/10.1002/anie.200800222>.
- (94) Price, E. W.; Orvig, C. Matching Chelators to Radiometals for Radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (1), 260–290. <https://doi.org/10.1039/C3CS60304K>.
- (95) Price, T. W.; Greenman, J.; Stasiuk, G. J. Current Advances in Ligand Design for Inorganic Positron Emission Tomography Tracers 68Ga, 64Cu, 89Zr and 44Sc. *Dalton Trans.* **2016**, *45* (40), 15702–15724. <https://doi.org/10.1039/C5DT04706D>.
- (96) Kim, Y. J.; Kim, Y.-I. Therapeutic Responses and Survival Effects of 177Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy in Metastatic Castrate-Resistant Prostate Cancer: A Meta-Analysis. *Clin. Nucl. Med.* **2018**, *43* (10), 728–734. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000002210>.
- (97) Photophysique des Protéines fluorescentes - <http://www.ibs.fr/recherche/groupes-de-recherche/groupe-dynamique-et-cinetique-des-processus-moleculaires-m-weik/equipe-pixel/photophysique-des-proteines/article/photophysique-des-proteines> (accessed Apr 9, 2020).
- (98) Alford, R.; Simpson, H. M.; Duberman, J.; Hill, G. C.; Ogawa, M.; Regino, C.; Kobayashi, H.; Choyke, P. L. Toxicity of Organic Fluorophores Used in Molecular Imaging: Literature Review. *Mol. Imaging* **2009**, *8* (6), 341–354.
- (99) Keereweer, S.; Van Driel, P. B. A. A.; Snoeks, T. J. A.; Kerrebijn, J. D. F.; Baatenburg de Jong, R. J.; Vahrmeijer, A. L.; Sterenborg, H. J. C. M.; Löwik, C. W. G. M. Optical Image-Guided Cancer Surgery: Challenges and Limitations. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19* (14), 3745–3754. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3598>.
- (100) Contassot-Vivier, S.; Asllanaj, F.; Addoum, A. Reconstruction 3D de tissus biologiques par la lumière Application à la détection de tumeurs cancéreuses. 25.
- (101) Witjes, J. A.; Redorta, J. P.; Jacqmin, D.; Sofras, F.; Malmström, P.-U.; Riedl, C.; Jocham, D.; Conti, G.; Montorsi, F.; Arentsen, H. C.; Zaak, D.; Mostafid, A. H.; Babjuk, M. Hexaminolevulinate-Guided Fluorescence Cystoscopy in the Diagnosis and Follow-up of Patients with Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: Review of the Evidence and Recommendations. *Eur. Urol.* **2010**, *57* (4), 607–614. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2010.01.025>.
- (102) Nagaya, T.; Nakamura, Y. A.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. Fluorescence-Guided Surgery. *Front. Oncol.* **2017**, *7*, 314. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00314>.
- (103) Sadot, E.; Groot Koerkamp, B.; Leal, J. N.; Shia, J.; Gonen, M.; Allen, P. J.; DeMatteo, R. P.; Kingham, T. P.; Kemeny, N.; Blumgart, L. H.; Jarnagin, W. R.; D'Angelica, M. I. Resection Margin and Survival in 2368 Patients Undergoing Hepatic Resection for Metastatic Colorectal Cancer: Surgical Technique or Biologic Surrogate? *Ann. Surg.* **2015**, *262* (3), 476–485; discussion 483–485. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001427>.
- (104) Low, P. S.; Singhal, S.; Srinivasarao, M. Fluorescence-Guided Surgery of Cancer: Applications, Tools and Perspectives. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *45*, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.03.002>.

- (105) Wu, A. P.; Whitney, M. A.; Crisp, J. L.; Friedman, B.; Tsien, R. Y.; Nguyen, Q. T. Improved Facial Nerve Identification with Novel Fluorescently Labeled Probe. *Laryngoscope* **2011**, *121* (4), 805–810. <https://doi.org/10.1002/lary.21411>.
- (106) Reinhart, M. B.; Huntington, C. R.; Blair, L. J.; Heniford, B. T.; Augenstein, V. A. Indocyanine Green: Historical Context, Current Applications, and Future Considerations. *Surg. Innov.* **2016**, *23* (2), 166–175. <https://doi.org/10.1177/1553350615604053>.
- (107) DSouza, A. V.; Lin, H.; Henderson, E. R.; Samkoe, K. S.; Pogue, B. W. Review of Fluorescence Guided Surgery Systems: Identification of Key Performance Capabilities beyond Indocyanine Green Imaging. *J. Biomed. Opt.* **2016**, *21* (8), 080901. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.21.8.080901>.
- (108) Hernot, S.; van Manen, L.; Debie, P.; Mieog, J. S. D.; Vahrmeijer, A. L. Latest Developments in Molecular Tracers for Fluorescence Image-Guided Cancer Surgery. *Lancet Oncol.* **2019**, *20* (7), e354–e367. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30317-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30317-1).
- (109) Zanzonico, P.; Heller, S. The Intraoperative Gamma Probe: Basic Principles and Choices Available. *Semin. Nucl. Med.* **2000**, *30* (1), 33–48. [https://doi.org/10.1016/S0001-2998\(00\)80060-4](https://doi.org/10.1016/S0001-2998(00)80060-4).
- (110) Heuveling, D. A.; Karagozoglu, K. H.; Van Lingen, A.; Hoekstra, O. S.; Van Dongen, G. A. M. S.; De Bree, R. Feasibility of Intraoperative Detection of Sentinel Lymph Nodes with 89-Zirconium-Labelled Nanocolloidal Albumin PET-CT and a Handheld High-Energy Gamma Probe. *EJNMMI Res.* **2018**, *8*. <https://doi.org/10.1186/s13550-018-0368-6>.
- (111) Garland, M.; Yim, J. J.; Bogoyo, M. A Bright Future for Precision Medicine: Advances in Fluorescent Chemical Probe Design and Their Clinical Application. *Cell. Chem. Biol.* **2016**, *23* (1), 122–136. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.12.003>.
- (112) He, S.; Song, J.; Qu, J.; Cheng, Z. Crucial Breakthrough of Second Near-Infrared Biological Window Fluorophores: Design and Synthesis toward Multimodal Imaging and Theranostics. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (12), 4258–4278. <https://doi.org/10.1039/C8CS00234G>.
- (113) Lavis, L. D.; Raines, R. T. Bright Ideas for Chemical Biology. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3* (3), 142–155. <https://doi.org/10.1021/cb700248m>.
- (114) Jo, D.; Hyun, H. Structure-Inherent Targeting of Near-Infrared Fluorophores for Image-Guided Surgery. *Chonnam. Med. J.* **2017**, *53* (2), 95–102. <https://doi.org/10.4068/cmj.2017.53.2.95>.
- (115) Hadjipanayis, C. G.; Stummer, W. 5-ALA and FDA Approval for Glioma Surgery. *J. Neurooncol.* **2019**, *141* (3), 479–486. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03098-y>.
- (116) Owens, E. A.; Henary, M.; El Fakhri, G.; Choi, H. S. Tissue-Specific Near-Infrared Fluorescence Imaging. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49* (9), 1731–1740. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00239>.
- (117) Lee, M. H.; Sharma, A.; Chang, M. J.; Lee, J.; Son, S.; Sessler, J. L.; Kang, C.; Kim, J. S. Fluorogenic Reaction-Based Prodrug Conjugates as Targeted Cancer Theranostics. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (1), 28–52. <https://doi.org/10.1039/c7cs00557a>.
- (118) Staderini, M.; Megia-Fernandez, A.; Dhaliwal, K.; Bradley, M. Peptides for Optical Medical Imaging and Steps towards Therapy. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26* (10), 2816–2826. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.039>.
- (119) Chevalier, A.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. Azo-Based Fluorogenic Probes for Biosensing and Bioimaging: Recent Advances and Upcoming Challenges. *Chem. Asian J.* **2017**, *12* (16), 2008–2028. <https://doi.org/10.1002/asia.201700682>.
- (120) Tynan, C. J.; Clarke, D. T.; Coles, B. C.; Rolfe, D. J.; Martin-Fernandez, M. L.; Webb, S. E. D. Multicolour Single Molecule Imaging in Cells with Near Infra-Red Dyes. *PLoS ONE* **2012**, *7* (4), e36265. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036265>.
- (121) Henderson, B. W.; Dougherty, T. J. How Does Photodynamic Therapy Work? *Photochem. Photobiol.* **1992**, *55* (1), 145–157. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x>.
- (122) Dolmans, D. E. J. G. J.; Fukumura, D.; Jain, R. K. Photodynamic Therapy for Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3* (5), 380–387. <https://doi.org/10.1038/nrc1071>.
- (123) Moan, J.; Berg, K. The Photodegradation of Porphyrins in Cells Can Be Used to Estimate the Lifetime of Singlet Oxygen. *Photochem. Photobiol.* **1991**, *53* (4), 549–553. <https://doi.org/10.1111/j.1751->

1097.1991.tb03669.x.

- (124) Kessel, D.; Reiners, J. J. Apoptosis and Autophagy After Mitochondrial or Endoplasmic Reticulum Photodamage. *Photochem. Photobiol.* **2007**, *83* (5), 1024–1028. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00088.x>.
- (125) Hsieh, Y.-J.; Wu, C.-C.; Chang, C.-J.; Yu, J.-S. Subcellular Localization of Photofrin Determines the Death Phenotype of Human Epidermoid Carcinoma A431 Cells Triggered by Photodynamic Therapy: When Plasma Membranes Are the Main Targets. *J. Cell. Physiol.* **2003**, *194* (3), 363–375. <https://doi.org/10.1002/jcp.10273>.
- (126) Pavani, C.; Uchoa, A. F.; Oliveira, C. S.; Iamamoto, Y.; Baptista, M. S. Effect of Zinc Insertion and Hydrophobicity on the Membrane Interactions and PDT Activity of Porphyrin Photosensitizers. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8* (2), 233–240. <https://doi.org/10.1039/B810313E>.
- (127) Abrahamse, H.; Hamblin, M. R. New Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Biochem. J.* **2016**, *473* (4), 347–364. <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>.
- (128) Dabrowski, J.; Pucelik, B.; Regiel-Futyrka, A.; Brindell, M.; Mazuryk, O.; Kyzioł, A.; Stochel, G.; Macyk, W.; Arnaut, L. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *325*, 67–101.
- (129) Zhang, J.; Jiang, C.; Figueiró Longo, J. P.; Azevedo, R. B.; Zhang, H.; Muehlmann, L. A. An Updated Overview on the Development of New Photosensitizers for Anticancer Photodynamic Therapy. *Acta Pharm. Sin. B* **2018**, *8* (2), 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.09.003>.
- (130) van Straten, D.; Mashayekhi, V.; de Bruijn, H. S.; Oliveira, S.; Robinson, D. J. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers* **2017**, *9* (2), 19. <https://doi.org/10.3390/cancers9020019>.
- (131) Yuan, A.; Wu, J.; Tang, X.; Zhao, L.; Xu, F.; Hu, Y. Application of Near-Infrared Dyes for Tumor Imaging, Photothermal, and Photodynamic Therapies. *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102* (1), 6–28. <https://doi.org/10.1002/jps.23356>.
- (132) Holohan, C.; Van Schaeybroeck, S.; Longley, D. B.; Johnston, P. G. Cancer Drug Resistance: An Evolving Paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13* (10), 714–726. <https://doi.org/10.1038/nrc3599>.
- (133) Capella, M. A. M.; Capella, L. S. A Light in Multidrug Resistance: Photodynamic Treatment of Multidrug-Resistant Tumors. *J. Biomed. Sci.* **2003**, *10* (4), 361–366. <https://doi.org/10.1007/BF02256427>.
- (134) Mehraban, N.; Freeman, H. S. Developments in PDT Sensitizers for Increased Selectivity and Singlet Oxygen Production. *Materials* **2015**, *8* (7), 4421–4456. <https://doi.org/10.3390/ma8074421>.
- (135) Harrison, V. S. R.; Carney, C. E.; MacRenaris, K. W.; Waters, E. A.; Meade, T. J. Multimeric Near IR–MR Contrast Agent for Multimodal In Vivo Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (28), 9108–9116. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b04509>.
- (136) Ai, F.; Ferreira, C. A.; Chen, F.; Cai, W. Engineering of Radiolabeled Iron Oxide Nanoparticles for Dual-Modality Imaging. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2016**, *8* (4), 619–630. <https://doi.org/10.1002/wnan.1386>.
- (137) Cha, E.-J.; Jang, E. S.; Sun, I.-C.; Lee, I. J.; Ko, J. H.; Kim, Y. I.; Kwon, I. C.; Kim, K.; Ahn, C.-H. Development of MRI/NIRF ‘Activatable’ Multimodal Imaging Probe Based on Iron Oxide Nanoparticles. *J. Control. Release* **2011**, *155* (2), 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.019>.
- (138) Xia, Y.; Xu, C.; Zhang, X.; Ning, P.; Wang, Z.; Tian, J.; Chen, X. Liposome-Based Probes for Molecular Imaging: From Basic Research to the Bedside. *Nanoscale* **2019**, *11* (13), 5822–5838. <https://doi.org/10.1039/c9nr00207c>.
- (139) Hameed, S.; Bhattarai, P.; Dai, Z. Cerasomes and Bicelles: Hybrid Bilayered Nanostructures With Silica-Like Surface in Cancer Theranostics. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 127. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00127>.
- (140) Li, Y.; Du, Y.; Liang, X.; Sun, T.; Xue, H.; Tian, J.; Jin, Z. EGFR-Targeted Liposomal Nanohybrid Cerasomes: Theranostic Function and Immune Checkpoint Inhibition in a Mouse Model of Colorectal Cancer. *Nanoscale* **2018**, *10* (35), 16738–16749. <https://doi.org/10.1039/c8nr05803b>.
- (141) Du, Y.; Liang, X.; Li, Y.; Sun, T.; Xue, H.; Jin, Z.; Tian, J. Liposomal Nanohybrid Cerasomes Targeted to PD-L1 Enable Dual-Modality Imaging and Improve Antitumor Treatments. *Cancer Lett.* **2018**, *414*, 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.11.019>.
- (142) Andolina, C. M.; Klemm, P. J.; Floyd, W. C.; Fréchet, J. M. J.; Raymond, K. N. Analysis of Lanthanide



- Complex Dendrimer Conjugates for Bimodal NIR and MRI Imaging. *Macromolecules* **2012**, *45* (22), 8982–8990. <https://doi.org/10.1021/ma302206g>.
- (143) Jing, L.; Ding, K.; Kershaw, S. V.; Kempson, I. M.; Rogach, A. L.; Gao, M. Magnetically Engineered Semiconductor Quantum Dots as Multimodal Imaging Probes. *Adv. Mat.* **2014**, *26* (37), 6367–6386. <https://doi.org/10.1002/adma.201402296>.
- (144) Czernin, J.; Allen-Auerbach, M.; Schelbert, H. R. Improvements in Cancer Staging with PET/CT: Literature-Based Evidence as of September 2006. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48 Suppl 1*, 78S-88S.
- (145) Hicks, R. J.; Hofman, M. S. Is There Still a Role for SPECT-CT in Oncology in the PET-CT Era? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2012**, *9* (12), 712–720. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.188>.
- (146) El-Galaly, T. C.; Gormsen, L. C.; Hutchings, M. PET/CT for Staging; Past, Present, and Future. *Semin. Nucl. Med.* **2018**, *48* (1), 4–16. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2017.09.001>.
- (147) Fonti, R.; Conson, M.; Del Vecchio, S. PET/CT in Radiation Oncology. *Semin. Oncol.* **2019**, *46* (3), 202–209. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2019.07.001>.
- (148) Pan, J. A.; Salerno, M. Clinical Utility and Future Applications of PET/CT and PET/CMR in Cardiology. *Diagnostics* **2016**, *6* (3), 32. <https://doi.org/10.3390/diagnostics6030032>.
- (149) Kiani, A.; Esquevin, A.; Lepareur, N.; Bourguet, P.; Le Jeune, F.; Gauvrit, J. Main Applications of Hybrid PET-MRI Contrast Agents: A Review. *Contrast Media Mol. Imaging* **2016**, *11* (2), 92–98. <https://doi.org/10.1002/cmml.1674>.
- (150) Cherry, S. R.; Louie, A. Y.; Jacobs, R. E. The Integration of Positron Emission Tomography With Magnetic Resonance Imaging. *P. IEEE* **2008**, *96* (3), 416–438. <https://doi.org/10.1109/JPROC.2007.913502>.
- (151) Grueneisen, J.; Nagarajah, J.; Buchbender, C.; Hoffmann, O.; Schaarschmidt, B.; Poeppel, T.; Forsting, M.; Quick, H.; Umutlu, L.; Kinner, S. Positron Emission Tomography/Magnetic Resonance Imaging for Local Tumor Staging in Patients With Primary Breast Cancer: A Comparison With Positron Emission Tomography/Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging. *Invest. Radiol.* **2015**, *50* (8), 505–513. <https://doi.org/10.1097/RLI.000000000000197>.
- (152) Thomas, G.; Boudon, J.; Maurizi, L.; Moreau, M.; Walker, P.; Severin, I.; Oudot, A.; Goze, C.; Poty, S.; Vrigneaud, J.-M.; Demoisson, F.; Denat, F.; Brunotte, F.; Millot, N. Innovative Magnetic Nanoparticles for PET/MRI Bimodal Imaging. *ACS Omega* **2019**, *4* (2), 2637–2648. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03283>.
- (153) Choi, J.; Park, J. C.; Nah, H.; Woo, S.; Oh, J.; Kim, K. M.; Cheon, G. J.; Chang, Y.; Yoo, J.; Cheon, J. A Hybrid Nanoparticle Probe for Dual-Modality Positron Emission Tomography and Magnetic Resonance Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47* (33), 6259–6262. <https://doi.org/10.1002/anie.200801369>.
- (154) Jacobs, R. E.; Cherry, S. R. Complementary Emerging Techniques: High-Resolution PET and MRI. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2001**, *11* (5), 621–629. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00259-2](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00259-2).
- (155) Riola-Parada, C.; García-Cañamaque, L.; Pérez-Dueñas, V.; Garcerant-Tafur, M.; Carreras-Delgado, J. L. Simultaneous PET/MRI vs PET/CT in Oncology. A Systematic Review. *Rev. Esp. Med. Nucl. Imagen. Mol.* **2016**, *35* (5), 306–312. <https://doi.org/10.1016/j.remnm.2016.06.001>.
- (156) Ale, A.; Ermolayev, V.; Herzog, E.; Cohrs, C.; de Angelis, M. H.; Ntziachristos, V. FMT-XCT: In Vivo Animal Studies with Hybrid Fluorescence Molecular Tomography-X-Ray Computed Tomography. *Nat. Methods* **2012**, *9* (6), 615–620. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2014>.
- (157) Qin, M.-Y.; Yang, X.-Q.; Wang, K.; Zhang, X.-S.; Song, J.-T.; Yao, M.-H.; Yan, D.-M.; Liu, B.; Zhao, Y.-D. In Vivo Cancer Targeting and Fluorescence-CT Dual-Mode Imaging with Nanoprobes Based on Silver Sulfide Quantum Dots and Iodinated Oil. *Nanoscale* **2015**, *7* (46), 19484–19492. <https://doi.org/10.1039/C5NR05620A>.
- (158) Zhang, J.; Li, C.; Zhang, X.; Huo, S.; Jin, J.; An, F.; Wang, X.; Xue, X.; Ci, O.; G, D.; F, G.; J, H.; Pc, W.; Xj, L. In Vivo Tumor-Targeted Dual-Modal Fluorescence/CT Imaging Using a Nanoprobe Co-Loaded with an Aggregation-Induced Emission Dye and Gold Nanoparticles. *Biomaterials* **2015**, *42*, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.11.053>.
- (159) Zhang, C.; Moonshi, S. S.; Wang, W.; Ta, H. T.; Han, Y.; Han, F. Y.; Peng, H.; Král, P.; Rolfe, B. E.; Gooding, J. J.; Gaus, K.; Whittaker, A. K. High F-Content Perfluoropolyether-Based Nanoparticles for Targeted Detection of Breast Cancer by <sup>19</sup>F Magnetic Resonance and Optical Imaging. *ACS Nano* **2018**, *12* (9), 9162–9176. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b03726>.

- (160) Jang, E. S.; Lee, S. Y.; Cha, E.-J.; Sun, I.-C.; Kwon, I. C.; Kim, D.; Kim, Y. I.; Kim, K.; Ahn, C.-H. Fluorescent Dye Labeled Iron Oxide/Silica Core/Shell Nanoparticle as a Multimodal Imaging Probe. *Pharm. Res.* **2014**, *31* (12), 3371–3378. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1426-z>.
- (161) Ulaner, G. A. PET/CT for Patients With Breast Cancer: Where Is the Clinical Impact? *AJR Am. J. Roentgenol.* **2019**, *213* (2), 254–265. <https://doi.org/10.2214/AJR.19.21177>.
- (162) Yang, M.; Cheng, K.; Qi, S.; Liu, H.; Jiang, Y.; Jiang, H.; Li, J.; Chen, K.; Zhang, H.; Cheng, Z. Affibody Modified and Radiolabeled Gold-Iron Oxide Hetero-Nanostructures for Tumor PET, Optical and MR Imaging. *Biomaterials* **2013**, *34* (11), 2796–2806. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.014>.
- (163) Liang, S.; Ma, T.; Jing, J.; Li, X.; Li, J.; Shung, K. K.; Zhou, Q.; Zhang, J.; Chen, Z. Trimodality Imaging System and Intravascular Endoscopic Probe: Combined Optical Coherence Tomography, Fluorescence Imaging and Ultrasound Imaging. *Opt. Lett.* **2014**, *39* (23), 6652–6655. <https://doi.org/10.1364/OL.39.006652>.
- (164) Thorp-Greenwood, F. L.; Coogan, M. P. Multimodal Radio- (PET/SPECT) and Fluorescence Imaging Agents Based on Metallo-Radioisotopes: Current Applications and Prospects for Development of New Agents. *Dalton Trans.* **2011**, *40* (23), 6129–6143. <https://doi.org/10.1039/c0dt01398f>.
- (165) An, F.-F.; Chan, M.; Kommidi, H.; Ting, R. Dual PET and Near-Infrared Fluorescence Imaging Probes as Tools for Imaging in Oncology. *AJR Am. J. Roentgenol.* **2016**, *207* (2), 266–273. <https://doi.org/10.2214/AJR.16.16181>.
- (166) Lütje, S.; Rijpkema, M.; Helfrich, W.; Oyen, W. J. G.; Boerman, O. C. Targeted Radionuclide and Fluorescence Dual-Modality Imaging of Cancer: Preclinical Advances and Clinical Translation. *Mol. Imaging Biol.* **2014**, *16* (6), 747–755. <https://doi.org/10.1007/s11307-014-0747-y>.
- (167) Zhao, J.; Chen, J.; Ma, S.; Liu, Q.; Huang, L.; Chen, X.; Lou, K.; Wang, W. Recent Developments in Multimodality Fluorescence Imaging Probes. *Acta Pharmacol. Sin.* **2018**, *8* (3), 320–338. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.03.010>.
- (168) Rijpkema, M.; Oyen, W. J.; Bos, D.; Franssen, G. M.; Goldenberg, D. M.; Boerman, O. C. SPECT- and Fluorescence Image-Guided Surgery Using a Dual-Labeled Carcinoembryonic Antigen-Targeting Antibody. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55* (9), 1519–1524. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.142141>.
- (169) Hekman, M. C. H.; Rijpkema, M.; Bos, D. L.; Oosterwijk, E.; Goldenberg, D. M.; Mulders, P. F. A.; Boerman, O. C. Detection of Micrometastases Using SPECT/Fluorescence Dual-Modality Imaging in a CEA-Expressing Tumor Model. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (5), 706–710. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.185470>.
- (170) Wang, Y.; An, F.-F.; Chan, M.; Friedman, B.; Rodriguez, E. A.; Tsien, R. Y.; Aras, O.; Ting, R. 18F-Positron-Emitting/Fluorescent Labeled Erythrocytes Allow Imaging of Internal Hemorrhage in a Murine Intracranial Hemorrhage Model. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2017**, *37* (3), 776–786. <https://doi.org/10.1177/0271678X16682510>.
- (171) Chansaenpak, K.; Wang, H.; Wang, M.; Giglio, B.; Ma, X.; Yuan, H.; Hu, S.; Wu, Z.; Li, Z. Synthesis and Evaluation of [18F]-Ammonium BODIPY Dyes as Potential Positron Emission Tomography Agents for Myocardial Perfusion Imaging. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22* (34), 12122–12129. <https://doi.org/10.1002/chem.201601972>.
- (172) Shimojo, M.; Higuchi, M.; Suhara, T.; Sahara, N. Imaging Multimodalities for Dissecting Alzheimer's Disease: Advanced Technologies of Positron Emission Tomography and Fluorescence Imaging. *Front. Neurosci.* **2015**, *9*, 482. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00482>.
- (173) Das, T.; Banerjee, S. Theranostic Applications of Lutetium-177 in Radionuclide Therapy. *Curr. Radiopharm.* **2016**, *9* (1), 94–101. <https://doi.org/10.2174/1874471008666150313114644>.
- (174) Nagarajah, J.; Janssen, M.; Hetkamp, P.; Jentzen, W. Iodine Symporter Targeting with 124I/131I Theranostics. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (Supplement 2), 34S-38S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.186866>.
- (175) Follacchio, G. A.; De Feo, M. S.; De Vincentis, G.; Monteleone, F.; Liberatore, M. Radiopharmaceuticals Labelled with Copper Radionuclides: Clinical Results in Human Beings. *Curr. Radiopharm.* **2018**, *11* (1), 22–33. <https://doi.org/10.2174/1874471011666171211161851>.
- (176) Kratochwil, C.; Giesel, F. L.; Eder, M.; Afshar-Oromieh, A.; Benešová, M.; Mier, W.; Kopka, K.; Haberkorn, U. [<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* (6), 987–988. <https://doi.org/10.1007/s00259-014-2978-1>.
- (177) Baum, R. P.; Kluge, A. W.; Kulkarni, H.; Schorr-Neufing, U.; Niepsch, K.; Bitterlich, N.; van Echteld, C. J. A.

- [(177)Lu-DOTA](0)-D-Phe(1)-Tyr(3)-Octreotide ((177)Lu-DOTATOC) For Peptide Receptor Radiotherapy in Patients with Advanced Neuroendocrine Tumours: A Phase-II Study. *Theranostics* **2016**, *6* (4), 501–510. <https://doi.org/10.7150/thno.13702>.
- (178) Makris, G.; Radford, L. L.; Kuchuk, M.; Gallazzi, F.; Jurisson, S. S.; Smith, C. J.; Hennkens, H. M. NOTA and NODAGA [99mTc]Tc- and [186Re]Re-Tricarbonyl Complexes: Radiochemistry and First Example of a [99mTc]Tc-NODAGA Somatostatin Receptor-Targeting Bioconjugate. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29* (12), 4040–4049. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00670>.
- (179) Lorenzoni, A.; Capozza, A.; Artale, S.; Maccauro, M.; Seregini, E. C. Impressive Response to Tandem Treatment With [90Y]DOTATOC and [177Lu]DOTATOC in Grade 3 Pancreatic Neuroendocrine Carcinoma. *Clin. Nucl. Med.* **2018**, *43* (7), 506–508. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000002116>.
- (180) Kratochwil, C.; Bruchertseifer, F.; Giesel, F. L.; Weis, M.; Verburg, F. A.; Mottaghy, F.; Kopka, K.; Apostolidis, C.; Haberkorn, U.; Morgenstern, A. 225Ac-PSMA-617 for PSMA-Targeted  $\alpha$ -Radiation Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57* (12), 1941–1944. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.178673>.
- (181) Persson, M.; Rasmussen, P.; Madsen, J.; Ploug, M.; Kjaer, A. New Peptide Receptor Radionuclide Therapy of Invasive Cancer Cells: In Vivo Studies Using 177Lu-DOTA-AE105 Targeting UPAR in Human Colorectal Cancer Xenografts. *Nucl. Med. Biol.* **2012**, *39* (7), 962–969. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2012.05.007>.
- (182) Kolstad, A.; Madsbu, U.; Beasley, M.; Bayne, M.; Stokke, C.; Bach-Gansmo, T.; Løndalen, A. M.; Høltedahl, J. E.; Revheim, M. E.; Bruland, Ø.; Dahle, J.; Curtis, L. B.; Østengen, Å.; Turner, S.; Bolstad, N.; Larsen, R. H.; Spetalen, S.; Erlanson, M.; Rudå, S. N.; Holte, H. Abstract LB-252: Efficacy and Safety Results of Betalutin® (177Lu-DOTA-HH1) in a Phase I/II Study of Patients with Non-Hodgkin B-Cell Lymphoma (NHL). *Cancer Res.* **2016**, *76* (Suppl 14). <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2016-LB-252>.
- (183) Staudacher, A. H.; Al-Ejeh, F.; Fraser, C. K.; Darby, J. M.; Roder, D. M.; Ruzkiewicz, A.; Manavis, J.; Brown, M. P. The La Antigen Is Over-Expressed in Lung Cancer and Is a Selective Dead Cancer Cell Target for Radioimmunotherapy Using the La-Specific Antibody APOMAB®. *EJNMMI Res.* **2014**, *4* (1), 2. <https://doi.org/10.1186/2191-219X-4-2>.
- (184) Alvarez, R. D.; Partridge, E. E.; Khazaeli, M. B.; Plott, G.; Austin, M.; Kilgore, L.; Russell, C. D.; Liu, T.; Grizzle, W. E.; Schlom, J.; LoBuglio, A. F.; Meredith, R. F. Intraperitoneal Radioimmunotherapy of Ovarian Cancer with 177Lu-CC49: A Phase I/II Study. *Gynecol. Oncol.* **1997**, *65* (1), 94–101. <https://doi.org/10.1006/gyno.1996.4577>.
- (185) Baum, R. P.; Kulkarni, H. R.; Schuchardt, C.; Singh, A.; Wirtz, M.; Wiessalla, S.; Schottelius, M.; Mueller, D.; Klette, I.; Wester, H.-J. 177Lu-Labeled Prostate-Specific Membrane Antigen Radioligand Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Safety and Efficacy. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57* (7), 1006–1013. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.168443>.
- (186) Claringbold, P. G.; Brayshaw, P. A.; Price, R. A.; Turner, J. H. Phase II Study of Radioligand 177Lu-Octreotate and Capecitabine Therapy of Progressive Disseminated Neuroendocrine Tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, *38* (2), 302–311. <https://doi.org/10.1007/s00259-010-1631-x>.
- (187) Cutler, C. S.; Hennkens, H. M.; Sisay, N.; Huclier-Markai, S.; Jurisson, S. S. Radiometals for Combined Imaging and Therapy. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (2), 858–883. <https://doi.org/10.1021/cr3003104>.
- (188) Baudino, T. A. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr. Drug Discov. Technol.* **2015**, *12* (1), 3–20. <https://doi.org/10.2174/1570163812666150602144310>.
- (189) Srinivasarao, M.; Galliford, C. V.; Low, P. S. Principles in the Design of Ligand-Targeted Cancer Therapeutics and Imaging Agents. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2015**, *14* (3), 203–219. <https://doi.org/10.1038/nrd4519>.
- (190) Amouroux, G.; Pan, J.; Jenni, S.; Zhang, C.; Zhang, Z.; Hundal-Jabal, N.; Colpo, N.; Liu, Z.; Bénard, F.; Lin, K.-S. Imaging Bradykinin B1 Receptor with 68Ga-Labeled [Des-Arg10]Kallidin Derivatives: Effect of the Linker on Biodistribution and Tumor Uptake. *Mol. Pharmaceutics* **2015**, *12* (8), 2879–2888. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00070>.
- (191) Quinones, J.; Mizejewski, G.; Beierwaltes, W. H. Choriocarcinoma Scanning Using Radiolabeled Anti-Body to Chorionic Gonadotrophin. *J. Nucl. Med.* **1971**, *12* (2), 69–75.

- (192) Chopra, A.; Shan, L.; Eckelman, W. C.; Leung, K.; Latterner, M.; Bryant, S. H.; Menkens, A. Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD): Evolution and Progress. *Mol. Imaging Biol.* **2012**, *14* (1), 4–13. <https://doi.org/10.1007/s11307-011-0521-3>.
- (193) Kobayashi, H.; Watanabe, R.; Choyke, P. L. Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects; What Is the Appropriate Target? *Theranostics* **2013**, *4* (1), 81–89. <https://doi.org/10.7150/thno.7193>.
- (194) Abdalla, A. M. E.; Xiao, L.; Ullah, M. W.; Yu, M.; Ouyang, C.; Yang, G. Current Challenges of Cancer Anti-Angiogenic Therapy and the Promise of Nanotherapeutics. *Theranostics* **2018**, *8* (2), 533–548. <https://doi.org/10.7150/thno.21674>.
- (195) Matsumura, Y.; Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* **1986**, *46* (12 Pt 1), 6387–6392.
- (196) Danhier, F. To Exploit the Tumor Microenvironment: Since the EPR Effect Fails in the Clinic, What Is the Future of Nanomedicine? *J. Control. Release* **2016**, *244* (Pt A), 108–121. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.015>.
- (197) Kue, C. S.; Kamkaew, A.; Burgess, K.; Kiew, L. V.; Chung, L. Y.; Lee, H. B. Small Molecules for Active Targeting in Cancer. *Med. Res. Rev.* **2016**, *36* (3), 494–575. <https://doi.org/10.1002/med.21387>.
- (198) Kalyane, D.; Raval, N.; Maheshwari, R.; Tambe, V.; Kalia, K.; Tekade, R. K. Employment of Enhanced Permeability and Retention Effect (EPR): Nanoparticle-Based Precision Tools for Targeting of Therapeutic and Diagnostic Agent in Cancer. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2019**, *98*, 1252–1276. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.066>.
- (199) Patra, J. K.; Das, G.; Fraceto, L. F.; Campos, E. V. R.; Rodriguez-Torres, M. del P.; Acosta-Torres, L. S.; Diaz-Torres, L. A.; Grillo, R.; Swamy, M. K.; Sharma, S.; Habtemariam, S.; Shin, H.-S. Nano Based Drug Delivery Systems: Recent Developments and Future Prospects. *J. Nanobiotechnology* **2018**, *16*. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>.
- (200) Fard, J.; Jafari, S.; Eghbal, M. A. A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles. *Adv. Pharm. Bull.* **2015**, *5* (4), 447–454. <https://doi.org/10.15171/apb.2015.061>.
- (201) Bahadar, H.; Maqbool, F.; Niaz, K.; Abdollahi, M. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iran. Biomed. J.* **2016**, *20* (1), 1–11. <https://doi.org/10.7508/ibj.2016.01.001>.
- (202) Shi, J.; Kantoff, P. W.; Wooster, R.; Farokhzad, O. C. Cancer Nanomedicine: Progress, Challenges and Opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17* (1), 20–37. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.108>.
- (203) van Oosten, M.; Crane, L. M.; Bart, J.; van Leeuwen, F. W.; van Dam, G. M. Selecting Potential Targetable Biomarkers for Imaging Purposes in Colorectal Cancer Using Target Selection Criteria (TASC): A Novel Target Identification Tool. *Transl. Oncol.* **2011**, *4* (2), 71–82. <https://doi.org/10.1593/tlo.10220>.
- (204) Reubi, J. C. Peptide Receptors as Molecular Targets for Cancer Diagnosis and Therapy. *Endocr. Rev.* **2003**, *24* (4), 389–427. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0007>.
- (205) Boonstra, M. C.; De Geus, S. W. L.; Prevoo, H. A. J. M.; Hawinkels, L. J. A. C.; Van De Velde, C. J. H.; Kuppen, P. J. K.; Vahrmeijer, A. L.; Sier, C. F. M. Selecting Targets for Tumor Imaging: An Overview of Cancer-Associated Membrane Proteins. *Biomark. Cancer* **2016**, *8*, 119–133. <https://doi.org/10.4137/BIC.S38542>.
- (206) Warburg, O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* **1956**, *123* (3191), 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>.
- (207) Warburg, O. On Respiratory Impairment in Cancer Cells. *Science* **1956**, *124* (3215), 269–270.
- (208) Khan, M. U.; Khan, S.; El-Refaie, S.; Win, Z.; Rubello, D.; Al-Nahhas, A. Clinical Indications for Gallium-68 Positron Emission Tomography Imaging. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2009**, *35* (6), 561–567. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2009.01.007>.
- (209) Miwa, S.; Mochizuki, T.; Yamamoto, N.; Shirai, T.; Hayashi, K.; Takeuchi, A.; Inatani, H.; Igarashi, K.; Higuchi, T.; Abe, K.; Taniguchi, Y.; Aiba, H.; Ikeda, H.; Tsuchiya, H. Efficacy and Limitations of F-18-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose Positron Emission Tomography to Differentiate Between Malignant and Benign Bone and Soft Tissue Tumors. *Anticancer Res.* **2018**, *38* (7), 4065–4072. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12696>.
- (210) Reubi, J. C.; Maecke, H. R. Peptide-Based Probes for Cancer Imaging. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49* (11), 1735–



1738. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.053041>.

(211) Correia, J. D. G.; Paulo, A.; Raposinho, P. D.; Santos, I. Radiometallated Peptides for Molecular Imaging and Targeted Therapy. *Dalton Trans.* **2011**, 40 (23), 6144–6167. <https://doi.org/10.1039/C0DT01599G>.

(212) Sun, X.; Li, Y.; Liu, T.; Li, Z.; Zhang, X.; Chen, X. Peptide-Based Imaging Agents for Cancer Detection. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, 110–111, 38–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.007>.

(213) Dalm, S. U.; Verzijlbergen, J. F.; De Jong, M. Review: Receptor Targeted Nuclear Imaging of Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18 (2), 260. <https://doi.org/10.3390/ijms18020260>.

(214) Hamidi, H.; Ivaska, J. Every Step of the Way: Integrins in Cancer Progression and Metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, 18 (9), 533–548. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0038-z>.

(215) Duffy, M. J. Carcinoembryonic Antigen as a Marker for Colorectal Cancer: Is It Clinically Useful? *Clin. Chem.* **2001**, 47 (4), 624–630.

(216) Boogerd, L. S. F.; Boonstra, M. C.; Beck, A.-J.; Charehbili, A.; Hoogstins, C. E. S.; Prevoo, H. A. J. M.; Singhal, S.; Low, P. S.; van de Velde, C. J. H.; Vahrmeijer, A. L. Concordance of Folate Receptor- $\alpha$  Expression between Biopsy, Primary Tumor and Metastasis in Breast Cancer and Lung Cancer Patients. *Oncotarget* **2016**, 7 (14), 17442–17454. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7856>.

(217) Kelderhouse, L. E.; Chelvam, V.; Wayua, C.; Mahalingam, S.; Poh, S.; Kularatne, S. A.; Low, P. S. Development of Tumor-Targeted near Infrared Probes for Fluorescence Guided Surgery. *Bioconjug. Chem.* **2013**, 24 (6), 1075–1080. <https://doi.org/10.1021/bc400131a>.

(218) van Dam, G. M.; Themelis, G.; Crane, L. M. A.; Harlaar, N. J.; Pleijhuis, R. G.; Kelder, W.; Sarantopoulos, A.; de Jong, J. S.; Arts, H. J. G.; van der Zee, A. G. J.; Bart, J.; Low, P. S.; Ntziachristos, V. Intraoperative Tumor-Specific Fluorescence Imaging in Ovarian Cancer by Folate Receptor- $\alpha$  Targeting: First in-Human Results. *Nat. Med.* **2011**, 17 (10), 1315–1319. <https://doi.org/10.1038/nm.2472>.

(219) Hoogstins, C. E. S.; Tummers, Q. R. J. G.; Gaarenstroom, K. N.; Kroon, C. D. de; Trimbos, J. B. M. Z.; Bosse, T.; Smit, V. T. H. B. M.; Vuyk, J.; Velde, C. J. H. van de; Cohen, A. F.; Low, P. S.; Burggraaf, J.; Vahrmeijer, A. L. A Novel Tumor-Specific Agent for Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging: A Translational Study in Healthy Volunteers and Patients with Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2016**, 22 (12), 2929–2938. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2640>.

(220) Wester, H.-J. Nuclear Imaging Probes: From Bench to Bedside. *Clin. Cancer Res.* **2007**, 13 (12), 3470–3481. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0264>.

(221) Krumm, B. E.; Lee, S.; Bhattacharya, S.; Botos, I.; White, C. F.; Du, H.; Vaidehi, N.; Grisshammer, R. Structure and Dynamics of a Constitutively Active Neurotensin Receptor. *Sci. Rep.* **2016**, 6 (1), 38564. <https://doi.org/10.1038/srep38564>.

(222) Krenning, E. P.; Bakker, W. H.; Breeman, W. A.; Koper, J. W.; Kooij, P. P.; Ausema, L.; Lameris, J. S.; Reubi, J. C.; Lamberts, S. W. Localisation of Endocrine-Related Tumours with Radioiodinated Analogue of Somatostatin. *Lancet* **1989**, 1 (8632), 242–244. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)91258-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)91258-0).

(223) Fani, M.; Maecke, H. R.; Okarvi, S. M. Radiolabeled Peptides: Valuable Tools for the Detection and Treatment of Cancer. *Theranostics* **2012**, 2 (5), 481–501. <https://doi.org/10.7150/thno.4024>.

(224) Yao, J.-F.; Yang, H.; Zhao, Y.-Z.; Xue, M. Metabolism of Peptide Drugs and Strategies to Improve Their Metabolic Stability. *Curr. Drug Metab.* **2018**, 19 (11), 892–901. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180628171531>.

(225) Fani, M.; Maecke, H. R. Radiopharmaceutical Development of Radiolabelled Peptides. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, 39 (Suppl 1), S11-30. <https://doi.org/10.1007/s00259-011-2001-z>.

(226) van Dongen, G. A. M. S.; Visser, G. W. M.; Lub-de Hooge, M. N.; de Vries, E. G.; Perk, L. R. Immuno-PET: A Navigator in Monoclonal Antibody Development and Applications. *Oncologist* **2007**, 12 (12), 1379–1389. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-12-1379>.

(227) Graham, P. *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Sixth Edition.; Oxford University Press: Oxford, New York, 2017.

(228) Bohdiewicz, P. J. Indium-111 Satumomab Pendetide: The First FDA-Approved Monoclonal Antibody for Tumor Imaging. *J. Nucl. Med. Technol.* **1998**, 26 (3), 155–163.

(229) Monoclonal Antibodies Approved by the EMA and FDA for Therapeutic Use – ACTIP.

- (230) Boerman, O. C.; Oyen, W. J. G. Immuno-PET of Cancer: A Revival of Antibody Imaging. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52* (8), 1171–1172. <https://doi.org/10.2967/jnumed.111.089771>.
- (231) Wei, W.; Rosenkrans, Z. T.; Liu, J.; Huang, G.; Luo, Q.-Y.; Cai, W. ImmunoPET: Concept, Design, and Applications. *Chem. Rev.* **2020**, *120* (8), 3787–3851. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00738>.
- (232) Gordon, M. R.; Canakci, M.; Li, L.; Zhuang, J.; Osborne, B.; Thayumanavan, S. Field Guide to Challenges and Opportunities in Antibody-Drug Conjugates for Chemists. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26* (11), 2198–2215. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00399>.
- (233) Beck, A.; Goetsch, L.; Dumontet, C.; Corvaia, N. Strategies and Challenges for the next Generation of Antibody-Drug Conjugates. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16* (5), 315–337. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.268>.
- (234) Lambert, J. M.; Morris, C. Q. Antibody-Drug Conjugates (ADCs) for Personalized Treatment of Solid Tumors: A Review. *Adv. Ther.* **2017**, *34* (5), 1015–1035. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0519-6>.
- (235) Joubert, N.; Denevault-Sabourin, C.; Bryden, F.; Viaud-Massuard, M.-C. Towards Antibody-Drug Conjugates and Prodrug Strategies with Extracellular Stimuli-Responsive Drug Delivery in the Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *142*, 393–415. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.049>.
- (236) Birrer, M. J.; Moore, K. N.; Betella, I.; Bates, R. C. Antibody-Drug Conjugate-Based Therapeutics: State of the Science. *J. Natl. Cancer Inst.* **2019**, *111* (6), 538–549. <https://doi.org/10.1093/jnci/djz035>.
- (237) Fleuren, E. D. G.; Versleijen-Jonkers, Y. M. H.; Heskamp, S.; van Herpen, C. M. L.; Oyen, W. J. G.; van der Graaf, W. T. A.; Boerman, O. C. Theranostic Applications of Antibodies in Oncology. *Mol. Oncol.* **2014**, *8* (4), 799–812. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.03.010>.
- (238) Romer, T.; Leonhardt, H.; Rothbauer, U. Engineering Antibodies and Proteins for Molecular in Vivo Imaging. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22* (6), 882–887. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.06.007>.
- (239) Holliger, P.; Hudson, P. J. Engineered Antibody Fragments and the Rise of Single Domains. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23* (9), 1126–1136. <https://doi.org/10.1038/nbt1142>.
- (240) Freise, A. C.; Wu, A. M. In Vivo Imaging with Antibodies and Engineered Fragments. *Mol. Immunol.* **2015**, *67* (2 Pt A), 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.04.001>.
- (241) Lütje, S.; Franssen, G. M.; Sharkey, R. M.; Laverman, P.; Rossi, E. A.; Goldenberg, D. M.; Oyen, W. J. G.; Boerman, O. C.; McBride, W. J. Anti-CEA Antibody Fragments Labeled with [<sup>18</sup>F]AIF for PET Imaging of CEA-Expressing Tumors. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25* (2), 335–341. <https://doi.org/10.1021/bc4004926>.
- (242) Lütje, S.; Rijpkema, M.; Franssen, G. M.; Fracasso, G.; Helfrich, W.; Eek, A.; Oyen, W. J.; Colombatti, M.; Boerman, O. C. Dual-Modality Image-Guided Surgery of Prostate Cancer with a Radiolabeled Fluorescent Anti-PSMA Monoclonal Antibody. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55* (6), 995–1001. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.138180>.
- (243) Lütje, S.; van Rij, C. M.; Franssen, G. M.; Fracasso, G.; Helfrich, W.; Eek, A.; Oyen, W. J.; Colombatti, M.; Boerman, O. C. Targeting Human Prostate Cancer with <sup>111</sup>In-Labeled D2B IgG, F(Ab')<sub>2</sub> and Fab Fragments in Nude Mice with PSMA-Expressing Xenografts. *Contrast Media Mol. Imaging* **2015**, *10* (1), 28–36. <https://doi.org/10.1002/cmml.1596>.
- (244) Tavaré, R.; McCracken, M. N.; Zettlitz, K. A.; Knowles, S. M.; Salazar, F. B.; Olafsen, T.; Witte, O. N.; Wu, A. M. Engineered Antibody Fragments for Immuno-PET Imaging of Endogenous CD8+ T Cells in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111* (3), 1108–1113. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316922111>.
- (245) Chakravarty, R.; Goel, S.; Valdovinos, H. F.; Hernandez, R.; Hong, H.; Nickles, R. J.; Cai, W. Matching the Decay Half-Life with the Biological Half-Life: ImmunoPET Imaging with (<sup>44</sup>Sc)-Labeled Cetuximab Fab Fragment. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (12), 2197–2204. <https://doi.org/10.1021/bc500415x>.
- (246) Tavaré, R.; Wu, W. H.; Zettlitz, K. A.; Salazar, F. B.; McCabe, K. E.; Marks, J. D.; Wu, A. M. Enhanced ImmunoPET of ALCAM-Positive Colorectal Carcinoma Using Site-Specific <sup>64</sup>Cu-DOTA Conjugation. *Protein Eng. Des. Sel.* **2014**, *27* (10), 317–324. <https://doi.org/10.1093/protein/gzu030>.
- (247) Kim, H.-Y.; Wang, X.; Wahlberg, B.; Edwards, W. B. Discovery of Hapten-Specific ScFv from a Phage Display Library and Applications for HER2-Positive Tumor Imaging. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (7), 1311–1322. <https://doi.org/10.1021/bc500173f>.
- (248) Hamers-Casterman, C.; Atarhouch, T.; Muyldermans, S.; Robinson, G.; Hamers, C.; Songa, E. B.; Bendahman, N.; Hamers, R. Naturally Occurring Antibodies Devoid of Light Chains. *Nature* **1993**, *363* (6428), 446–

448. <https://doi.org/10.1038/363446a0>.
- (249) Schoonooghe, S.; Laoui, D.; Van Ginderachter, J. A.; Devoogdt, N.; Lahoutte, T.; De Baetselier, P.; Raes, G. Novel Applications of Nanobodies for in Vivo Bio-Imaging of Inflamed Tissues in Inflammatory Diseases and Cancer. *Immunobiology* **2012**, *217* (12), 1266–1272. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.07.009>.
- (250) Helma, J.; Cardoso, M. C.; Muyltermans, S.; Leonhardt, H. Nanobodies and Recombinant Binders in Cell Biology. *J. Cell Biol.* **2015**, *209* (5), 633–644. <https://doi.org/10.1083/jcb.201409074>.
- (251) Xavier, C.; Vaneycken, I.; D’huyvetter, M.; Heemskerck, J.; Keyaerts, M.; Vincke, C.; Devoogdt, N.; Muyltermans, S.; Lahoutte, T.; Caveliers, V. Synthesis, Preclinical Validation, Dosimetry, and Toxicity of 68Ga-NOTA-Anti-HER2 Nanobodies for IPET Imaging of HER2 Receptor Expression in Cancer. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54* (5), 776–784. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.111021>.
- (252) Bannas, P.; Well, L.; Lenz, A.; Rissiek, B.; Haag, F.; Schmid, J.; Hochgräfe, K.; Trepel, M.; Adam, G.; Ittrich, H.; Koch-Nolte, F. In Vivo Near-Infrared Fluorescence Targeting of T Cells: Comparison of Nanobodies and Conventional Monoclonal Antibodies. *Contrast Media Mol. Imaging* **2014**, *9* (2), 135–142. <https://doi.org/10.1002/cmml.1548>.
- (253) Vazquez-Lombardi, R.; Phan, T. G.; Zimmermann, C.; Lowe, D.; Jeremtus, L.; Christ, D. Challenges and Opportunities for Non-Antibody Scaffold Drugs. *Drug Discov. Today* **2015**, *20* (10), 1271–1283. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.09.004>.
- (254) Sha, F.; Salzman, G.; Gupta, A.; Koide, S. Monobodies and Other Synthetic Binding Proteins for Expanding Protein Science. *Protein Sci.* **2017**, *26* (5), 910–924. <https://doi.org/10.1002/pro.3148>.
- (255) Löfblom, J.; Feldwisch, J.; Tolmachev, V.; Carlsson, J.; Ståhl, S.; Frejd, F. Y. Affibody Molecules: Engineered Proteins for Therapeutic, Diagnostic and Biotechnological Applications. *FEBS Lett.* **2010**, *584* (12), 2670–2680. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.014>.
- (256) Tolmachev, V.; Hofström, C.; Malmberg, J.; Ahlgren, S.; Hosseinimehr, S. J.; Sandström, M.; Abrahmsén, L.; Orlova, A.; Gräslund, T. HEHEHE-Tagged Affibody Molecule May Be Purified by IMAC, Is Conveniently Labeled with [ <sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub> ]<sup>+</sup>, and Shows Improved Biodistribution with Reduced Hepatic Radioactivity Accumulation. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21* (11), 2013–2022. <https://doi.org/10.1021/bc1002357>.
- (257) Plückthun, A. Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPs): Binding Proteins for Research, Diagnostics, and Therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2015**, *55*, 489–511. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134654>.
- (258) Gijs, M.; Aerts, A.; Impens, N.; Baatout, S.; Luxen, A. Aptamers as Radiopharmaceuticals for Nuclear Imaging and Therapy. *Nucl. Med. Biol.* **2016**, *43* (4), 253–271. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2015.09.005>.
- (259) Mankoff, D. A.; Link, J. M.; Linden, H. M.; Sundararajan, L.; Krohn, K. A. Tumor Receptor Imaging. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49* (Suppl 2), 149S-63S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.107.045963>.
- (260) Ginj, M.; Zhang, H.; Waser, B.; Cescato, R.; Wild, D.; Wang, X.; Erchegyi, J.; Rivier, J.; Mäcke, H. R.; Reubi, J. C. 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* (44), 16436–16441. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607761103>.
- (261) Cescato, R.; Maina, T.; Nock, B.; Nikolopoulou, A.; Charalambidis, D.; Piccand, V.; Reubi, J. C. Bombesin Receptor Antagonists May Be Preferable to Agonists for Tumor Targeting. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49* (2), 318–326. <https://doi.org/10.2967/jnumed.107.045054>.
- (262) Dash, A.; Chakraborty, S.; Pillai, M. R. A.; Knapp, F. F. R. Peptide Receptor Radionuclide Therapy: An Overview. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2015**, *30* (2), 47–71. <https://doi.org/10.1089/cbr.2014.1741>.
- (263) Wild, D.; Fani, M.; Behe, M.; Brink, I.; Rivier, J. E. F.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R.; Weber, W. A. First Clinical Evidence That Imaging with Somatostatin Receptor Antagonists Is Feasible. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52* (9), 1412–1417. <https://doi.org/10.2967/jnumed.111.088922>.







---

# CHAPITRE 1

Développement et optimisation d'un agent bimodal pour le diagnostic et la chirurgie guidée par fluorescence de l'adénocarcinome pancréatique

---



<b>CHAPITRE 1 - Développement et optimisation d'un agent bimodal pour le diagnostic et la chirurgie guidée par fluorescence de l'adénocarcinome pancréatique .....</b>	<b>- 91 -</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>- 95 -</b>
<b>I.1. Cancer du pancréas.....</b>	<b>- 95 -</b>
I.1.1. Épidémiologie.....	- 95 -
I.1.2. Physiopathologie .....	- 96 -
I.1.3. Diagnostic et thérapie.....	- 97 -
<b>I.2. Neurotensine .....</b>	<b>- 101 -</b>
I.2.1. La neurotensine et ses récepteurs .....	- 101 -
I.2.2. Rôle physiologique.....	- 103 -
I.2.3. Rôle dans les cancers .....	- 104 -
<b>I.3. Présentation du projet.....</b>	<b>- 105 -</b>
<b>I.4. État de l'art .....</b>	<b>- 107 -</b>
I.4.1. Développement d'analogues de la neurotensine .....	- 107 -
I.4.2. Développement d'analogues marqués de la neurotensine .....	- 108 -
<b>II. Résultats et discussion .....</b>	<b>- 111 -</b>
<b>II.1. Design des agents d'imagerie .....</b>	<b>- 111 -</b>
II.1.1. Choix du vecteur.....	- 111 -
II.1.2. Choix du radioélément et de l'agent chélatant.....	- 112 -
II.1.3. Choix de la sonde fluorescente .....	- 114 -
II.1.4. Choix de l'espaceur.....	- 114 -
<b>II.2. Synthèse et caractérisation.....</b>	<b>- 115 -</b>
II.2.1. Synthèse des ligands.....	- 115 -
II.2.2. Propriétés spectrales .....	- 117 -
<b>II.3. Évaluation <i>in vitro</i> .....</b>	<b>- 117 -</b>
II.3.1. Métallation au <sup>nat</sup> Ga et évaluation de la stabilité.....	- 117 -
II.3.2. Détermination des constantes d'inhibition ( $K_i$ ).....	- 119 -
II.3.3. Radiomarquage .....	- 119 -
II.3.4. Mesure du caractère hydrophile (LogD) .....	- 121 -
<b>II.4. Évaluation <i>in vivo</i> par imagerie TEP .....</b>	<b>- 121 -</b>
II.4.1. Évaluation des propriétés pharmacocinétiques sur souris saines.....	- 121 -
II.4.2. Évaluation de la biodistribution sur souris xénotreffées.....	- 122 -
<b>II.5. Évaluation des propriétés de fluorescence .....</b>	<b>- 124 -</b>
<b>III. Conclusion et perspectives .....</b>	<b>- 126 -</b>
<b>Références.....</b>	<b>- 128 -</b>



## I. Introduction

Le pancréas est un organe de l'abdomen situé derrière l'estomac, entre l'intestin grêle et la rate (Figure 47). Cette glande est, au travers de la production de fluides et hormones, impliquée dans plusieurs processus physiologiques que sont la digestion et la régulation de la glycémie. Le pancréas possède une fonction exocrine et une fonction endocrine. Le pancréas exocrine est constitué de cellules produisant des enzymes digestives. À celles-ci vont être ajoutés du mucus et du bicarbonate afin de former le suc pancréatique qui pourra être déversé dans le duodénum *via* des canaux afin de faciliter la digestion des aliments. Le pancréas endocrine est, quant à lui, constitué d'îlots de Langerhans, eux-mêmes composés de quatre types de cellules. Les cellules  $\alpha$  et  $\beta$  produisent des hormones, telles que le glucagon ou l'insuline, régulant la quantité de sucre dans le sang. Les cellules  $\delta$  et PP produisent la somatostatine et le polypeptide pancréatique modulant l'activité des autres types de cellules.<sup>1</sup>

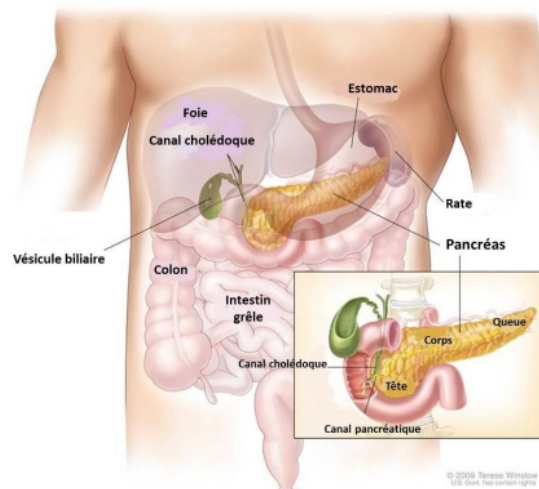


Figure 47. Anatomie du pancréas ; figure extraite d'une page web.

### I.1. Cancer du pancréas

#### I.1.1. Épidémiologie

Le cancer du pancréas est une maladie très agressive et dévastatrice qui survient lorsque les cellules du pancréas se développent de manière incontrôlée et forment une tumeur. Malgré une incidence relativement faible (11<sup>ème</sup> cancer le plus commun),<sup>2</sup> il est la quatrième cause de décès liés au cancer dans le monde.<sup>3</sup> 1.6% des hommes et femmes développeront un cancer du pancréas au cours de leur vie.<sup>2</sup> La majorité (90%) des cancers du pancréas sont des adénocarcinomes canaux pancréatiques (*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC en anglais).<sup>4</sup> Parmi eux, 70% sont localisés au niveau de la tête du pancréas, 20% au niveau du corps et 10% au niveau de la queue.<sup>5</sup> Le PDAC possède un mauvais pronostic avec un taux de

survie de seulement 9.3% après 5 ans.<sup>2</sup> Ce sombre pronostic est principalement dû à l'absence de symptômes visibles et distinctifs, au manque de biomarqueurs fiables pour un diagnostic précoce, ainsi qu'à une croissance, une agressivité et une propagation métastatique rapide.<sup>4</sup> En effet, 8 patients sur 10 sont diagnostiqués lorsque le cancer s'est déjà propagé en dehors du pancréas.<sup>2</sup> En 2018, environ 460 000 nouveaux cas et 432 000 décès dus au PDAC ont été signalés.<sup>6</sup>

Plusieurs facteurs vont favoriser le développement de ce cancer. Parmi eux, on retrouve la consommation d'alcool et de tabac, le diabète, le surpoids et l'obésité, mais aussi le sexe et l'âge puisque les hommes sont plus touchés que les femmes et les personnes âgées ont plus de risques de développer ce cancer.<sup>6,7</sup> L'historique familial ainsi que les pancréatites chroniques sont deux autres facteurs importants.<sup>8</sup>

### I.1.2. Physiopathologie

Les symptômes du cancer du pancréas sont souvent confondus avec ceux de la pancréatite, c'est-à-dire l'inflammation du pancréas. La perte d'appétit et de poids, la jaunisse, des douleurs abdominales ou dorsales et le diabète, sont les symptômes associés à ce type de pathologie. Il existe deux types de pancréatites. La pancréatite aiguë est une inflammation rapide du pancréas pouvant être mortelle et souvent due à une consommation d'alcool excessive et à des calculs biliaires.<sup>9</sup> La pancréatite chronique est une inflammation chronique du pancréas, caractérisée par la formation de calcifications. Plusieurs facteurs en sont la cause : l'alcoolisme, une mauvaise nutrition, l'hyperparathyroïdie ou encore des anomalies génétiques. Les pancréatites peuvent évoluer vers des lésions précancéreuses. Le risque augmente avec la sévérité de la pathologie.<sup>10</sup>

Comme de nombreuses autres maladies malignes, le développement du cancer du pancréas résulte de lésions précurseurs appelées néoplasies intraépithéliales pancréatiques (PanIN). Ces lésions sont classées selon leur sévérité, de PanIN1 (grade peu avancé) à PanIN3 (grade avancé) pour aboutir à un carcinome invasif. C'est l'accumulation de mutations qui entraîne l'apparition de ces cellules cancéreuses, non détectables par l'imagerie pancréatique. De très nombreuses mutations sont responsables du développement du cancer, ce qui en fait une pathologie très hétérogène. L'anomalie la plus fréquente dans le cancer du pancréas est la mutation de gènes oncogènes tels que le gène KRAS. Cette mutation est retrouvée dans 85% des cas et à un stade très précoce (lésions PanIN1) du développement du PDAC. On retrouve ensuite l'inactivation de différents gènes suppresseurs de tumeurs<sup>11</sup> tels que CDKN2A (plutôt retrouvé dans les lésions PanIN2 et dans environ 95% des cas) et les gènes TP53 et SMAD4 (ou MADH4) qui apparaissent tardivement (lésions PanIN3 et retrouvés dans 50 à 70% des cas). Enfin les pertes chromosomiques étendues,<sup>12</sup> les amplifications géniques,<sup>13</sup> l'hyperméthylation des gènes<sup>14</sup> et le raccourcissement des télomères sont aussi des anomalies fréquemment observées (Figure 48).<sup>15-17</sup>

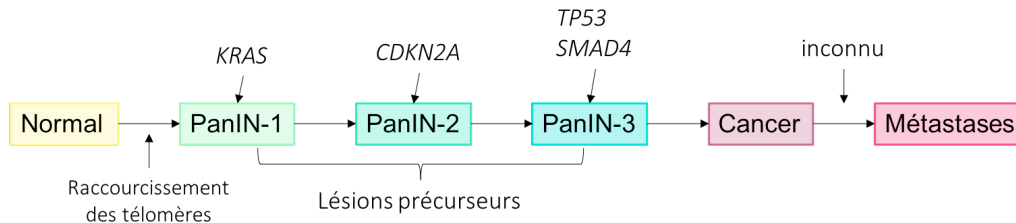


Figure 48. Modèle de la progression génétique de la cancérogénèse pancréatique ; figure adaptée d'article.<sup>16</sup>

Ces mutations (environ 60) interviennent dans au moins douze voies de signalisation différentes. Parmi elles, on retrouve la voie de signalisation responsable du contrôle des dommages à l'ADN, celle responsable de la réparation de ces dommages, la voie de signalisation permettant la régulation du cycle cellulaire, la voie de signalisation de facteurs de croissance (TGF $\beta$ ) ou encore celle impliquée dans la modification de la chromatine.<sup>16</sup> La modification de ces nombreuses voies de signalisation influence donc la prolifération, la survie et le caractère invasif des cellules.

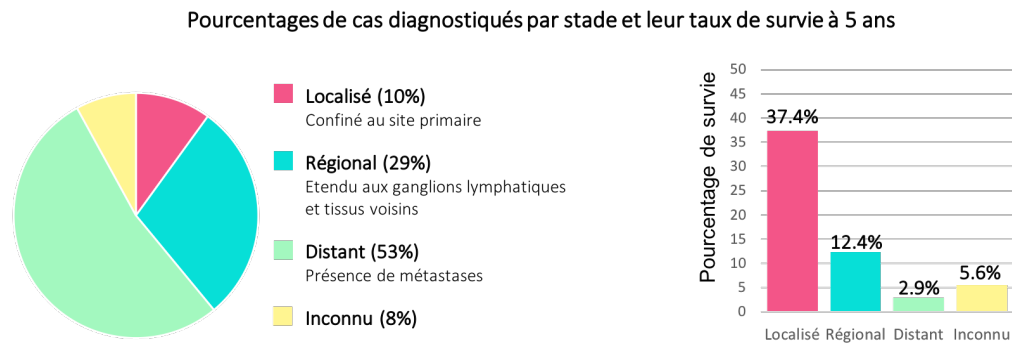
De plus, il a été montré que 1 à 5% des cancers du pancréas présentent des cellules souches cancéreuses. Ces cellules sont capables de s'auto-renouveler et de produire des lignées hétérogènes de cellules cancéreuses, ce qui les rend responsables de la progression accélérée du cancer, de l'invasion rapide par formation de métastases et de la résistance aux traitements.<sup>18,19</sup>

Chaque cancer du pancréas est différent et caractérisé par un groupe de mutations précises entraînant des modifications moléculaires. Il serait donc intéressant de déterminer les caractéristiques histopathologiques des tumeurs afin d'adapter au mieux le traitement et obtenir de meilleurs résultats.

### I.1.3. Diagnostic et thérapie

L'état d'avancement du cancer au moment du diagnostic détermine les options de traitement et impacte fortement le pronostic du patient. Le cancer peut être localisé, c'est-à-dire qu'il se trouve seulement dans la partie du corps où il a débuté (stade 1) ou la tumeur peut être plus volumineuse, mais toujours dans le même organe (stade 2). Le cancer peut ensuite être régional. Dans ce cas, les ganglions lymphatiques peuvent être envahis ainsi que les tissus voisins (stade 3). Enfin, il peut être distant, c'est-à-dire que des métastases se sont développées dans d'autres parties du corps (stade 4). Plus le cancer est détecté tôt, plus le choix de traitements augmente et meilleures sont les chances de survie. Pour le cancer du pancréas, seulement 10.3% des patients sont diagnostiqués au stade localisé (stades 1 et 2), avec un taux de survie à 5 ans de 37.4%. En revanche, 53% des patients sont diagnostiqués au stade distant (stade 4) avec un taux de survie de seulement 2.9% (Figure 49).<sup>2</sup>





**Figure 49.** Pourcentage de patients diagnostiqués avec un cancer du pancréas, par stade et leur taux de survie (statistiques aux USA) ; figure adaptée d'une page web.<sup>2</sup>

Malgré les progrès scientifiques, il n'existe actuellement aucun programme de dépistage du cancer du pancréas. En effet, nous ne disposons pas de marqueurs spécifiques de la maladie qui permettrait une détection précoce du cancer du pancréas dans la population.<sup>20,21</sup> De plus, les lésions précancéreuses et les cellules cancéreuses à un stade précoce ne provoquent pas de symptômes chez le patient atteint du cancer du pancréas. Avec l'avancement du cancer quelques symptômes apparaissent, mais ceux-ci sont similaires à ceux de nombreuses autres pathologies, ce qui rend le diagnostic compliqué et donc la détection précoce du cancer difficile et rare.<sup>15</sup> Certains symptômes peuvent être détectés lors de l'examen clinique et orienter le patient vers des analyses sanguines ou urinaires mais la plupart des tests sanguins montrent des résultats non spécifiques. C'est par exemple le cas de l'antigène carbohydrate 19.9 (CA 19.9) qui est une substance produite par les cellules cancéreuses pancréatiques, mais qui est aussi présente dans d'autres maladies.<sup>21,22</sup> Cependant, l'évaluation du taux de ce marqueur reste utilisée pour stadifier et suivre la réponse thérapeutique.

Lorsque le cancer est soupçonné, les médecins ont recours à l'imagerie médicale. Le scanner est le premier examen utilisé.<sup>17</sup> Il permet de diagnostiquer, de façon assez efficace, la présence de tumeur et de stadifier l'avancement du cancer. L'échographie endoscopique,<sup>23</sup> l'imagerie par résonance magnétique combinée à la cholangiopancreatographie<sup>24</sup> et la TEP/CT permettent une meilleure sensibilité pour évaluer la résecabilité.<sup>25</sup> La résecabilité est déterminée selon la présence ou non de métastases péritonéales ou hépatiques, ainsi que l'état d'invasion des vaisseaux sanguins et canaux pancréatiques.<sup>26</sup> Il est important de l'évaluer afin d'adapter au mieux la stratégie thérapeutique. Toutefois, toutes ces techniques d'imagerie ont une efficacité limitée pour le diagnostic du cancer du pancréas.<sup>27,28</sup> À ce jour, la TEP/CT par l'utilisation du [<sup>18</sup>F]FDG semble être la meilleure technique pour diagnostiquer, stadifier la maladie et suivre l'efficacité des traitements mais de nombreux progrès sont encore à faire.<sup>28,29</sup> Enfin, la biopsie permet de caractériser au mieux la tumeur afin d'ajuster le protocole thérapeutique.

A partir de ce diagnostic, les patients sont classés en quatre catégories selon la résecabilité de leur tumeur.<sup>17</sup>

- Tumeur locale et résecable (stade 1 et 2, pas d'infiltration des vaisseaux, survie moyenne de 17 à 23 mois) ;
- tumeur limite résecable (stade 3 sans infiltration importante des vaisseaux, survie moyenne inférieure à 20 mois) ;
- tumeur avancée et non résecable (stade 3 avec infiltration des vaisseaux, survie moyenne de 8 à 14 mois) ;
- tumeur métastatique, non résecable (stade 4, survie moyenne de 4 à 6 mois).

Les taux de survie des patients atteints de PDAC sont extrêmement faibles, notamment parce que la majorité des tumeurs sont à un stade avancé au moment du diagnostic (80 à 90% des patients diagnostiqués sont à un stade non résecable)<sup>30</sup> et que le nombre important de mutations rend les cellules résistantes à la plupart des traitements. Les options de traitements disponibles sont relativement limitées et peu efficaces pour le PDAC. Parmi elles, on retrouve la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'immunothérapie et l'utilisation de thérapies ciblées, pouvant être utilisées séparément ou en combinaison. La plupart des traitements sont palliatifs, afin de diminuer les douleurs, améliorer la qualité de vie et prolonger la durée de vie des patients.<sup>4</sup>

Le choix de la stratégie thérapeutique utilisée dépend de la résecabilité de la tumeur et du stade d'avancement du cancer (Figure 50).

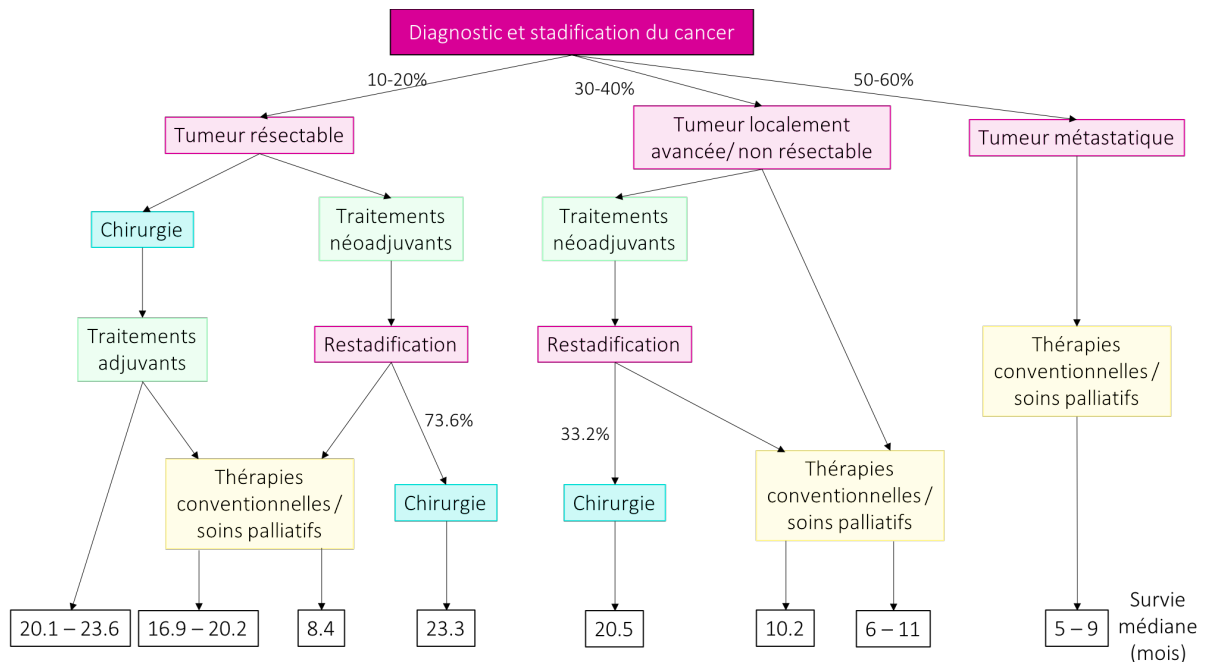


Figure 50. Modèle schématisé des stratégies thérapeutiques pour un PDAC diagnostiqué ; figure adaptée de revues.<sup>4,30</sup>

La chirurgie est le traitement le plus efficace mais seulement 10 à 20% des patients présentent une tumeur résecable et y sont donc éligibles. De plus, le taux de rechute est très élevé, avec un taux de survie à 5 ans de seulement 20 à 25%.<sup>17</sup> Environ 40% des patients rechutent dans les 6 à 24 mois après l'opération chirurgicale.<sup>31</sup> Ceci est dû à la présence de marges tumorales positives, de micrométastases au caractère peu ou non différencié de la tumeur, ou encore à la présence de ganglions lymphatiques infiltrés. Plusieurs marqueurs ont été associés à un risque élevé de rechute et il est donc important d'évaluer précisément les risques de récurrence du patient afin d'éviter une résection inutile, mais également pour identifier les patients pour lesquels des traitements alternatifs seraient plus appropriés.<sup>32</sup> Plusieurs options de chirurgie sont possibles : la résection partielle du pancréas ou la résection complète, mais celle-ci s'accompagne d'une mauvaise récupération post-opératoire due à un déséquilibre métabolique.<sup>4</sup> La chirurgie peut être combinée à des traitements adjuvants (gemcitabine, 5-fluorouracile), prescrits en amont ou en aval de celle-ci. Ils permettent de réduire la taille de la tumeur avant chirurgie ou de réduire le risque de récurrence après la chirurgie.<sup>30</sup>

Pour les patients à un stade localement avancé non résecable ou métastatique, la chimiothérapie et la radiothérapie sont des options de traitement possibles.<sup>33,34</sup> Cependant, de par l'hétérogénéité des mutations génétiques, le PDAC fait partie des cancers les plus chimiorésistants. Les premiers traitements pour le cancer du pancréas reposaient sur l'utilisation du 5-fluorouracile (5-FU) et de ses analogues mais l'efficacité était modérée. Depuis 1997, la gemcitabine est le traitement de référence, présentant de meilleurs résultats.<sup>35</sup> Plusieurs thérapies peuvent être combinées mais ceci augmente la toxicité et n'est donc pas favorable pour la plupart des patients, trop affaiblis par la maladie. Cependant, une combinaison de la gemcitabine au cisplatine, épirubicine et 5-fluorouracile (PEFG) a montré un effet bénéfique comparé à la gemcitabine seule, en augmentant légèrement le taux de survie à 1 an.<sup>36</sup> La gemcitabine a ensuite été combinée à d'autres traitements tels que la capécitabine ou encore le paclitaxel, ce qui a conduit à plusieurs essais cliniques montrant une prolongation de la survie.<sup>37-39</sup>

La combinaison au paclitaxel a fait l'objet d'un essai clinique de phase III qui a montré une amélioration significative de la durée de vie, mais s'accompagnant parfois de l'augmentation d'effets indésirables.<sup>40</sup> Toutefois, les thérapies telles que le paclitaxel et le FOLFIRINOX (irinotécan, oxaliplatine, fluorouracile et leucovorine) ont été approuvées par la FDA et ont montré des résultats assez satisfaisants malgré une toxicité importante.<sup>4,41</sup> Ce sont maintenant des traitements de première intention pour les cancers avancés ou métastatiques. Pour les cancers au stade métastatique, la plupart des traitements prescrits sont palliatifs.

Comme nous l'avons souligné précédemment, le cancer du pancréas est dû à de nombreuses mutations dans différentes voies de signalisation. C'est pourquoi les thérapies ciblées sont apparues comme une possibilité d'augmenter les options de traitement et d'améliorer les thérapies existantes. Plusieurs thérapies ciblées ont été développées afin de cibler les

récepteurs aux facteurs de croissance (EGFR et VEGFR), les voies de signalisation KRAS ou PARP, ainsi que les cellules du stroma.<sup>30</sup> Cette approche a en effet montré de très bons résultats dans le traitement de nombreuses tumeurs (poumon, colon, mélanome...) mais du fait de l'hétérogénéité du cancer du pancréas, la plupart des thérapies ciblées n'ont pas montré d'efficacité supérieure au traitement classique pour le PDAC. L'erlotinib (inhibiteur du récepteur du facteur de croissance EGFR), en combinaison avec la gemcitabine, est la seule thérapie ayant montré une amélioration modérée (deux semaines) de la survie des patients.<sup>42</sup> La plupart des études sur les thérapies ciblées donnent des résultats prometteurs dans un cadre préclinique ou clinique mais échouent lors des essais de phase II/III.<sup>4</sup>

Pour conclure, malgré des progrès significatifs dans la détection et le traitement de nombreux cancers, le diagnostic et la thérapie du PDAC n'ont connu que peu d'améliorations ces dernières années. La chirurgie accompagnée de traitements adjuvants est aujourd'hui la seule option curative réaliste. L'hétérogénéité et la complexité du PDAC sont considérées comme un obstacle au développement de thérapies. Cependant, malgré une augmentation du taux d'incidence du PDAC, le taux de mortalité a diminué ces dernières années.<sup>43</sup> De plus, de nombreuses études sont en cours et montrent des résultats encourageants.

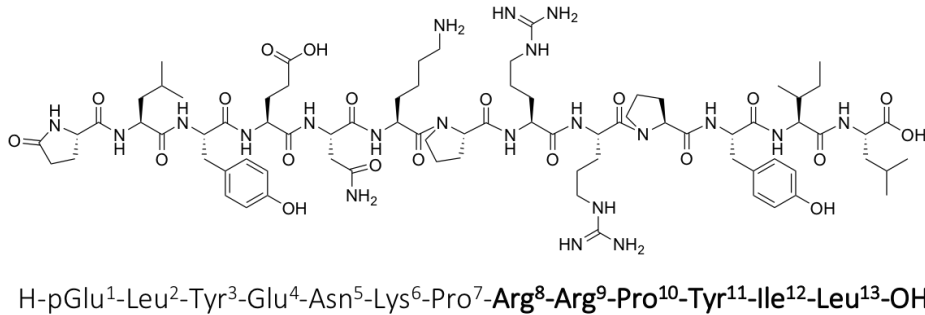
## I.2. Neurotensine

### I.2.1. La neurotensine et ses récepteurs

La neurotensine (NT) est un peptide endogène présent dans le système nerveux central et dans les tissus périphériques tels que le tractus gastro-intestinal. Ce peptide a été isolé de l'hypothalamus bovin pour la première fois en 1973 par Carraway.<sup>44</sup> Il fut aussi isolé de l'intestin de diverses espèces telles que les espèces canine, porcine, bovine et humaine.<sup>45,46</sup> La neurotensine est un peptide de treize acides aminés (H-pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH) dont la structure est conservée chez la plupart des espèces.<sup>47,48</sup> Son temps de demi-vie est très court (entre 0.5 et 4 min) dû à une dégradation par des peptidases, proche de son lieu de sécrétion.<sup>49</sup>

La plus petite séquence de liaison de la neurotensine à ses récepteurs est la partie C-terminale, constituée de six acides aminés (H-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH), appelée NT(8-13) (Figure 51).<sup>50,51</sup>

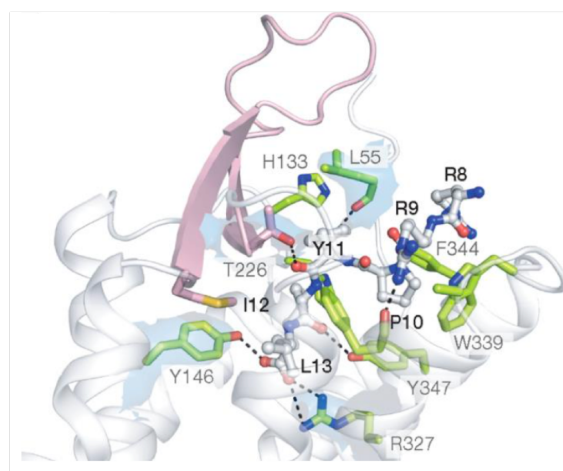
Ce fragment NT(8-13) est responsable de l'activité pharmacologique du peptide et possède une affinité pour les récepteurs à la neurotensine (NTS) de l'ordre du subnanomolaire, dix à vingt fois meilleure que la neurotensine entière.<sup>52,53</sup>



**Figure 51.** Structure de la neurotensine et du plus petit fragment responsable de la liaison entre la neurotensine et les récepteurs (en gras).

Il existe quatre types de récepteur à la neurotensine (NTS<sub>1</sub>, NTS<sub>2</sub>, NTS<sub>3</sub> et NTS<sub>4</sub>).<sup>54</sup> Les récepteurs NTS<sub>1</sub> et NTS<sub>2</sub> sont des récepteurs couplés aux protéines G et sont constitués de sept domaines transmembranaires.<sup>55</sup>

Le NTS<sub>1</sub> est le sous-type le plus étudié. Il a été cloné pour la première fois en 1990 chez le rat puis chez l'homme.<sup>56,57</sup> Ce récepteur est présent dans le cerveau, le tractus digestif et le système cardiovasculaire. Il est constitué, chez l'homme, de 418 acides aminés et présente 84% d'homologie avec celui du rat.<sup>58</sup> La première structure cristalline est publiée en 2012 et montre l'interaction entre la partie C-terminale de la neurotensine et les acides aminés constituant la poche (PDB#4GRV). L'acide carboxylique terminal, les chaînes latérales de l'arginine<sup>10</sup> et de la tyrosine<sup>11</sup> ainsi que les groupements carbonyles des liaisons peptidiques entre Tyr<sup>11</sup>-Ile<sup>12</sup> et Ile<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup> forment des liaisons avec la poche du récepteur (Figure 52).<sup>59</sup> La liaison de la neurotensine au NTS<sub>1</sub> conduit à l'internalisation du complexe, suivie par sa dissociation.<sup>60</sup> La concentration en neurotensine régule l'expression des récepteurs NTS<sub>1</sub>.<sup>61</sup>



**Figure 52.** Représentation de la poche du récepteur à la neurotensine de type 1 (NTS<sub>1</sub>) complexé au fragment NT(8-13) ; figure extraite d'article.<sup>59</sup>

Le récepteur NTS<sub>2</sub> est principalement localisé dans le cerveau et est moins affiné pour la neurotensine.<sup>54,62</sup> Il possède 64% d'homologie avec NTS<sub>1</sub>.

Les récepteurs NTS<sub>3</sub> et NTS<sub>4</sub> possèdent un seul domaine transmembranaire. Ils sont principalement localisés au niveau du cerveau et exprimés dans les cellules et non à leur surface. Le NTS<sub>3</sub> ou NTS<sub>3</sub>/sortiline a été cloné en 1998 et présente une homologie de 100% avec la gp95/sortiline (protéine impliquée dans le tri des récepteurs).<sup>54</sup> Ses fonctions physiologiques sont à ce jour encore assez peu connues.<sup>63,64</sup> Enfin, le récepteur NTS<sub>4</sub>, aussi appelé SorLA/LR<sub>11</sub>, a été isolé en 2001 et présente quelques similitudes avec le NTS<sub>3</sub>. Son rôle est encore relativement méconnu mais il semblerait intervenir dans l'endocytose et le tri de récepteurs.<sup>65</sup>

### I.2.2. Rôle physiologique

La neurotensine joue un rôle important dans de nombreux processus physiologiques et l'altération de ses fonctions participe à un grand nombre de pathologies.<sup>66,67</sup>

Au niveau du système nerveux central, la neurotensine agit comme neurotransmetteur et neuromodulateur. Elle module la signalisation de la dopamine en agissant comme antagoniste des récepteurs D<sub>2</sub> ce qui conduit à une augmentation de la libération de dopamine.<sup>68</sup> Elle a donc un effet analgésique et anti-psychotique.<sup>69</sup> Les analogues de la neurotensine, en particulier agonistes des NTS<sub>2</sub>, ont montré un potentiel thérapeutique dans la modulation de la douleur en agissant comme analgésiques indépendants des opioïdes.<sup>70,71</sup> De plus, l'administration de neurotensine induit une hypothermie.<sup>72</sup>

De par son implication dans la modulation du signal dopaminergique, la neurotensine est impliquée dans des troubles neurologiques tels que la schizophrénie,<sup>73</sup> la maladie de Parkinson<sup>74</sup> et la maladie de Huntington.<sup>75</sup> Elle est aussi impliquée dans le phénomène d'addiction.<sup>76</sup>

Au niveau du système périphérique, la neurotensine joue un rôle dans les systèmes digestif et cardiovasculaire. Au niveau du système digestif, elle agit comme une hormone en modulant l'activité du tractus digestif. Elle est sécrétée par les cellules entéro-endocrines du petit intestin<sup>77</sup> et libérée après les repas afin de faciliter la digestion.<sup>78</sup> Elle est responsable de la diminution de la motilité gastrique. En revanche, elle stimule la motilité du colon.<sup>79,80</sup> Elle induit aussi une augmentation du taux d'insuline et stimule la sécrétion pancréatique et biliaire.<sup>81</sup> La neurotensine exerce un effet prolifératif sur la muqueuse du tractus gastro-intestinal normal et peut avoir des effets réparateurs et protecteurs (anti-inflammatoires, antioxydants, mitogènes et anti-apoptotiques) sur les tissus gastro-intestinaux.<sup>66,82</sup> De plus, elle est responsable de la diminution de la consommation alimentaire,<sup>83</sup> stimule la croissance des tissus gastro-intestinaux<sup>84,85</sup> et stimule la cicatrisation des plaies intestinales suite à des inflammations chroniques.<sup>86</sup>

Au niveau du système cardiovasculaire, la neurotensine contrôle en partie la pression sanguine.<sup>44,87</sup>

### I.2.3. Rôle dans les cancers

La neurotensine stimule la croissance de nombreux cancers tels que le cancer du pancréas,<sup>88</sup> du colon,<sup>89</sup> de la prostate,<sup>90</sup> du poumon,<sup>91</sup> du sein,<sup>92</sup> de la tête et du cou<sup>93</sup> et de certains glioblastomes.<sup>94</sup> L'interaction de la neurotensine avec ses récepteurs participe à la croissance des cancers en activant des voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, la survie, la migration des cellules et le processus d'invasion.<sup>95</sup> Une diminution d'au moins 50% du volume et poids des tumeurs a été observée lorsque des animaux xénogreffés étaient traités quotidiennement avec un antagoniste du NTS<sub>1</sub>.<sup>89,96</sup>

La sécrétion de la neurotensine et la surexpression des NTS<sub>1</sub> par diverses cellules cancéreuses ont été largement étudiées et vérifiées. En effet, les NTS<sub>1</sub> sont surexprimés à la surface des cellules de différents cancers tels que le PDAC,<sup>97</sup> le sarcome d'Ewing,<sup>98</sup> le cancer de la prostate,<sup>99</sup> du colon,<sup>100</sup> du poumon à petites cellules<sup>101</sup> et du sein.<sup>102</sup> Leur surexpression a été associée à un taux élevé de métastases et à un mauvais pronostic.<sup>91,103</sup> En effet, la progression du cancer d'une tumeur primaire à une maladie métastatique est la principale cause de décès des patients. La neurotensine a été montrée comme responsable de la migration des cellules dans le PDAC.<sup>104</sup>

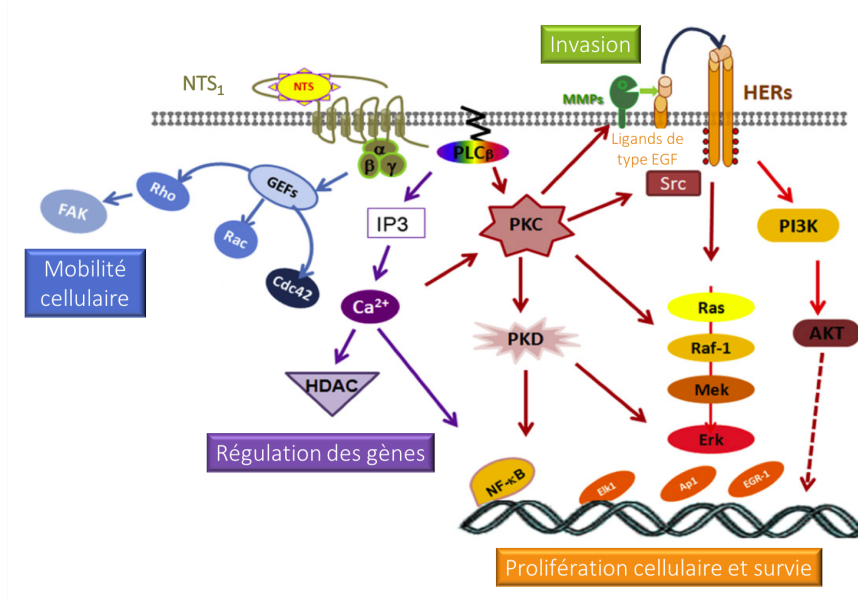
Les NTS<sub>1</sub> sont surexprimés dans 75% des PDAC primaires et dans 63% des métastases hépatiques alors qu'ils ne sont pas détectés dans le pancréas sain, les pancréatites ou le cancer endocrinien pancréatique.<sup>105,106</sup>

Il existe de nombreuses voies de signalisation impliquant la neurotensine et les NTS<sub>1</sub> mais tous les mécanismes ne sont, à ce jour, pas encore totalement élucidés. Seuls les plus étudiés seront évoqués ici. Trois voies principales sont activées et conduisent à la prolifération et survie cellulaire, à la régulation de l'expression des gènes et à la mobilité cellulaire (Figure 53).<sup>82</sup>

La liaison de la neurotensine au NTS<sub>1</sub> induit une activation de la protéine G liée au récepteur qui active à son tour différents seconds messagers. Parmi les voies de signalisation impliquées, on retrouve les voies de signalisation liées à la phospholipase C (PLC) qui induisent la stimulation de la protéine kinase C (PKC) et la mobilisation de calcium intracellulaire (en violet sur la Figure 53), et confèrent aux cellules des propriétés tumorigènes. La prolifération et la survie cellulaire sont dues à l'activation de la PKC (en rouge sur la Figure 53). En effet, celle-ci peut activer le récepteur au facteur de croissance EGFR, qui sollicitera soit la voie des MAP kinases, soit la voie de la PI3K. La PKC peut aussi activer directement la voie des MAP kinases en stimulant Raf-1. Enfin, la PKC peut induire la voie de signalisation passant par la protéine kinase D. L'activation du EGFR est impliquée dans l'expression des gènes de prolifération, de différenciation et de survie. Les mécanismes impliqués dans les effets pro-migratoires ou pro-invasifs ne sont pas encore totalement élucidés malgré quelques hypothèses (en bleu sur la Figure 53). La neurotensine stimulerait différentes GTPases, en partie responsables de la



dynamique du cytosquelette et connues pour contribuer à la formation de diverses extensions cytoplasmiques.



**Figure 53.** Représentation schématique des voies de signalisation par lesquelles l'interaction NT/NTS<sub>1</sub> contribue à la progression du cancer ; figure adaptée de revue.<sup>82</sup>

L'implication de la neurotensine et ses récepteurs dans de nombreux processus pathologiques en fait donc des cibles potentielles pour l'imagerie ou la thérapie de nombreuses maladies.<sup>82,107</sup>

### I.3. Présentation du projet

Il semble nécessaire de concevoir de nouveaux outils visant à améliorer la détection et le traitement du PDAC afin d'augmenter le taux de survie.

Comme nous l'avons précédemment montré, les NTS<sub>1</sub> sont des cibles de choix pour le ciblage du cancer du pancréas.<sup>108</sup> Les peptides sont également des vecteurs présentant de nombreux avantages pour le ciblage de tumeurs tels que leur facilité de synthèse, leur petite taille qui leur confère une clairance rapide et une bonne pénétration dans les tumeurs, ainsi que leur très bonne affinité et sélectivité pour leur récepteur. Toutes ces propriétés en font de bons agents de ciblage pour l'imagerie ou la thérapie.<sup>109-111</sup> C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser un analogue de la neurotensine comme vecteur.

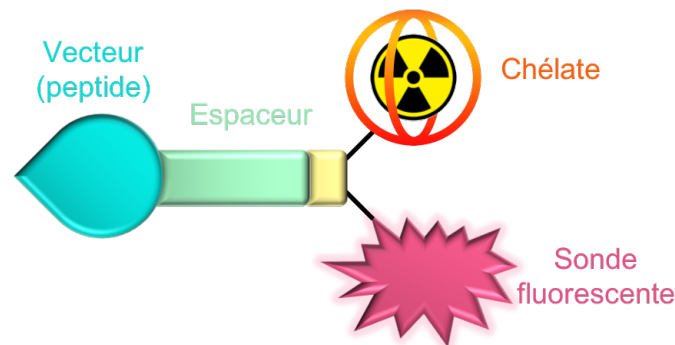
Une stratégie intéressante est la combinaison de l'imagerie nucléaire et l'imagerie optique.<sup>112,113</sup> L'alliance de ces deux modalités au sein d'une même molécule permettrait la détection et la quantification efficace des tumeurs et métastases, ainsi que la stadification du cancer, grâce à l'imagerie TEP,<sup>114</sup> tandis que l'imagerie par fluorescence permettrait



l'assistance à la chirurgie en facilitant la délimitation des marges tumorales et la détection de métastases invisibles à l'œil nu.<sup>115,116</sup> La stratégie serait d'injecter l'agent bimodal, réaliser l'imagerie TEP afin de diagnostiquer le patient et planifier la chirurgie, réaliser la chirurgie grâce à la fluorescence puis effectuer un bilan post-chirurgie et le suivi du patient grâce à la TEP. Cette stratégie a déjà montré de très bons résultats en préclinique.<sup>117-120</sup>

Ces deux techniques d'imagerie sont complémentaires, l'une palliant les défauts de l'autre. La TEP assure une complète pénétrabilité des tissus et une quantification efficace tandis que la fluorescence permet une meilleure résolution lors de l'acte chirurgical. De plus les sensibilités sont excellentes pour les deux modalités ce qui facilite la mise en œuvre et réduit les quantités nécessaires de produit injecté.<sup>121,122</sup>

L'objectif de ce projet a consisté à développer et évaluer un agent d'imagerie ciblant les NTS<sub>1</sub> afin de réaliser le diagnostic par imagerie TEP et la chirurgie assistée par fluorescence du cancer du pancréas. Pour cela nous avons choisi d'utiliser un vecteur peptidique analogue de la neurotensine pour cibler les NTS<sub>1</sub>, sur lequel nous avons introduit un agent chélatant pour complexer le gallium-68 pour l'imagerie TEP et une sonde fluorescente pour l'imagerie optique. Plusieurs sondes fluorescentes et espaceurs ont été introduits afin d'évaluer leur impact sur la biodistribution et la liaison au récepteur (Figure 54).



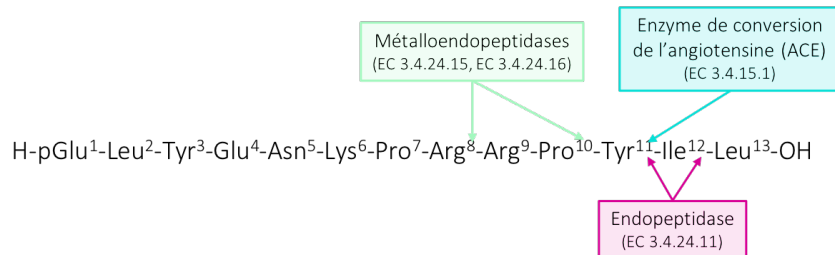
---

**Figure 54.** Représentation schématique de la structure du composé bimodal.

Nous avons tout d'abord synthétisé les différents composés. Ils ont ensuite été évalués *in vitro*, radiomarqués au gallium-68 et testés *in vivo* sur des souris saines et des souris porteuses d'un modèle de tumeur du pancréas humain (AsPC-1) afin d'évaluer leurs propriétés pharmacocinétiques, leur capacité de ciblage et leur efficacité pour la chirurgie assistée par fluorescence. Ce projet a été réalisé en partenariat avec le Dr. Aurélie Prignon qui a réalisé les expériences de radiomarquage et les études *in vivo* au Laboratoire d'Imagerie Moléculaire Positronique (LIMP, Sorbonne Université) à Paris.

## I.4. État de l'art

Comme nous avons pu le voir précédemment, les peptides présentent une faible stabilité métabolique. La neurotensine, par exemple, possède un temps de demi-vie *in vivo* de l'ordre de la minute dû à une dégradation par de nombreuses enzymes de types métallopeptidases, endopeptidases ou l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Ses sites de clivage se situent dans la partie C-terminale, entre Arg<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup>, Pro<sup>10</sup>-Tyr<sup>11</sup>, Tyr<sup>11</sup>-Ile<sup>12</sup> ou Ile<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup> (Figure 55).<sup>49</sup>



**Figure 55.** Séquence peptidique de la neurotensine ainsi que les lieux de clivage et enzymes responsables de sa dégradation ; figure adaptée d'article.<sup>49</sup>

Plusieurs stratégies peuvent être mises en place afin de limiter la dégradation des peptides. Le développement d'analogues de la neurotensine pour améliorer sa stabilité *in vivo* est un sujet de recherche très exploré ces dernières années.

### I.4.1. Développement d'analogues de la neurotensine

Le site de liaison entre la neurotensine et le récepteur se situe dans la région C-terminale du peptide. C'est aussi dans cette zone que se trouvent les sites de clivage. Il faut donc trouver des méthodes qui permettent de réduire la reconnaissance du peptide par les peptidases tout en conservant une bonne affinité pour les récepteurs à la neurotensine. Pour cela, plusieurs stratégies ont été envisagées :<sup>123,124</sup>

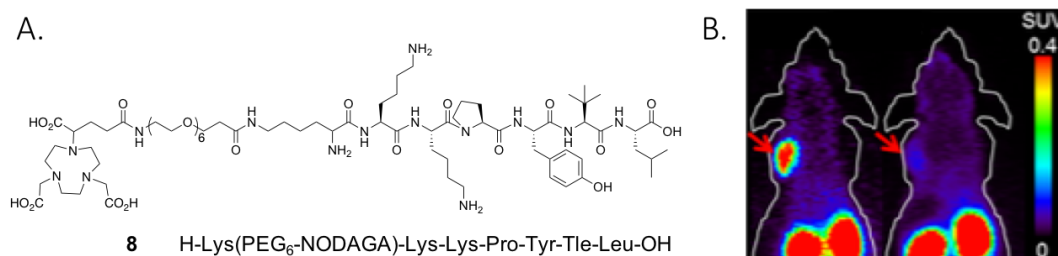
- modification des positions N- et/ou C-terminales ;
- substitution des acides aminés par des acides aminés D ou non naturels ;
- cyclisation, remplacement des liaisons peptidiques par des 1,2,3-triazoles ;<sup>125</sup>
- réduction des liaisons peptidiques ;<sup>126</sup>
- *N*-méthylation des liaisons amides ;<sup>127</sup>
- formation d'analogues multimériques.<sup>128</sup>

Grâce à ces stratégies, de nombreux analogues de la neurotensine (8-13) ont été développés et ont montré une amélioration du temps de demi-vie.<sup>123,129</sup>

### I.4.2. Développement d'analogues marqués de la neurotensine

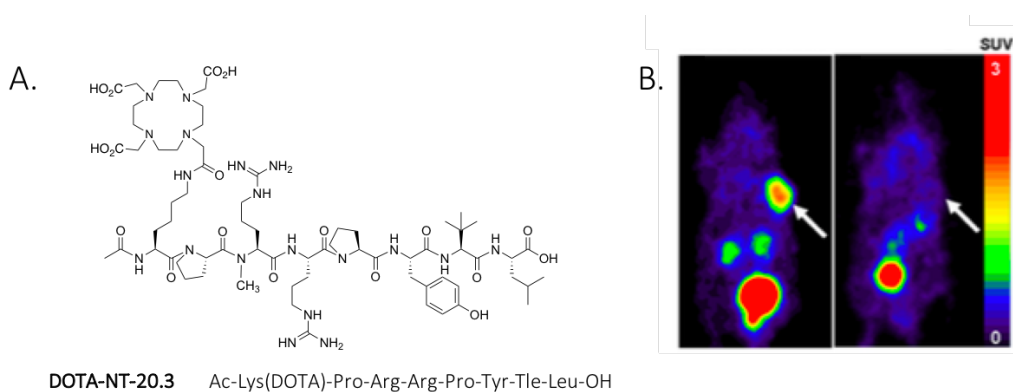
Ces techniques de stabilisation ont permis le développement d'analogues de la neurotensine qui ont pu être marqués pour l'imagerie nucléaire des NTS<sub>1</sub> ou la thérapie. Une revue de Maschauer et Prante, publiée en 2018, recense tous les radiopharmaceutiques ciblant les NTS<sub>1</sub>.<sup>130</sup> De nombreuses études ont été effectuées avec des composés marqués au technétium-99m pour l'imagerie TEMP.<sup>131–136</sup> De même, plusieurs études décrivent l'évaluation d'analogues marqués à l'indium-111.<sup>137–140</sup> En revanche, l'imagerie TEP a été beaucoup moins explorée. Le cuivre-64 a été très peu utilisé, probablement à cause d'un temps de demi-vie trop élevé.<sup>141</sup> L'évaluation de composés marqués au fluor-18 a montré de bons résultats.<sup>142–145</sup> Enfin, le marquage au gallium-68 a été étudié par quelques équipes.<sup>140,145–147</sup>

Parmi toutes ces études, quelques composés semblent très prometteurs. Pour les agents d'imagerie TEP, c'est par exemple le cas du composé **8** de Maschauer *et al.*, marqué au gallium-68 par l'intermédiaire d'un agent chélatant NODAGA (Figure 56A).<sup>145</sup> En effet, ce composé montre une bonne capture tumorale (environ 1.55%ID/g) et une clairance rapide des organes et du sang, avec très peu de bruit-de-fond, conduisant à des ratios allant de 3 à 30 pour le muscle et le sang respectivement (Figure 56B). En revanche, ce composé présente un signal très élevé dans les reins (environ 44%ID/g).



**Figure 56.** A. Structure du composé **8** ; B. Images obtenues par TEP d'une souris présentant une xénogreffe de tumeur colorectale (HT-29) entre 45 et 60 min après l'injection du composé [<sup>68</sup>Ga]Ga-**8**, sans (gauche) ou avec *blocking* (droite) ; figure adaptée d'article.<sup>145</sup>

Un autre composé présente un excellent profil de biodistribution, c'est le DOTA-NT-20.3 marqué au gallium-68 (Figure 57A).<sup>140,148</sup> Celui-ci possède une bonne affinité et spécificité pour les NTS<sub>1</sub> (IC<sub>50</sub> = 2.2 ± 0.3 nM). Le composé radiomarqué a montré une très bonne accumulation tumorale (environ 5%ID/g à 1 h p.i., sur un modèle de xénogreffe de tumeur du pancréas AsPC-1) et une clairance rapide des tissus sains conduisant à de bons ratios tumeur/organe à 1 h p.i. (d'environ 5 pour le sang à 20 pour le pancréas sain) (Figure 57B). Il a permis la détection de très petites tumeurs de façon spécifique. De plus, ce composé permet de discriminer le PDAC des pancréatites contrairement au [<sup>18</sup>F]FDG qui s'y accumule. Enfin, le signal dans les reins est nettement inférieur à celui observé avec le composé **8** de Maschauer (5%ID/g).

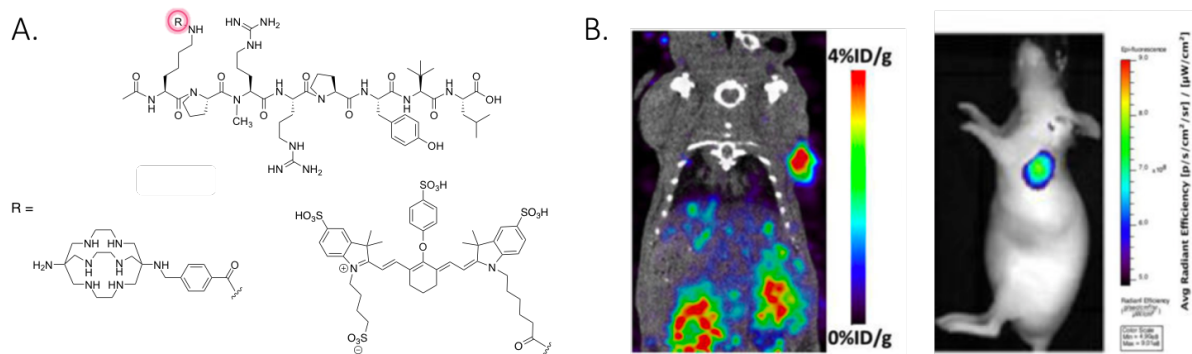


**Figure 57.** A. Structure du composé DOTA-NT-20.3 ; B. Images obtenues par TEP d'une souris présentant une xélogreffe de tumeur du pancréas (AsPC-1) entre 40 et 50 min après l'injection du composé [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-NT-20.3, sans (gauche) ou avec *blocking* (droite) ; figure adaptée d'article.<sup>148</sup>

Concernant l'imagerie optique, quelques équipes se sont intéressées à l'élaboration de composés fluorescents ciblant le cancer du pancréas.<sup>149</sup> Parmi ces équipes, la majorité a utilisé des anticorps ou fragments d'anticorps comme vecteurs, pour cibler l'antigène carcinoembryonnaire (ACE),<sup>150–153</sup> mais aussi l'antigène CA19.9,<sup>154</sup> la protéine MUC1<sup>155</sup> ou les récepteurs aux facteurs de croissance (EGFR et VEGF).<sup>156,157</sup> Quelques conjugués font actuellement l'objet d'études cliniques.<sup>156,158–160</sup>

En revanche, peu d'équipes ont développé des peptides fluorescents, et ceux-ci ciblent principalement les intégrines (peptide cRGD ou knottin anti- $\alpha_v\beta_6$ ).<sup>161–163</sup>

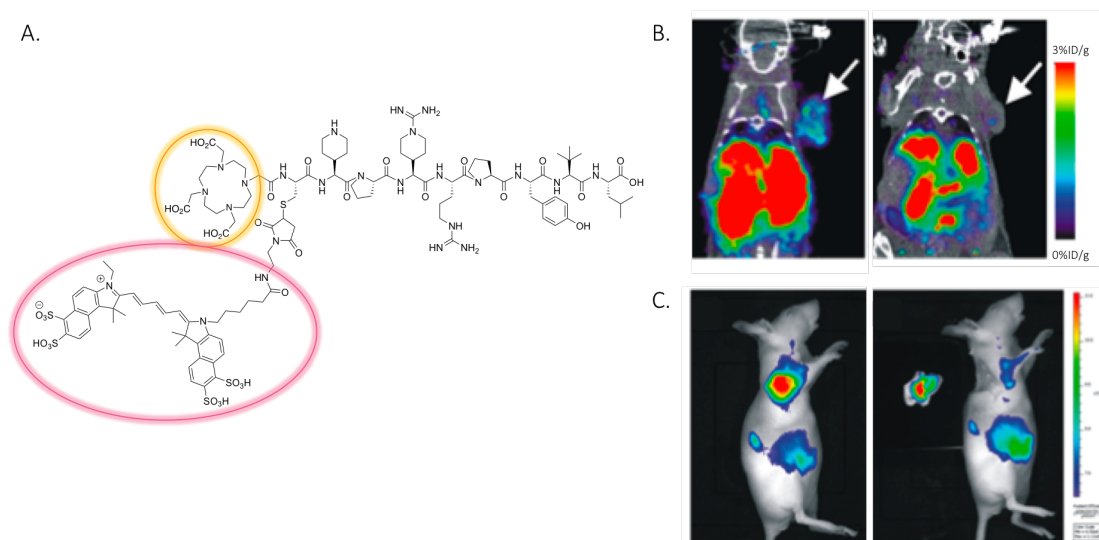
L'équipe de Yin a développé deux composés ciblant les NTS<sub>1</sub>, en utilisant le peptide NT-20.3 comme vecteur.<sup>164</sup> Un composé a été marqué au cuivre-64 grâce au chélate AmBaSar pour l'imagerie TEP et l'autre a été conjugué à l'IRDye800CW pour l'imagerie optique et la chirurgie assistée par fluorescence (Figure 58A). Ces composés ont été évalués sur des xélogreffes AsPC-1. Le composé marqué au  $^{64}\text{Cu}$  a montré une bonne accumulation tumorale à 4 h (2.3%ID/g) mais aussi un signal relativement important au niveau du foie, de l'intestin et des reins (environ 1 à 3%ID/g) (Figure 58B). L'imagerie par fluorescence à 1 h a permis d'identifier la tumeur et de faciliter la résection tumorale (Figure 58B).



**Figure 58.** A. Structure du peptide NT-20.3 (haut), du chélate AmBaSar (en bas à gauche) et de l'IRDye800CW (en bas à droite) ; B. Images de souris présentant une xélogreffe de tumeur du pancréas (AsPC-1) à 4 h après l'injection du composé [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-AmBaSAR-NT-20.3, obtenues par TEP (gauche) et 1 h après l'injection du composé IRDye800CW-NT-20.3 par fluorescence (droite) ; figure adaptée d'article.<sup>164</sup>

Malgré de bons résultats, il est préférable de combiner ces deux modalités au sein d'un seul agent d'imagerie afin de s'assurer d'une biodistribution unique et donc d'une bonne corrélation entre les deux modalités. Cela en s'assurant tout de même de la stabilité du composé *in vivo*.

À ce jour, un seul peptide bimodal TEP/fluorescence ciblant les NTS<sub>1</sub> a été décrit dans la littérature.<sup>165</sup> Ce composé est constitué d'un analogue de la neurotensine sur lequel a été introduit un DOTA, pour complexer le cuivre-64, et une sonde fluorescente cyanine 5.5 (Figure 59A). Ce composé a montré une bonne affinité et spécificité pour les NTS<sub>1</sub> exprimés par les cellules d'un modèle de tumeur du colon (HT-29). Toutefois, malgré une relativement bonne accumulation tumorale (1.8%ID/g), les propriétés pharmacocinétiques ne sont pas idéales, avec des accumulations hépatique et rénale importantes (4.6%ID/g et 14.2%ID/g respectivement) (Figure 59B). Ces résultats sont probablement dus à une lipophilie trop importante du fluorophore et au relargage du cuivre-64 par le DOTA. En effet, le choix de l'agent chélatant pour le cuivre-64 est important et peut impacter la concentration du radionucléide dans les tissus tels que le sang, le foie, la rate ou les reins.<sup>166</sup> Enfin, une bonne corrélation a été observée entre le signal de fluorescence et celui de la TEP. Une preuve de concept de chirurgie assistée par fluorescence a été réalisée et a permis d'éliminer la tumeur tout en vérifiant l'absence de tissus tumoraux résiduels (Figure 59C).



**Figure 59.** A. Structure du peptide bimodal ; Images d'une souris présentant une xénogreffe de tumeur colorectale (HT-29) à 4 h après l'injection du composé [<sup>64</sup>Cu]Cu-DOTA-NT-Cy5.5, (B.) obtenues par TEP/CT, sans (gauche) ou avec *blocking* (droite), ou (C.) par fluorescence avant (gauche) et après chirurgie (droite) ; figure adaptée d'article.<sup>165</sup>

Nous allons maintenant détailler le développement, l'optimisation et les résultats que nous avons obtenus lors de l'élaboration d'un composé peptidique bimodal TEP/fluorescence ciblant NTS<sub>1</sub> pour le diagnostic et la chirurgie assistée par fluorescence du cancer du pancréas.

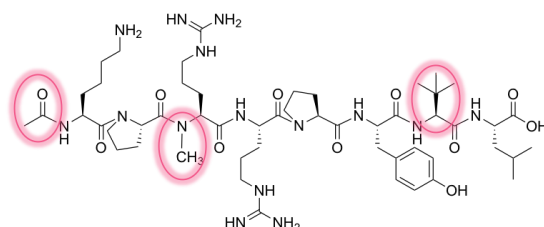
## II. Résultats et discussion

### II.1. Design des agents d'imagerie

Comme indiqué précédemment, de nombreux facteurs peuvent influencer les performances *in vitro* et *in vivo* d'une molécule. Parmi eux, on retrouve principalement la taille, la lipophilie ou encore la charge de la molécule. Ici, nous souhaitons introduire un complexe chélateur/radionucléide ainsi qu'une sonde fluorescente sur un vecteur. Il est prévisible que ces modifications fassent varier l'affinité du vecteur pour sa cible. Chaque élément a donc été choisi avec précaution et a conduit à la synthèse d'une série d'agents bimodaux.

#### II.1.1. Choix du vecteur

Nous avons choisi de baser la construction de nos composés sur la structure du peptide NT-20.3, un analogue de la neurotensine NT(6-13), ayant montré de très bonnes propriétés.<sup>140,148,167</sup> Ce peptide présente plusieurs modifications par rapport à la neurotensine native, introduites afin de réduire la dégradation enzymatique. En effet, la position N-terminale a été acétylée, la liaison amide entre la proline<sup>7</sup> et l'arginine<sup>8</sup> a été *N*-méthylée et enfin, l'isoleucine en position 12 a été substituée par une *tert*-leucine (Figure 60).

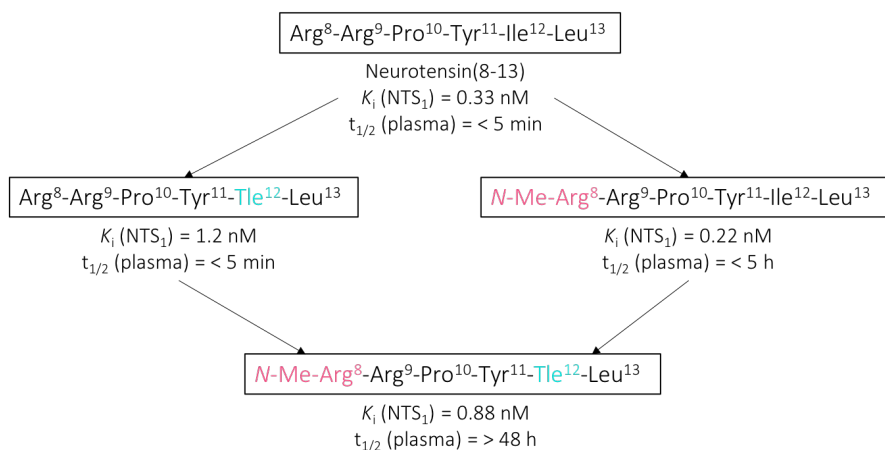


NT-20.3 : Ac-Lys-Pro-*N*-Me-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH

NT : H-pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH

**Figure 60.** Structure du peptide NT-20.3 et les modifications apportées par rapport à la neurotensine native.

Récemment, une équipe a étudié l'effet de la *N*-méthylation des liaisons peptidiques, ainsi que de l'introduction d'une *tert*-leucine sur la stabilité du peptide neurotensine(8-13) (Figure 61).<sup>168</sup> Ces résultats ont permis de confirmer que la *N*-méthylation de l'arginine<sup>8</sup> ainsi que la substitution de l'isoleucine<sup>12</sup> par une *tert*-leucine étaient les deux modifications permettant de conserver une excellente affinité pour les NTS<sub>1</sub> tout en améliorant nettement la stabilité.



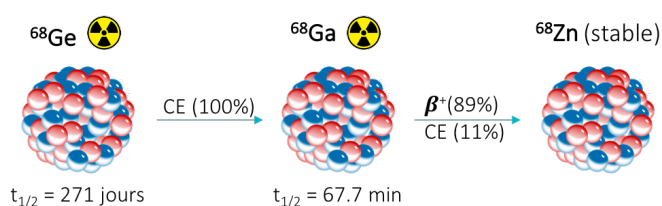
**Figure 61.** Schéma représentant les modifications apportées au peptide neurotensine(8-13) et les différences d'affinité et de stabilité correspondantes ; figure adaptée d'article.<sup>168</sup>

Ainsi, dans le cas du peptide NT-20.3, une bonne affinité pour les  $\text{NTS}_1$  est conservée ( $\text{IC}_{50} = 2.2 \pm 0.3 \text{ nM}$  contre  $1.7 \pm 0.4 \text{ nM}$  pour la neurotensine entière) et la stabilité dans le sérum murin est considérablement améliorée ( $> 90\%$  contre  $65\%$  après 4 h).

Dans notre projet, la lysine en position N-terminale jouera le rôle de plateforme trivalente, sur laquelle seront introduits l'agent chélatant ainsi que la sonde fluorescente.

### II.1.2. Choix du radioélément et de l'agent chélatant

Le radionucléide<sup>140,169</sup> ainsi que l'agent chélatant<sup>166,170,171</sup> peuvent largement modifier les propriétés pharmacocinétiques d'un composé. Afin de faire de l'imagerie TEP, nous avons choisi d'utiliser le gallium-68 (Figure 62). En effet, ce radionucléide présente de nombreux avantages. Tout d'abord, le gallium-68 possède une période radioactive courte (67.7 min), en adéquation avec les propriétés pharmacocinétiques des peptides. Par ailleurs, il est produit dans un générateur, ce qui le rend plus disponible et plus accessible que les radionucléides produits en cyclotron.<sup>172</sup> En effet, tous les hôpitaux ne possèdent pas de cyclotron et ne se trouvent pas forcément proches d'un centre de distribution de radioisotopes. Les générateurs sont aussi intéressants car ils sont moins onéreux. Les générateurs de gallium-68 sont des générateurs  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ . Le germanium-68 est produit dans des accélérateurs et possède un temps de demi-vie de 271 jours. Il décroît par capture électronique en gallium-68, qui décroît à son tour en zinc-68 (stable) par émission  $\beta^+$  (89%) et capture électronique (11%).<sup>173</sup>



**Figure 62.** Production et décroissance du gallium-68.



Comparés aux émetteurs gamma, les émetteurs de positons permettent une meilleure sensibilité, résolution et quantification. Cependant, l'énergie des particules émises va influencer la résolution spatiale. Le gallium-68 produit des positons de très haute énergie (1899 keV vs 634 keV pour le fluor-18), ce qui augmente le parcours effectué avant de rencontrer un électron et peut donc conduire à des images de moins bonne résolution spatiale. Cependant, au vu de la précision des technologies utilisées en clinique (3 mm), les images sont similaires, tandis qu'en préclinique les images au fluor-18 sont légèrement de meilleure qualité. Néanmoins, les images au  $^{68}\text{Ga}$  restent de meilleure qualité qu'avec le  $^{64}\text{Cu}$ , le  $^{89}\text{Zr}$  ou encore l' $^{124}\text{I}$  car l'émission est « plus propre » (89%  $\beta^+$  contre 19% pour le  $^{64}\text{Cu}$  ou 23% pour le  $^{89}\text{Zr}$  et l' $^{124}\text{I}$ ).<sup>174</sup> Ainsi, le  $^{68}\text{Ga}$  présente une dosimétrie plus sûre pour le patient que le  $^{64}\text{Cu}$  (émission de  $\beta^-$ ).<sup>175</sup> Depuis les années 2010, l'utilisation du gallium-68 pour la conception d'agents d'imagerie a considérablement augmenté.<sup>174,176</sup>

Afin d'introduire le  $^{68}\text{Ga}$  sur la molécule, il est nécessaire d'utiliser un agent chélatant bifonctionnel. Celui-ci permet à la fois la complexation du métal et la liaison au vecteur. Le chélateur doit permettre une cinétique de complexation rapide, dans des conditions douces si possible, et conduire à de bonnes activités spécifiques (activité mesurée par gramme de composé). Il doit aussi être sélectif du métal choisi afin d'assurer une bonne stabilité et l'inertie du complexe en conditions physiologiques. En effet, il faut éviter la transmétallation avec un élément présent dans le corps (comme le fer (III) par exemple) et la transcomplexation avec un agent chélatant endogène (tel que la transferrine). Ceci conduirait au relargage du métal et induirait une accumulation dans les organes non ciblés et donc un bruit-de-fond élevé en imagerie et une toxicité pour les tissus sains dans le cas de la radiothérapie.

Le  $\text{Ga}^{3+}$  est un acide de Lewis dur. Pour former des complexes stables, les chélates doivent donc présenter des bases de Lewis dures, c'est-à-dire des carboxylates, des amines, des phosphonates ou encore des hydroxamates.<sup>177</sup> De nombreux chélates pour le gallium sont disponibles et permettent de former des complexes stables (Figure 63).<sup>178-181</sup>

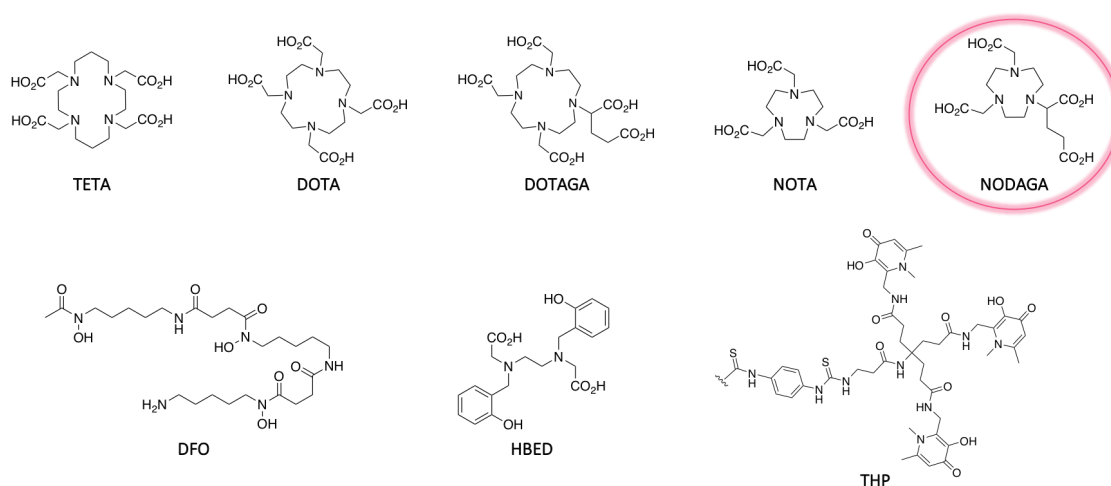


Figure 63. Exemples d'agents chélatants utilisés pour la complexation du gallium-68.



On retrouve des chélates macrocycliques azotés de type cyclam (TETA et dérivés), cyclène (DOTA et dérivés), TACN (NOTA et dérivés) et des chélates linéaires (DFO, HBED, THP...). Afin de conserver une bonne coordination, tout en étant fonctionnalisable, un bras permettant la conjugaison peut être ajouté à la structure (NODAGA, DOTAGA...).

Le Ga(III) est souvent hexacoordiné et, en raison de son faible rayon ionique, il forme des complexes plus stables avec des chélateurs présentant une petite cavité de type TACN.<sup>178,182</sup> C'est pour cela que nous avons choisi d'utiliser le NODAGA comme agent chélatant. En effet, sa constante de complexation avec le gallium est très bonne ( $\log K_{\text{Ga-NOTA}} = 31.0$ ), le radiomarquage peut être réalisé dans des conditions de radiomarquage douces et le complexe formé est très stable *in vivo*.<sup>179</sup>

### II.1.3. Choix de la sonde fluorescente

Comme nous l'avons vu en introduction, pour limiter le bruit-de-fond et obtenir des images de qualité en imagerie optique, il faut se placer dans la fenêtre thérapeutique, c'est-à-dire dans le domaine du proche infrarouge. Nous nous sommes donc intéressés à la famille des cyanines 5. En effet, ces molécules présentent des propriétés de fluorescence adéquates : longueurs d'onde d'excitation et d'émission autour de 650 nm, coefficients d'extinction molaire élevés (environ  $200\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) et bons rendements quantiques. Elles sont robustes *in vivo* et assez accessibles. Les sondes fluorescentes organiques ont, en général, un poids moléculaire élevé et sont assez lipophiles, ce qui peut drastiquement modifier les propriétés de la molécule à laquelle elles sont liées. Afin d'évaluer l'effet de la lipophilie des fluorophores, nous avons testé trois cyanines possédant des nombres de groupements sulfonates différents : une cyanine sans groupement sulfonate (Cy5),<sup>183</sup> une cyanine disulfonatée<sup>184-186</sup> et une cyanine tétrasulfonatée (Cy5.5\*\*) (Figure 64).<sup>187</sup> Ces sondes ont déjà fait l'objet d'études précliniques et/ou cliniques et ont montré de bons résultats.

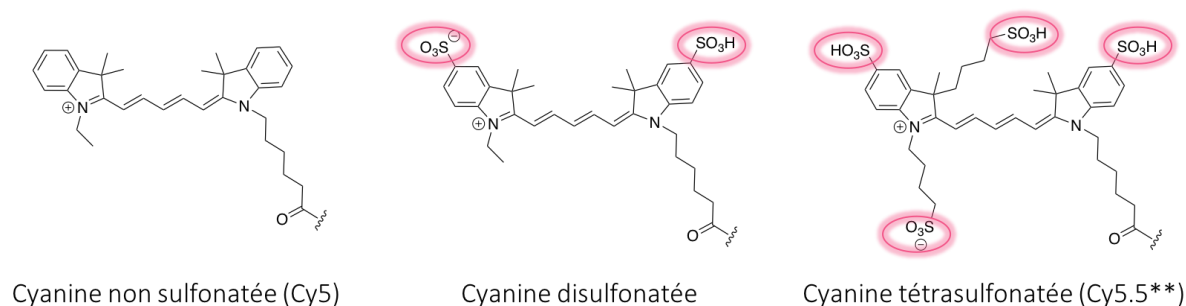


Figure 64. Structures des trois cyanines évaluées.

### II.1.4. Choix de l'espaceur

De nombreuses équipes ont mis en évidence l'influence que peut avoir un espaceur sur les propriétés pharmacocinétiques d'un composé.<sup>188-192</sup> L'espaceur permet de faire le lien entre

le vecteur et les sondes d'imagerie tout en limitant les interférences possibles avec le site de liaison. Il peut aussi modifier le profil de biodistribution et les voies d'élimination de l'agent d'imagerie en jouant sur ses propriétés physico-chimiques. Le type d'espaceur le plus utilisé est le polyéthylène glycol (PEG). En effet, ces espaceurs sont largement disponibles commercialement, flexibles et ils augmentent l'hydrophilie des composés, ce qui favorise l'élimination rénale. Afin d'optimiser les propriétés de nos composés, nous avons choisi d'évaluer des espaceurs de différentes tailles : aucun espaceur, un analogue du PEG<sub>2</sub> (acide 8-amino-3,6-dioxaoctanoïque, AEEAc) et un PEG<sub>4</sub> (Figure 65). Ces espaceurs ont été introduits entre le peptide et la lysine servant de plateforme pour les sondes d'imagerie.

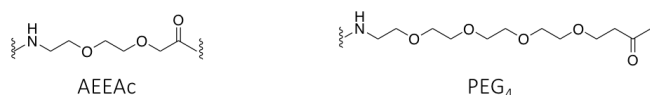


Figure 65. Structures des espaceurs évalués.

## II.2. Synthèse et caractérisation

### II.2.1. Synthèse des ligands

Le composé DOTA-NT-20.3 présentant de très bonnes propriétés pharmacocinétiques, nous l'avons choisi comme composé de référence pour cette étude. Sa synthèse est présentée dans la partie expérimentale.

Les différents composés bimodaux ont été obtenus en trois étapes (Figure 66).

La première étape consiste en l'élongation du peptide en utilisant une méthode automatisée de synthèse de peptides en phase solide (SPPS).<sup>193</sup> Celle-ci repose sur l'emploi d'une résine sur laquelle les acides aminés vont être introduits successivement en alternant les étapes de couplage et de déprotection. Cette technique permet l'amélioration des rendements, la diminution des temps de réaction et la simplification des étapes de purification. Pour cette synthèse, nous avons utilisé une résine pré-chargée, Fmoc-Leu-Wang, et des acides aminés protégés de façon orthogonale. Les amines  $\alpha$  sont protégées par des groupements fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc), éliminables en présence d'une amine secondaire, tandis que les fonctions des chaînes latérales sont protégées par des groupements *tert*-butyle (*t*Bu), *tert*-butoxycarbonyle (Boc), 4-méthoxy-2,3,6-triméthylphénylesulfonyle (Mtr) ou 2,2,4,6,7-pentaméthyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyle (Pbf), qui peuvent être éliminés en conditions acides.<sup>194</sup>

De cette façon, grâce au synthétiseur automatique de peptide Liberty Blue (CEM), nous avons pu introduire les différents acides aminés et espaceurs et préparer les trois peptides **1a**, **1b** et **1c**. Les étapes de déprotection ont été réalisées en utilisant une solution de pipéridine à 20% dans le *N,N*-diméthylformamide (DMF) et les étapes de couplage en utilisant les agents de

couplage *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC) et OxymaPure. L'élongation du peptide sur la résine se termine par une étape de déprotection de l'amine en position N-terminale (Figure 66).

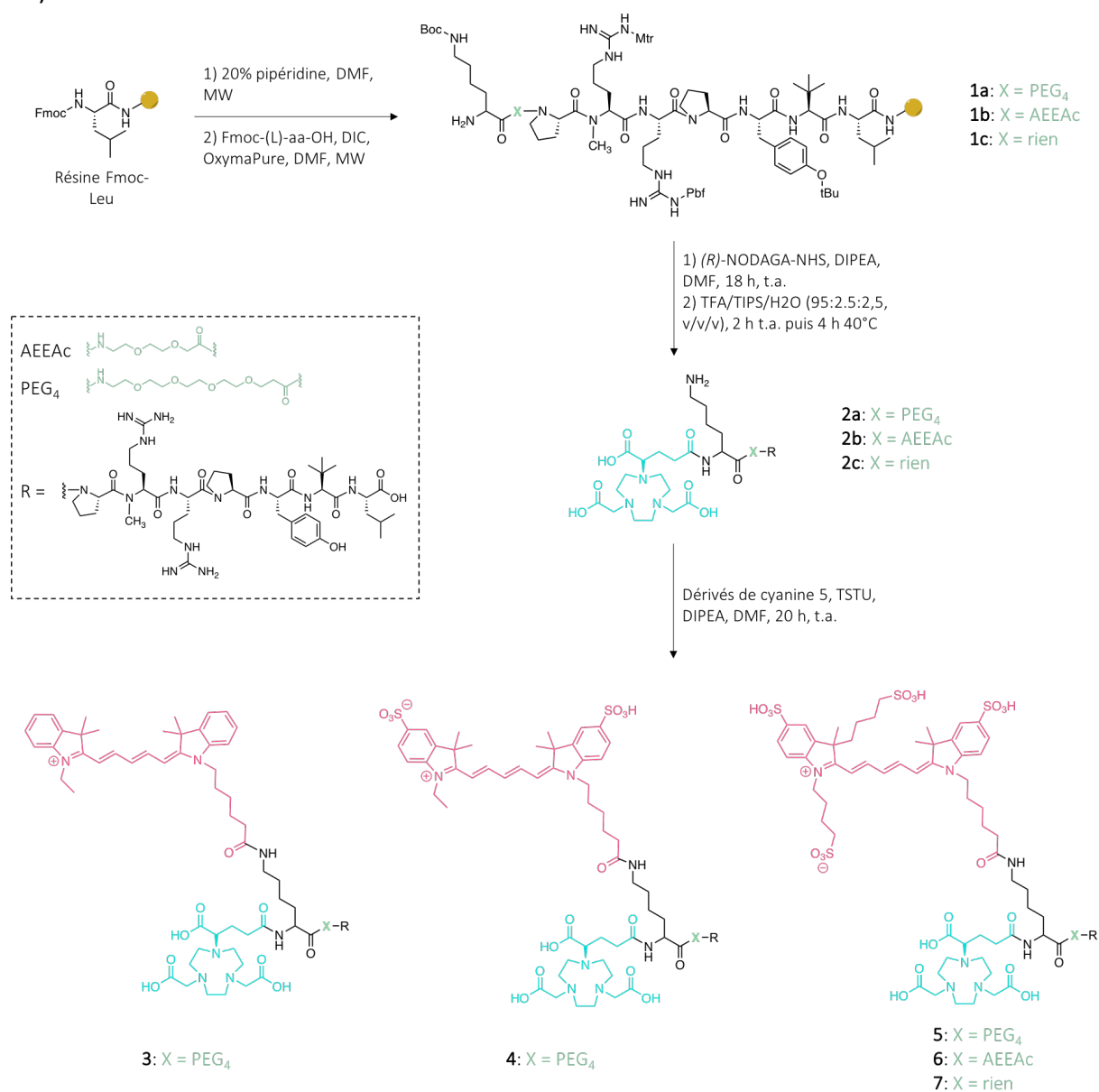


Figure 66. Schéma de synthèse des agents bimodaux ciblant les NTS<sub>1</sub>.

La deuxième étape consiste à introduire le NODAGA sur cette amine libre. Pour cela, nous avons fait réagir les peptides avec le (*R*)-NODAGA-NHS (provenant de la société CheMatech) en présence de *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) dans le DMF. Ensuite, afin de cliver les peptides de la résine et déprotéger les chaînes latérales, un traitement à l'acide trifluoroacétique 95% (TFA) (TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O, 95/2.5/2.5, v/v/v) a été effectué, suivi d'une étape de purification par HPLC en phase inverse. Celle-ci a permis d'obtenir les composés **2a**, **2b** et **2c** avec des rendements compris entre 43 et 69% (Figure 66).

Enfin, la dernière étape consiste à introduire le fluorophore sur l'amine  $\epsilon$  de la lysine en position N-terminale. Pour cela, les cyanines ont été activées grâce au TSTU en présence de DIPEA dans le DMF, puis couplées aux peptides. Les composés ont ensuite été purifiés par chromatographie semi-préparative (Figure 66). Cinq peptides différents **3**, **4**, **5**, **6** et **7** ont pu être obtenus avec des rendements globaux compris entre 10 et 33% (Figure 67).

- 3 : NODAGA-Lys(Cy5)-PEG<sub>4</sub>-NT-20.3
- 4 : NODAGA-Lys(Cy5-disulfonatée)-PEG<sub>4</sub>-NT-20.3
- 5 : NODAGA-Lys(Cy5-tétrasulfonatée)-PEG<sub>4</sub>-NT-20.3
- 6 : NODAGA-Lys(Cy5-tétrasulfonatée)-AEEAc-NT-20.3
- 7 : NODAGA-Lys(Cy5-tétrasulfonatée)-NT-20.3

Figure 67. Nomenclature des cinq agents bimodaux synthésés.

## II.2.2. Propriétés spectrales

Les propriétés photophysiques des composés ont ensuite été évaluées. Les spectres d'absorbance UV-visible et de fluorescence ont été enregistrés à 25 °C dans un tampon phosphate 0.01 M à pH 7.4 (Figure 68).

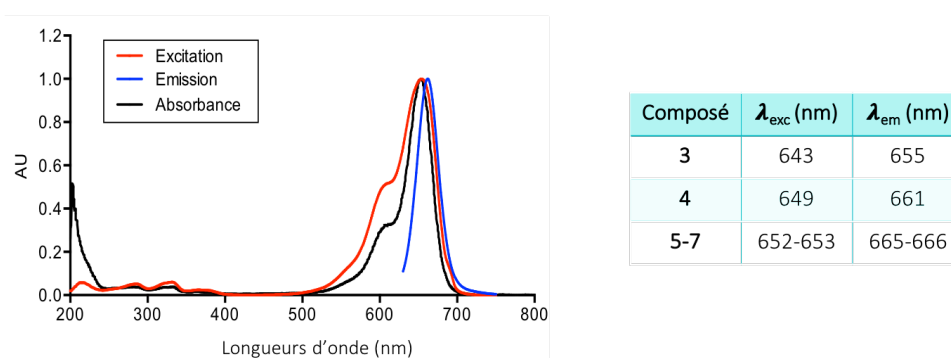


Figure 68. Spectres photophysiques normalisés (absorbance, excitation et émission) du composé **6** et tableau résumant les différents  $\lambda_{Exc,max}$  et  $\lambda_{Em,max}$  des cinq composés bimodaux.

Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont situées autour de 650 nm, avec des déplacements de Stokes d'environ 12 nm. Aucune agrégation n'a été observée dans la solution tampon utilisée.

## II.3. Évaluation *in vitro*

### II.3.1. Métallation au <sup>nat</sup>Ga et évaluation de la stabilité

Les cinq composés bimodaux ont ensuite été marqués au gallium en utilisant du nitrate de gallium, Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, dans une solution de tampon acétate 0.1 M (pH 3.48) à 40 °C. Les produits

ont ensuite été purifiés par chromatographie semi-préparative afin d'obtenir les produits purs métallés, avec des rendements compris entre 59 et 84% (Figure 69).

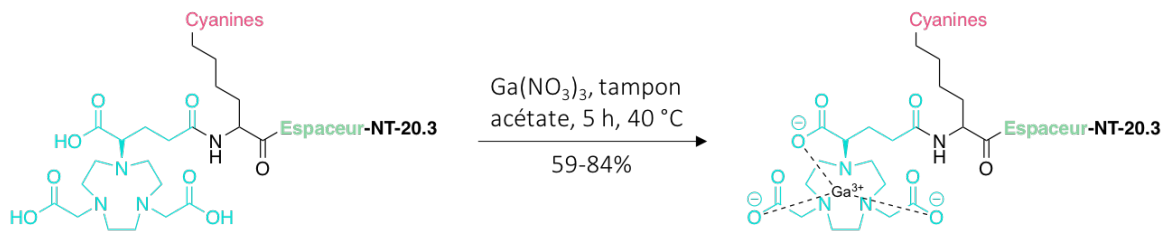


Figure 69. Métallation des cinq agents bimodaux avec du  $^{\text{nat}}\text{Ga}$ .

La stabilité face à la dégradation enzymatique a ensuite été évaluée dans du sérum de souris à 37 °C. Des prélèvements ont été effectués à 0 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h et 24 h et analysés par RP-HPLC-MS. Aucune dégradation n'a été observée pour les cinq peptides après 24 h tandis que seulement la moitié de la neurotensine était intacte après 5 h d'incubation (Figure 70).

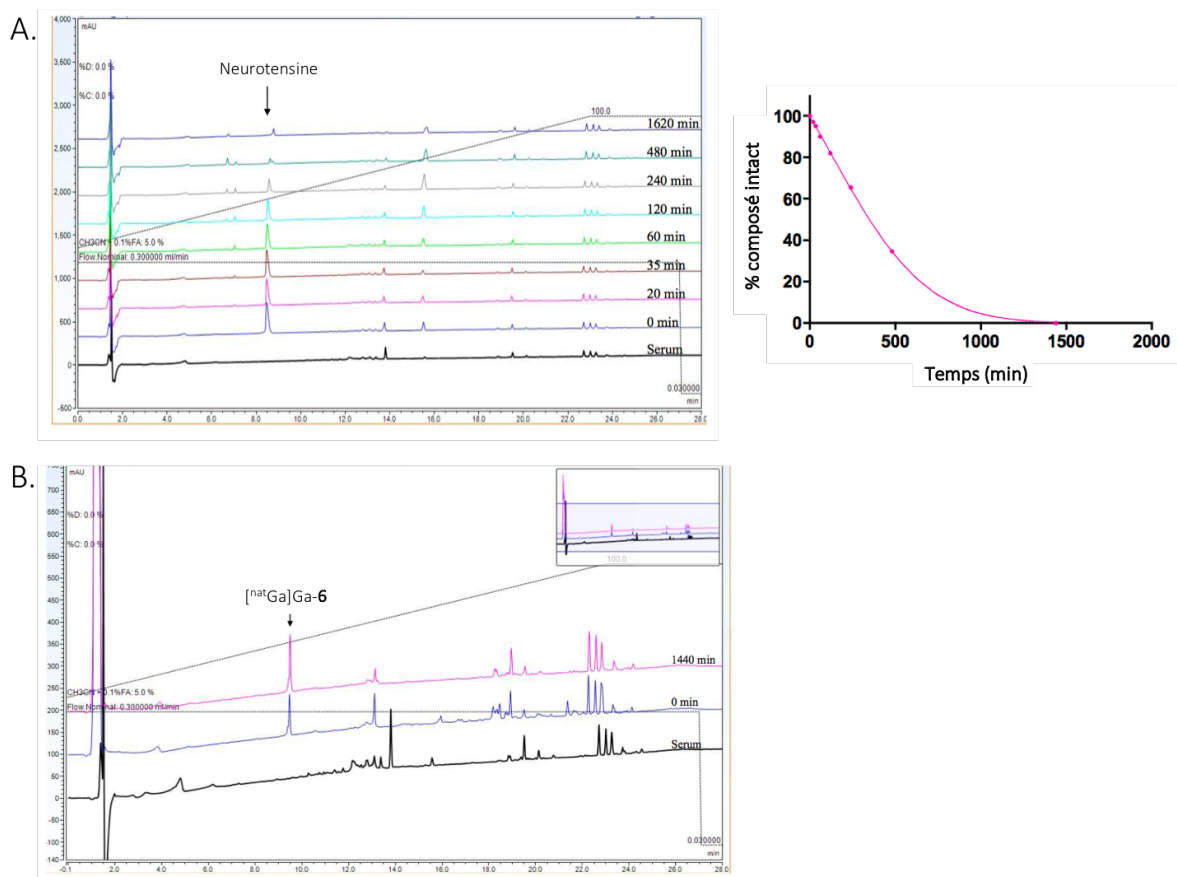


Figure 70. A. Chromatogrammes HPLC (214 nm) de la neurotensine à différents temps d'incubation (gauche) et quantité de neurotensine intacte en fonction du temps (droite) ; B. Chromatogrammes HPLC (214 nm) du composé  $[\text{natGa}]\text{Ga-6}$  à différents temps d'incubation.

### II.3.2. Détermination des constantes d'inhibition ( $K_i$ )

Les affinités des cinq composés marqués au  $^{nat}\text{Ga}$  et de notre référence [ $^{nat}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-NT-20.3 pour  $\text{NTS}_1$  ont été estimées au moyen d'un test de compétition, réalisé sur des cellules ovariennes de hamster (CHO) surexprimant les récepteurs  $\text{NTS}_1$  (tests effectués *via* une prestation de service par la société Eurofins).<sup>57</sup> Pour cela, le radioligand [ $^{125}\text{I}$ ]I-Tyr<sup>3</sup>-neurotensine a été utilisé. Ce composé présente un  $K_d$  de 0.22 nM. Tous les composés ont montré une affinité de l'ordre du nanomolaire, comparable à celle du peptide [ $^{nat}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-NT-20.3 ( $K_i = 10.0$  nM) (Tableau 4).

Des différences ont tout de même été observées entre les différents composés. En effet, on remarque que la nature de la sonde fluorescente impacte nettement l'affinité. L'absence de groupement sulfonate est associée à une amélioration de l'affinité ( $K_i = 0.76$  nM pour le composé non sulfonaté [ $^{nat}\text{Ga}$ ]Ga-3 par rapport à  $K_i = 6.02$  nM pour le composé tétrasulfonaté [ $^{nat}\text{Ga}$ ]Ga-5). Cela peut s'expliquer par l'établissement d'interactions hydrophobes non spécifiques entre le fluorophore et les  $\text{NTS}_1$ .

En revanche, il est difficile de corréliser la taille de l'espaceur et l'affinité pour les récepteurs. En effet, le composé comportant l'espaceur AEEAc ([ $^{nat}\text{Ga}$ ]Ga-6,  $K_i = 12.1$  nM) présente une affinité deux fois moins bonne que les composés sans espaceur ([ $^{nat}\text{Ga}$ ]Ga-7,  $K_i = 5.52$  nM) ou avec un PEG<sub>4</sub> ([ $^{nat}\text{Ga}$ ]Ga-5,  $K_i = 6.02$  nM).

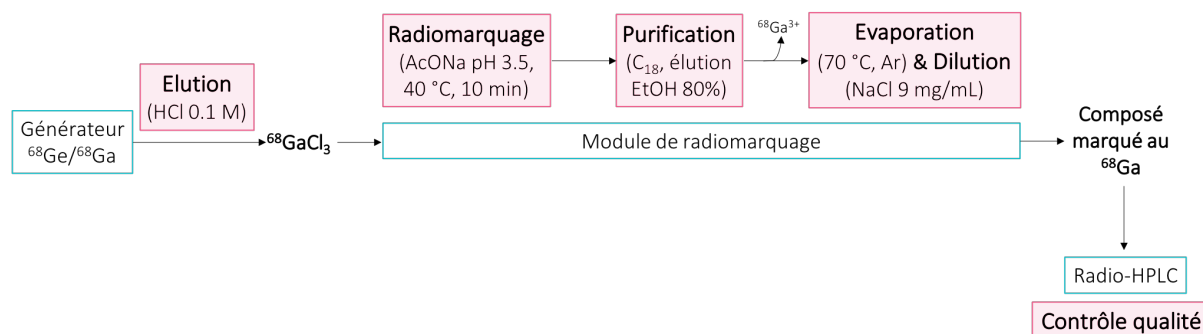
**Tableau 4.** Résumé des constantes d'inhibition des composés pour les  $\text{NTS}_1$ .

	[ $^{nat}\text{Ga}$ ]Ga-3	[ $^{nat}\text{Ga}$ ]Ga-4	[ $^{nat}\text{Ga}$ ]Ga-5	[ $^{nat}\text{Ga}$ ]Ga-6	[ $^{nat}\text{Ga}$ ]Ga-7	[ $^{nat}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-NT-20.3
$K_i$ (nM)	0.76 [0.66 – 0.88]	3.81 [2.9 – 5.0]	6.02 [4.9 – 7.4]	12.1 [10.3 – 14.2]	5.52 [4.8 – 6.4]	10.0 [6.51 – 15.4]

Les valeurs sont données en « moyenne [intervalle de confiance à 95%] ».

### II.3.3. Radiomarquage

Présentant de bons résultats *in vitro*, les cinq composés ont été marqués au gallium-68. Le radiomarquage a été réalisé par le Dr. Aurélie Prignon (Figure 71).



**Figure 71.** Représentation du processus de radiomarquage au gallium-68.

Tout d'abord, le générateur  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  est élué par une méthode de fractionnement grâce à une solution de HCl 0.1 M afin de récupérer un volume constant et précis de sel de gallium-68. Celui-ci est ensuite dirigé vers le module de radiomarquage où il est ajouté au composé à radiomarquer et tamponné avec une solution d'acétate de sodium (AcONa) à pH 3.5. En effet, le pH est très important pour le radiomarquage au gallium. Le gallium (III) est stable en solution aqueuse seulement à pH acide, aux alentours de 3.5. Au-dessus de ce pH, le gallium est hydrolysé et forme des colloïdes insolubles, trihydroxides de gallium ( $\text{Ga}(\text{OH})_3$ ), ce qui réduit les performances de radiomarquage. À des pH trop faibles, les taux d'incorporation et les rendements de radiomarquage sont médiocres.<sup>195</sup>

Le NODAGA étant un bon agent chélatant pour le gallium, le marquage se fait en 10 min à 40 °C. Ensuite, afin d'éliminer l'excès de  $^{68}\text{Ga}$  libre, la solution est éluee sur une colonne C<sub>18</sub>. Le composé va rester accroché sur la colonne tandis que le gallium libre sera éliminé, puis une élution à l'éthanol permettra de récupérer le composé radiomarqué. Afin de pouvoir injecter le produit aux souris, l'éthanol est évaporé et le composé est dilué dans une solution physiologique (NaCl 9 mg/mL). Enfin, la dernière étape consiste à évaluer la pureté du composé par HPLC couplée à un détecteur de radioactivité. L'utilisation d'un automate de radiomarquage permet de diminuer l'exposition aux rayonnements, d'avoir une meilleure reproductibilité, et elle rend possible la transposition vers des protocoles répondant aux réglementations de bonnes pratiques de fabrication (GMP).<sup>196,197</sup> Le radiomarquage, le contrôle qualité et l'injection aux souris sont effectués en moins d'une heure.

L'efficacité du radiomarquage est évaluée par deux paramètres. Le premier est le rendement de radiomarquage, c'est-à-dire le rapport de l'activité du produit marqué sur l'activité totale initialement introduite. Le deuxième paramètre est l'activité molaire (en Bq/mol) ou activité spécifique (en Bq/g), signifiant la proportion de composé radiomarqué par rapport au composé non radiomarqué, déterminée en mesurant l'activité par unité de mole ou de masse.

De cette façon, les cinq composés ont pu être marqués avec des rendements radiochimiques compris entre 51 et 90%, des activités molaires de 3.5 à 10.7 MBq/nmol et des puretés radiochimiques supérieures à 99% (Tableau 5).

**Tableau 5.** Résumé des rendements radiochimiques, activités molaires et puretés radiochimiques.

Composé	Rendement radiochimique	Activité molaire (MBq/nmol)	Pureté radiochimique
3 (n = 2)	69% ± 4	3.5 ± 1.3	> 99%
4 (n = 2)	51% ± 46	5.1 ± 5.1	> 99%
5 (n = 4)	84% ± 16	10.7 ± 4.3	> 99%
6 (n = 4)	90% ± 3	7.4 ± 0.2	> 99%
7 (n = 3)	69% ± 30	7.2 ± 2.2	> 99%

### II.3.4. Mesure du caractère hydrophile (LogD)

L'hydrophilie des composés radiomarqués a été déterminée en mesurant les coefficients de partage (logD), en utilisant la méthode « *shake-flask* » dans un milieu octanol/PBS à pH 7.4.<sup>198</sup> Comme nous l'avons prévu, tous les composés se sont avérés hydrophiles (logD négatif) et des différences importantes ont pu être observées entre les composés (Tableau 6). En effet, les molécules comportant la cyanine tétrasulfonagée ([<sup>68</sup>Ga]Ga-5, [<sup>68</sup>Ga]Ga-6 et [<sup>68</sup>Ga]Ga-7) ont un logD quasi-identique, malgré la différence d'espaceur (logD = -2.6), et présentent des différences significatives avec le composé portant la cyanine disulfonagée ([<sup>68</sup>Ga]Ga-4) (logD = -2.3) et la cyanine non sulfonagée [<sup>68</sup>Ga]Ga-3) (log D = -0.7). Ces résultats indiquent que le caractère hydrophile des molécules dépend, dans notre cas, du nombre de groupes sulfonates présents sur la cyanine et non de l'espaceur.

**Tableau 6.** Résumé des coefficients de partage (logD).

	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-3	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-4	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-5	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-6	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-7	[ <sup>68</sup> Ga]Ga- DOTA-NT-20.3
LogD	-0.70 ± 0.25	-2.29 ± 0.06	-2.73 ± 0.13	-2.51 ± 0.16	-2.63 ± 0.10	-2.50 ± 0.31

\*\*

\*

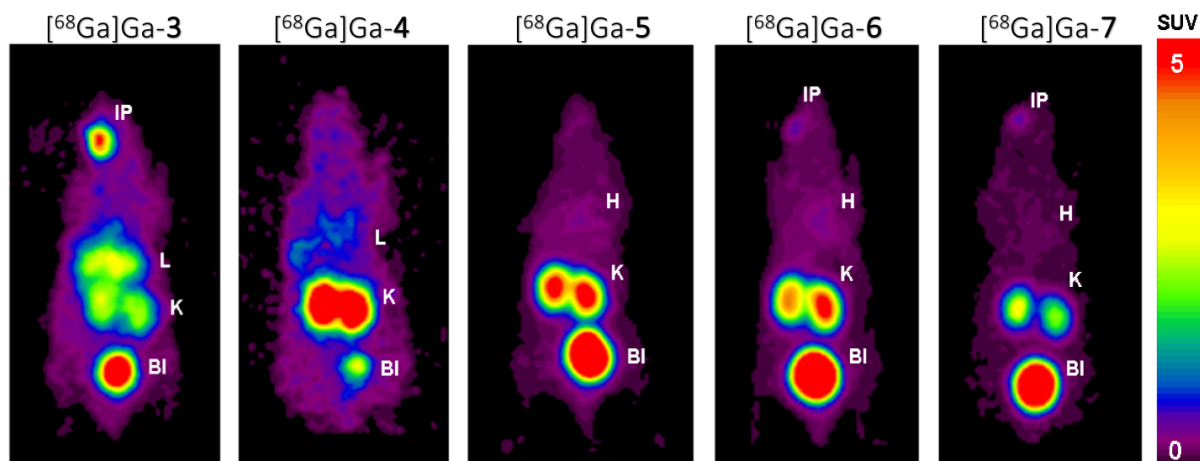
Test de Student \* < 0.05  
\*\* < 0.01

## II.4. Évaluation *in vivo* par imagerie TEP

### II.4.1. Évaluation des propriétés pharmacocinétiques sur souris saines

Afin d'évaluer les propriétés pharmacocinétiques des cinq agents bimodaux, chaque composé radiomarqué a été injecté ( $473 \pm 151$  pmol,  $3.49 \pm 2.71$  MBq) à une souris *nude* saine ( $n = 1$  par composé). Des images dynamiques TEP ont ensuite été enregistrées durant les 70 min suivant l'injection. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 72, les composés [<sup>68</sup>Ga]Ga-5, [<sup>68</sup>Ga]Ga-6 et [<sup>68</sup>Ga]Ga-7, possédant les quatre groupements sulfonates sur la cyanine, présentent un profil classique d'excrétion urinaire avec la majorité du signal au niveau des reins et de la vessie. En revanche, du signal dans le cœur et le foie est également observé pour le composé [<sup>68</sup>Ga]Ga-4 disulfonaté. Cela suggère un temps de circulation supérieur. Enfin, le composé le moins hydrophile, [<sup>68</sup>Ga]Ga-3 non sulfonaté, montre une accumulation importante au niveau du foie signifiant que la clairance se fait en partie par la voie hépatique. Ces résultats indiquent que la présence des quatre groupements sulfonates sur la cyanine est nécessaire pour avoir un bon profil de biodistribution avec une élimination par voie rénale. La taille de l'espaceur ne semble pas, quant à elle, influencer les propriétés pharmacocinétiques des composés.

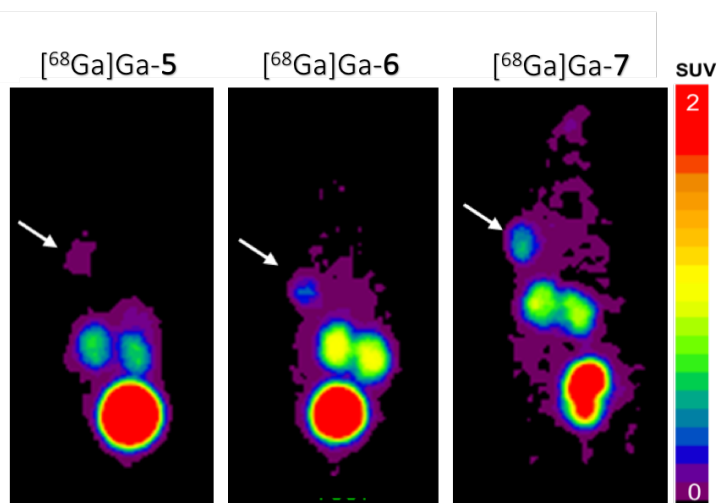




**Figure 72.** Projections du signal obtenu en 10 min d'acquisition, entre 57 et 67 min p.i., durant l'imagerie dynamique TEP après l'injection des composés  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-3}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-4}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-5}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-6}$  et  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-7}$  à des souris nues saines. IP : point d'injection, H : cœur, L : foie, K : reins, BI : vessie.

#### II.4.2. Évaluation de la biodistribution sur souris xéno greffées

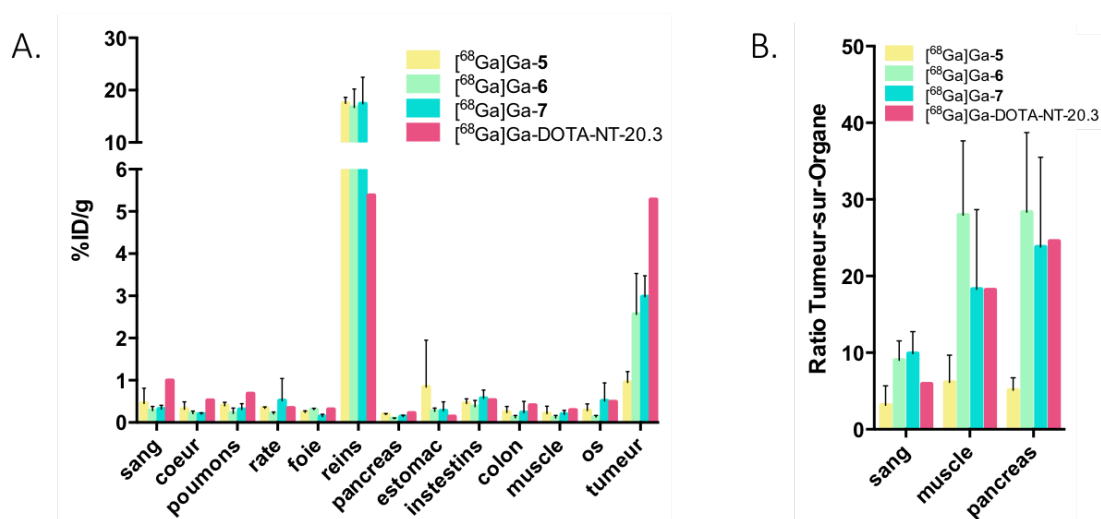
Au vu de ces premiers résultats, nous avons choisi de continuer les expérimentations seulement avec les composés tétrasulfonates ( $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-5}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-6}$  et  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-7}$ ). Ces trois composés ont donc été évalués sur un modèle d'adénocarcinome pancréatique humain (AsPC-1). Pour cela, les composés marqués ont été injectés ( $553 \pm 145$  pmol,  $3.17 \pm 0.92$  MBq) à des souris *nudes* portant une xéno greffe de cellules AsPC-1 sur le flanc. Des images statiques TEP ont été enregistrées 40 min après l'injection et durant 15 min ( $n = 3$ ). Comme nous pouvons le voir sur la Figure 73, les tumeurs sont visibles pour les trois composés avec de bons contrastes tumeur/bruit-de-fond. Cependant, le composé  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-5}$  présente une accumulation tumorale moins élevée.



**Figure 73.** Images TEP obtenues après 15 min d'acquisition entre 40 et 55 min p.i. pour les composés  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-5}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-6}$  et  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-7}$  dans des souris portant une xéno greffe AsPC-1. Les tumeurs sont désignées avec des flèches blanches.

Afin de confirmer ces résultats, l'étude de la biodistribution *ex vivo* a été effectuée ( $n = 3$ ). Pour cela, à 1 h post-injection, les souris ont été euthanasiées, les organes ont été récoltés, pesés et la radioactivité a été comptée. Comme le montre la Figure 74A, les profils de biodistribution sont très propres, avec du signal majoritairement dans la tumeur et les reins. Le signal dans les reins est d'environ 17.5%ID/g pour les trois composés. En revanche, en accord avec les images TEP, le signal dans la tumeur est le plus faible pour le composé  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-5}$  ( $0.95 \pm 0.26\% \text{ID/g}$ ) comparé aux composés  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-6}$  et  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-7}$  ( $2.56 \pm 0.97\% \text{ID/g}$  et  $2.98 \pm 0.50\% \text{ID/g}$ , respectivement). Les composés  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-6}$  et  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-7}$  présentent un profil de biodistribution similaire au composé de référence DOTA-NT-20.3 avec un peu moins de signal dans la tumeur ( $\sim 2.8\% \text{ID/g}$  pour les bimodaux contre  $5.93 \pm 1.82\% \text{ID/g}$  pour le  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO} \text{TA-NT-20.3}$ ) et un peu plus de signal dans les reins ( $\sim 17.5\% \text{ID/g}$  contre  $5.38 \pm 0.54\% \text{ID/g}$  pour le  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO} \text{TA-NT-20.3}$ ).

La Figure 74B montre les ratios tumeur/organe. Le composé  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-5}$  présentant une moins bonne accumulation tumorale donne des ratios moins bons que les deux autres composés. En revanche, les ratios tumeur/organe pour les composés  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-6}$  et  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-7}$  sont très élevés et similaires, voire meilleurs, à ceux observés pour le composé  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO} \text{TA-NT-20.3}$ , malgré l'introduction de sondes fluorescentes.



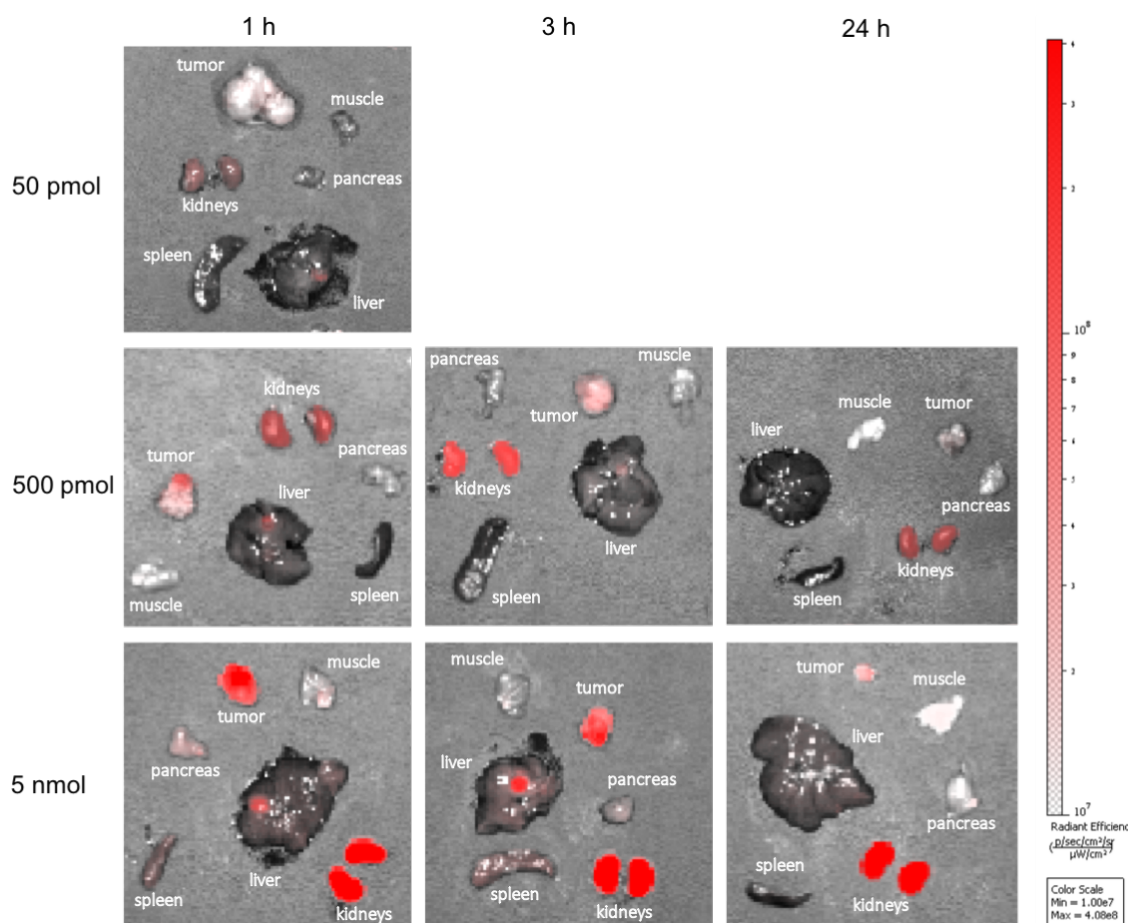
**Figure 74.** A. Biodistribution *ex vivo* 1 h p.i. des composés  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-5}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-6}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-7}$  ( $n = 3$ ) et  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO} \text{TA-NT-20.3}$  ( $n = 4$ ). Les valeurs sont exprimées en pourcentage de dose injectée par gramme (%ID/g, moyenne  $\pm$  SD) pour chaque organe collecté. B. Ratios tumeur/organe provenant de la biodistribution *ex vivo*. Valeurs exprimées en moyenne  $\pm$  SD.

Nous n'avons à ce jour aucune explication pour justifier la différence de comportement *in vivo* du composé avec l'espaceur PEG<sub>4</sub> (5) par rapport aux composés 6 et 7 (avec AEEAc et sans espaceur).

Le composé  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-6}$  semble montrer des ratios légèrement meilleurs que le composé  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-7}$ , c'est pourquoi nous avons choisi ce composé pour la suite de l'étude.

## II.5. Évaluation des propriétés de fluorescence

Afin d'évaluer la dose injectée et le temps d'imagerie optimaux pour l'imagerie de fluorescence, nous avons administré des quantités croissantes (50 pmol, 500 pmol et 5 nmol) du composé **6** à des souris xénotreffées et enregistré des images de fluorescence à 1 h, 3 h et 24 h après l'injection. À chaque temps, les souris ont été euthanasiées, les organes ont été collectés et l'accumulation dans les organes a été quantifiée par fluorescence à 680 nm (Figure 75).

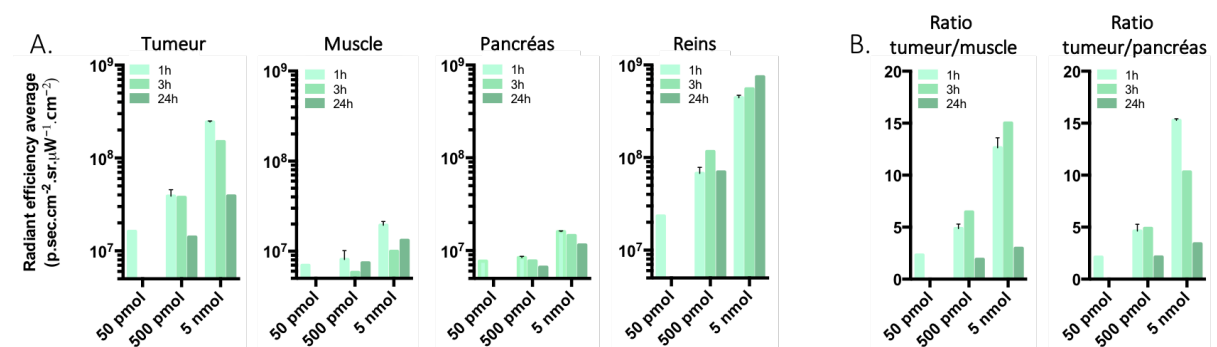


**Figure 75.** Superposition d'images en lumière blanche et en fluorescence des organes isolés après l'injection de 50 pmol, 500 pmol et 5 nmol du composé **6** à 1 h, 3 h et 24 h p.i. Le signal était trop faible à 3 h et 24 h après l'injection de 50 pmol.

En accord avec l'imagerie TEP, le signal est principalement retrouvé au niveau de la tumeur et des reins. On remarque qu'un léger signal de fluorescence est présent au niveau des organes digestifs. Ceci s'explique par la fluorescence provenant de la nourriture donnée aux souris.

La Figure 76A montre un bilan de la quantification du signal de fluorescence par organe en fonction de la dose injectée et du temps d'imagerie. On remarque que le signal dans la tumeur augmente avec la quantité injectée tandis que pour les organes tels que le muscle ou le pancréas il reste sensiblement identique. En revanche, le signal dans la tumeur décroît

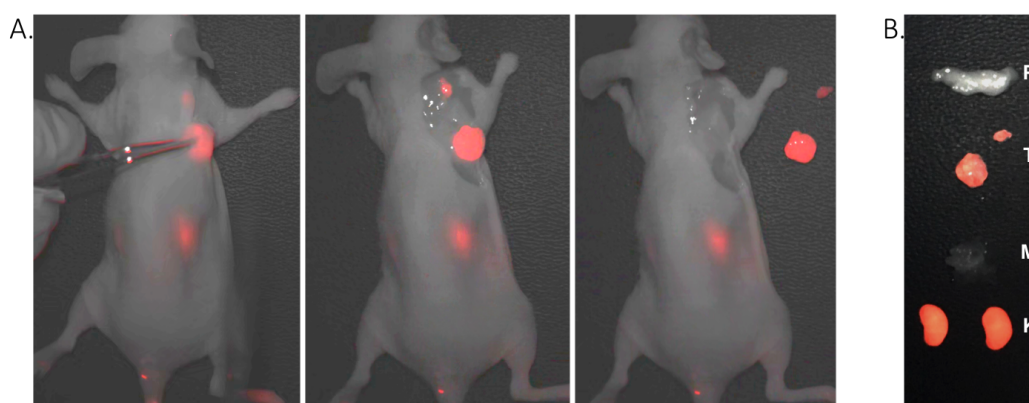
rapidement avec le temps. Ceci conduit à de bons ratios tumeur/organe pour les doses élevées à des temps assez courts (Figure 76B).



**Figure 76.** A. Biodistribution *ex vivo* du composé **6** (50 pmol, 500 pmol et 5 nmol) à 1 h, 3 h et 24 h p.i. déterminée par fluorescence. Les valeurs sont exprimées en efficacité radiante moyenne. B. Ratios tumeur/organe provenant de la biodistribution *ex vivo*. Valeurs exprimées en moyenne  $\pm$  SD.

Au vu de ces résultats, il semble préférable de réaliser la chirurgie assistée par fluorescence dans les quelques heures suivant l'injection du composé et en injectant des quantités assez élevées.

Afin d'obtenir les meilleurs résultats possibles sans risquer une toxicité due à l'injection d'une quantité trop importante de produit, nous avons réalisé une preuve de concept de chirurgie assistée par fluorescence 3.5 h après l'injection de 500 pmol du composé **6** (Figure 77). Celle-ci a permis la résection de tumeurs de petite taille en montrant d'excellents contrastes entre les tissus sains et tissus cancéreux.



**Figure 77.** A. Illustration de la chirurgie assistée par fluorescence d'une souris portant une xénogreffe AsPC-1 à 3.5 h après l'injection du composé **6** (500 pmol). B. Imagerie de fluorescence des organes isolés (P : pancréas, T : tumeur, M : muscle, K : reins).

### III. Conclusion et perspectives

Pour conclure, nous avons synthétisé cinq agents d'imagerie bimodaux, analogues de la neurotensine, présentant des espaceurs et des sondes fluorescentes différents. Ces composés ont montré une meilleure stabilité métabolique que la neurotensine et de bonnes affinités pour les récepteurs NTS<sub>1</sub> (de l'ordre du nanomolaire), comparables au composé de référence DOTA-NT-20.3. Les cinq composés ont été radiomarqués avec de bons rendements et puretés radiochimiques ainsi que de bonnes activités molaires. L'évaluation des propriétés pharmacocinétiques par imagerie TEP sur souris saines a permis d'identifier trois composés (<sup>68</sup>Ga]Ga-5, <sup>68</sup>Ga]Ga-6 et <sup>68</sup>Ga]Ga-7), contenant la cyanine tétrasulfonagée, comme ayant une clairance rapide et montrant une élimination par voie rénale. L'étude de ces composés sur souris porteuses d'une xénogreffe de tumeur du pancréas humaine (AsPC-1) a permis de montrer une bonne accumulation tumorale et un profil de biodistribution très propre pour les composés <sup>68</sup>Ga]Ga-6 et <sup>68</sup>Ga]Ga-7, conduisant à de très bons ratios tumeur/organe 1 h après l'injection. En effet, malgré l'introduction d'une sonde fluorescente, l'affinité pour les récepteurs NTS<sub>1</sub> a été conservée et les ratios étaient similaires au composé de référence. Enfin, ces composés ont montré de meilleurs résultats que ceux obtenus par l'équipe de Deng, avec beaucoup moins de signal au niveau du foie.<sup>165</sup>

Le composé <sup>68</sup>Ga]Ga-6, semblant montrer les meilleurs résultats, a ensuite été évalué par imagerie optique. Une bonne corrélation a été observée entre l'imagerie TEP et l'imagerie de fluorescence, montrant une excellente accumulation tumorale et une excrétion rénale du composé bimodal. L'imagerie optique a permis la résection de la tumeur grâce à l'acquisition en temps réel de la fluorescence, en discriminant avec un bon contraste les tissus cancéreux des tissus sains.

Cette étude montre à nouveau que de nombreux paramètres tels que l'agent chélatant, le fluorophore ou encore l'espaceur peuvent impacter significativement les propriétés pharmacocinétiques d'une molécule. L'évaluation de différents espaceurs et sondes fluorescentes a permis d'identifier le composé <sup>68</sup>Ga]Ga-6 comme un agent d'imagerie potentiel pour le diagnostic et la chirurgie assistée par fluorescence du cancer du pancréas.

Le développement de composés portant directement les deux modalités est intéressant pour faciliter la transposition clinique. Il est en effet plus simple de faire approuver un seul composé par les autorités que deux différents. En clinique, l'imagerie TEP permettrait la détection efficace de tumeurs et métastases du PDAC, la stadification et la planification de la stratégie thérapeutique à adopter. Ensuite, si la chirurgie est possible, la stratégie envisageable consiste à injecter le composé radiomarqué, réaliser une image TEP un jour ou deux avant la chirurgie afin de vérifier que le diagnostic posé est toujours le même (apparition de nouvelles métastases, évolution de la tumeur...) puis injecter le composé non marqué ou marqué au <sup>nat</sup>Ga le jour de la chirurgie pour ensuite procéder à la chirurgie en utilisant la fluorescence

pour faciliter et améliorer la résection tumorale afin d'augmenter les chances de survie du patient.

Une expérience préliminaire sur un modèle orthotopique de greffe AsPC-1 a été réalisée afin d'évaluer le composé sur un modèle plus représentatif de la réalité. Toutefois, la difficulté de mise en œuvre n'a pas permis l'obtention de résultats interprétables. Une nouvelle expérience est actuellement en cours.

Dans des travaux futurs, il serait intéressant de tenter de réduire l'accumulation du composé dans les reins pour limiter la toxicité. En effet, malgré l'injection de quantités relativement faibles de composé, il a été montré que les composés radiomarqués peuvent induire une certaine toxicité rénale. La plupart des composés sont éliminés par les reins puis réabsorbés et retenus dans les tubules. En jouant sur la taille, la charge ou la structure des molécules, il est possible d'altérer la réabsorption tubulaire. Il est aussi possible de bloquer les récepteurs présents dans les reins et responsables de la réabsorption par des co-injections d'acides aminés basiques tels que la lysine ou l'arginine ou d'autres composés.<sup>199</sup>

Ce composé bimodal pourrait aussi être évalué sur d'autres modèles de tumeurs surexprimant les récepteurs NTS<sub>1</sub> (cancer colorectal, cancer de la prostate, cancer du sein...).

Enfin, il serait intéressant de transposer cette stratégie de bimodalité à des composés non peptidiques antagonistes des récepteurs NTS<sub>1</sub>. En effet, ceux-ci montrent de bonnes propriétés pharmacocinétiques.<sup>200</sup>



## Références

- (1) Bardeesy, N.; DePinho, R. A. Pancreatic Cancer Biology and Genetics. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2* (12), 897–909. <https://doi.org/10.1038/nrc949>.
- (2) Cancer of the Pancreas - Cancer Stat Facts <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html> (accessed Apr 13, 2020).
- (3) Carrato, A.; Falcone, A.; Ducreux, M.; Valle, J. W.; Parnaby, A.; Djazouli, K.; Alnwick-Allu, K.; Hutchings, A.; Palaska, C.; Parthenaki, I. A Systematic Review of the Burden of Pancreatic Cancer in Europe: Real-World Impact on Survival, Quality of Life and Costs. *J. Gastrointest. Canc.* **2015**, *46* (3), 201–211. <https://doi.org/10.1007/s12029-015-9724-1>.
- (4) Adamska, A.; Domenichini, A.; Falasca, M. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (7), 1338. <https://doi.org/10.3390/ijms18071338>.
- (5) Rosewicz, S.; Wiedenmann, B. Pancreatic Carcinoma. *Lancet* **1997**, *349* (9050), 485–489. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)05523-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)05523-7).
- (6) Cancer today <http://gco.iarc.fr/today/home> (accessed Apr 14, 2020).
- (7) Ilic, M.; Ilic, I. Epidemiology of Pancreatic Cancer. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22* (44), 9694–9705. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i44.9694>.
- (8) Klein, A. P.; Brune, K. A.; Petersen, G. M.; Goggins, M.; Tersmette, A. C.; Offerhaus, G. J. A.; Griffin, C.; Cameron, J. L.; Yeo, C. J.; Kern, S.; Hruban, R. H. Prospective Risk of Pancreatic Cancer in Familial Pancreatic Cancer Kindreds. *Cancer Res.* **2004**, *64* (7), 2634–2638. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-3823>.
- (9) Li, S.; Tian, B. Acute Pancreatitis in Patients with Pancreatic Cancer: Timing of Surgery and Survival Duration. *Medicine* **2017**, *96* (3), e5908. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000005908>.
- (10) Lennon, A. M.; Wolfgang, C. L.; Canto, M. I.; Klein, A. P.; Herman, J. M.; Goggins, M.; Fishman, E. K.; Kamel, I.; Weiss, M. J.; Diaz, L. A.; Papadopoulos, N.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Hruban, R. H. The Early Detection of Pancreatic Cancer: What Will It Take to Diagnose and Treat Curable Pancreatic Neoplasia? *Cancer Res.* **2014**, *74* (13), 3381–3389. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0734>.
- (11) Rozenblum, E.; Schutte, M.; Goggins, M.; Hahn, S. A.; Panzer, S.; Zahurak, M.; Goodman, S. N.; Sohn, T. A.; Hruban, R. H.; Yeo, C. J.; Kern, S. E. Tumor-Suppressive Pathways in Pancreatic Carcinoma. *Cancer Res.* **1997**, *57* (9), 1731–1734.
- (12) Griffin, C. A.; Hruban, R. H.; Morsberger, L. A.; Ellingham, T.; Long, P. P.; Jaffee, E. M.; Hauda, K. M.; Bohlander, S. K.; Yeo, C. J. Consistent Chromosome Abnormalities in Adenocarcinoma of the Pancreas. *Cancer Res.* **1995**, *55* (11), 2394–2399.
- (13) Mahlamäki, E. H.; Bärlund, M.; Tanner, M.; Gorunova, L.; Höglund, M.; Karhu, R.; Kallioniemi, A. Frequent Amplification of 8q24, 11q, 17q, and 20q-Specific Genes in Pancreatic Cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **2002**, *35* (4), 353–358. <https://doi.org/10.1002/gcc.10122>.
- (14) Ueki, T.; Toyota, M.; Sohn, T.; Yeo, C. J.; Issa, J. P.; Hruban, R. H.; Goggins, M. Hypermethylation of Multiple Genes in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Res.* **2000**, *60* (7), 1835–1839.
- (15) Li, D.; Xie, K.; Wolff, R.; Abbruzzese, J. L. Pancreatic Cancer. *Lancet* **2004**, *363* (9414), 1049–1057. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15841-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15841-8).
- (16) Yachida, S.; Iacobuzio-Donahue, C. A. Evolution and Dynamics of Pancreatic Cancer Progression. *Oncogene* **2013**, *32* (45), 5253–5260. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.29>.
- (17) Vincent, A.; Herman, J.; Schulick, R.; Hruban, R. H.; Goggins, M. Pancreatic Cancer. *Lancet* **2011**, *378* (9791), 607–620. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62307-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62307-0).
- (18) Hermann, P. C.; Huber, S. L.; Herrler, T.; Aicher, A.; Ellwart, J. W.; Guba, M.; Bruns, C. J.; Heeschen, C. Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. *Cell Stem Cell* **2007**, *1* (3), 313–323. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.06.002>.
- (19) Li, C.; Heidt, D. G.; Dalerba, P.; Burant, C. F.; Zhang, L.; Adsay, V.; Wicha, M.; Clarke, M. F.; Simeone, D. M. Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* **2007**, *67* (3), 1030–1037.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2030>.

- (20) Gold, D. V.; Goggins, M.; Modrak, D. E.; Newsome, G.; Liu, M.; Shi, C.; Hruban, R. H.; Goldenberg, D. M. Detection of Early-Stage Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2010**, *19* (11), 2786–2794. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0667>.
- (21) Koopmann, J.; Rosenzweig, C. N. W.; Zhang, Z.; Canto, M. I.; Brown, D. A.; Hunter, M.; Yeo, C.; Chan, D. W.; Breit, S. N.; Goggins, M. Serum Markers in Patients with Resectable Pancreatic Adenocarcinoma: Macrophage Inhibitory Cytokine 1 versus CA19-9. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12* (2), 442–446. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0564>.
- (22) Kim, Y. C.; Kim, H. J.; Park, J. H.; Park, D. I.; Cho, Y. K.; Sohn, C. I.; Jeon, W. K.; Kim, B. I.; Shin, J. H. Can Preoperative CA19-9 and CEA Levels Predict the Resectability of Patients with Pancreatic Adenocarcinoma? *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2009**, *24* (12), 1869–1875. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.05935.x>.
- (23) Ahmed, S. I.; Bochkarev, V.; Oleynikov, D.; Sasson, A. R. Patients with Pancreatic Adenocarcinoma Benefit from Staging Laparoscopy. *J. Laparoendosc. Adv. Surg. Tech. A* **2006**, *16* (5), 458–463. <https://doi.org/10.1089/lap.2006.16.458>.
- (24) Vachiranubhap, B.; Kim, Y. H.; Balci, N. C.; Semelka, R. C. Magnetic Resonance Imaging of Adenocarcinoma of the Pancreas. *Top. Magn. Reson. Imaging* **2009**, *20* (1), 3–9. <https://doi.org/10.1097/RMR.0b013e3181b48392>.
- (25) Lal, A.; Christians, K.; Evans, D. B. Management of Borderline Resectable Pancreatic Cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **2010**, *19* (2), 359–370. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2009.11.006>.
- (26) Callery, M. P.; Chang, K. J.; Fishman, E. K.; Talamonti, M. S.; William Traverso, L.; Linehan, D. C. Pretreatment Assessment of Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer: Expert Consensus Statement. *Ann. Surg. Oncol.* **2009**, *16* (7), 1727–1733. <https://doi.org/10.1245/s10434-009-0408-6>.
- (27) Parsons, C. M.; Sutcliffe, J. L.; Bold, R. J. Preoperative Evaluation of Pancreatic Adenocarcinoma. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* **2008**, *15* (4), 429–435. <https://doi.org/10.1007/s00534-007-1240-7>.
- (28) Wang, X.-Y.; Yang, F.; Jin, C.; Fu, D.-L. Utility of PET/CT in Diagnosis, Staging, Assessment of Resectability and Metabolic Response of Pancreatic Cancer. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20* (42), 15580–15589. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i42.15580>.
- (29) Barber, T. W.; Kalff, V.; Cherk, M. H.; Yap, K. S. K.; Evans, P.; Kelly, M. J. 18 F-FDG PET/CT Influences Management in Patients with Known or Suspected Pancreatic Cancer. *Intern. Med. J.* **2011**, *41* (11), 776–783. <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2010.02257.x>.
- (30) Hidalgo, M.; Cascinu, S.; Kleeff, J.; Labianca, R.; Löhner, J.-M.; Neoptolemos, J.; Real, F. X.; Van Laethem, J.-L.; Heinemann, V. Addressing the Challenges of Pancreatic Cancer: Future Directions for Improving Outcomes. *Pancreatology* **2015**, *15* (1), 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2014.10.001>.
- (31) Hishinuma, S.; Ogata, Y.; Tomikawa, M.; Ozawa, I.; Hirabayashi, K.; Igarashi, S. Patterns of Recurrence after Curative Resection of Pancreatic Cancer, Based on Autopsy Findings. *J. Gastrointest. Surg.* **2006**, *10* (4), 511–518. <https://doi.org/10.1016/j.gassur.2005.09.016>.
- (32) Torre, M. L.; Nigri, G.; Conte, A. I.; Mazza, F.; Tierno, S. M.; Salaj, A.; Marchetti, P.; Ziparo, V.; Ramacciato, G. Is a Preoperative Assessment of the Early Recurrence of Pancreatic Cancer Possible after Complete Surgical Resection? *Gut Liver* **2014**, *8* (1), 102–108. <https://doi.org/10.5009/gnl.2014.8.1.102>.
- (33) Huguet, F.; Girard, N.; Guerche, C. S.-E.; Hennequin, C.; Mornex, F.; Azria, D. Chemoradiotherapy in the Management of Locally Advanced Pancreatic Carcinoma: A Qualitative Systematic Review. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27* (13), 2269–2277. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.7921>.
- (34) Hammel, P.; Huguet, F.; van Laethem, J.-L.; Goldstein, D.; Glimelius, B.; Artru, P.; Borbath, I.; Bouché, O.; Shannon, J.; André, T.; Mineur, L.; Chibaudel, B.; Bonnetain, F.; Louvet, C.; LAP07 Trial Group. Effect of Chemoradiotherapy vs Chemotherapy on Survival in Patients With Locally Advanced Pancreatic Cancer Controlled After 4 Months of Gemcitabine With or Without Erlotinib: The LAP07 Randomized Clinical Trial. *JAMA* **2016**, *315* (17), 1844–1853. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.4324>.
- (35) Burris, H. A.; Moore, M. J.; Andersen, J.; Green, M. R.; Rothenberg, M. L.; Modiano, M. R.; Cripps, M. C.; Portenoy, R. K.; Storniolo, A. M.; Tarassoff, P.; Nelson, R.; Dorr, F. A.; Stephens, C. D.; Von Hoff, D. D.



Improvements in Survival and Clinical Benefit with Gemcitabine as First-Line Therapy for Patients with Advanced Pancreas Cancer: A Randomized Trial. *J. Clin. Oncol.* **1997**, *15* (6), 2403–2413. <https://doi.org/10.1200/JCO.1997.15.6.2403>.

(36) Reni, M.; Cordio, S.; Milandri, C.; Passoni, P.; Bonetto, E.; Oliani, C.; Luppi, G.; Nicoletti, R.; Galli, L.; Bordonaro, R.; Passardi, A.; Zerbi, A.; Balzano, G.; Aldrighetti, L.; Staudacher, C.; Villa, E.; Di Carlo, V. Gemcitabine versus Cisplatin, Epirubicin, Fluorouracil, and Gemcitabine in Advanced Pancreatic Cancer: A Randomised Controlled Multicentre Phase III Trial. *Lancet Oncol.* **2005**, *6* (6), 369–376. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)70175-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)70175-3).

(37) Herrmann, R.; Bodoky, G.; Ruhstaller, T.; Glimelius, B.; Bajetta, E.; Schüller, J.; Saletti, P.; Bauer, J.; Figer, A.; Pestalozzi, B.; Köhne, C.-H.; Mingrone, W.; Stemmer, S. M.; Tãmas, K.; Kornek, G. V.; Koeberle, D.; Cina, S.; Bernhard, J.; Dietrich, D.; Scheithauer, W.; Swiss Group for Clinical Cancer Research; Central European Cooperative Oncology Group. Gemcitabine plus Capecitabine Compared with Gemcitabine Alone in Advanced Pancreatic Cancer: A Randomized, Multicenter, Phase III Trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research and the Central European Cooperative Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25* (16), 2212–2217. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.0886>.

(38) Boeck, S.; Hoehler, T.; Seipelt, G.; Mahlberg, R.; Wein, A.; Hochhaus, A.; Boeck, H.-P.; Schmid, B.; Kettner, E.; Stauch, M.; Lordick, F.; Ko, Y.; Geissler, M.; Schoppmeyer, K.; Kojouharoff, G.; Golf, A.; Neugebauer, S.; Heinemann, V. Capecitabine plus Oxaliplatin (CapOx) versus Capecitabine plus Gemcitabine (CapGem) versus Gemcitabine plus Oxaliplatin (MGemOx): Final Results of a Multicenter Randomized Phase II Trial in Advanced Pancreatic Cancer. *Ann. Oncol.* **2008**, *19* (2), 340–347. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm467>.

(39) Fine, R. L.; Fogelman, D. R.; Schreiber, S. M.; Desai, M.; Sherman, W.; Strauss, J.; Guba, S.; Andrade, R.; Chabot, J. The Gemcitabine, Docetaxel, and Capecitabine (GTX) Regimen for Metastatic Pancreatic Cancer: A Retrospective Analysis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2008**, *61* (1), 167–175. <https://doi.org/10.1007/s00280-007-0473-0>.

(40) Goldstein, D.; El-Maraghi, R. H.; Hammel, P.; Heinemann, V.; Kunzmann, V.; Sastre, J.; Scheithauer, W.; Siena, S.; Tabernero, J.; Teixeira, L.; Tortora, G.; Van Laethem, J.-L.; Young, R.; Penenberg, D. N.; Lu, B.; Romano, A.; Von Hoff, D. D. Nab-Paclitaxel plus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer: Long-Term Survival from a Phase III Trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **2015**, *107* (2). <https://doi.org/10.1093/jnci/dju413>.

(41) Conroy, T.; Desseigne, F.; Ychou, M.; Bouché, O.; Guimbaud, R.; Bécouarn, Y.; Adenis, A.; Raoul, J.-L.; Gourgou-Bourgade, S.; de la Fouchardière, C.; Bennouna, J.; Bachet, J.-B.; Khemissa-Akouz, F.; Péré-Vergé, D.; Delbaldo, C.; Assenat, E.; Chauffert, B.; Michel, P.; Montoto-Grillot, C.; Ducreux, M.; Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup. FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364* (19), 1817–1825. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1011923>.

(42) Moore, M. J.; Goldstein, D.; Hamm, J.; Figer, A.; Hecht, J. R.; Gallinger, S.; Au, H. J.; Murawa, P.; Walde, D.; Wolff, R. A.; Campos, D.; Lim, R.; Ding, K.; Clark, G.; Voskoglou-Nomikos, T.; Ptasynski, M.; Parulekar, W.; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Erlotinib plus Gemcitabine Compared with Gemcitabine Alone in Patients with Advanced Pancreatic Cancer: A Phase III Trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25* (15), 1960–1966. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.07.9525>.

(43) Saad, A. M.; Turk, T.; Al-Husseini, M. J.; Abdel-Rahman, O. Trends in Pancreatic Adenocarcinoma Incidence and Mortality in the United States in the Last Four Decades; a SEER-Based Study. *BMC Cancer* **2018**, *18* (1), 688. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4610-4>.

(44) Carraway, R.; Leeman, S. E. The Isolation of a New Hypotensive Peptide, Neurotensin, from Bovine Hypothalamic. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248* (19), 6854–6861.

(45) Kitabgi, P.; Carraway, R.; Leeman, S. E. Isolation of a Tridecapeptide from Bovine Intestinal Tissue and Its Partial Characterization as Neurotensin. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251* (22), 7053–7058.

(46) Rivier, J. E.; Lazarus, L. H.; Perrin, M. H.; Brown, M. R. Neurotensin Analogs. Structure-Activity Relationships. *J. Med. Chem.* **1977**, *20* (11), 1409–1412. <https://doi.org/10.1021/jm00221a011>.

(47) Carraway, R.; Leeman, S. E. The Amino Acid Sequence of a Hypothalamic Peptide, Neurotensin. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250* (5), 1907–1911.

- (48) Rostène, W. H.; Alexander, M. J. Neurotensin and Neuroendocrine Regulation. *Front. Neuroendocrinol.* **1997**, *18* (2), 115–173. <https://doi.org/10.1006/frne.1996.0146>.
- (49) Kitabgi, P.; De Nadai, F.; Rovère, C.; Bidard, J. N. Biosynthesis, Maturation, Release, and Degradation of Neurotensin and Neuromedin N. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1992**, *668*, 30–42. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb27337.x>.
- (50) Kitabgi, P.; Checler, F.; Mazella, J.; Vincent, J. P. Pharmacology and Biochemistry of Neurotensin Receptors. *Rev. Clin. Basic Pharm.* **1985**, *5* (3–4), 397–486.
- (51) Granier, C.; Rietschoten, J.; Kitabgi, P.; Poustis, C.; Freychet, P. Synthesis and Characterization of Neurotensin Analogues for Structure/Activity Relationship Studies. Acetyl-Neurotensin-(8-13) Is the Shortest Analogue with Full Binding and Pharmacological Activities. *Eur. J. Biochem.* **1982**, *124* (1), 117–125. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb05913.x>.
- (52) Kitabgi, P. Functional Domains of the Subtype 1 Neurotensin Receptor (NTS1). *Peptides* **2006**, *27* (10), 2461–2468. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.02.013>.
- (53) Chabry, J.; Labbé-Jullié, C.; Gully, D.; Kitabgi, P.; Vincent, J. P.; Mazella, J. Stable Expression of the Cloned Rat Brain Neurotensin Receptor into Fibroblasts: Binding Properties, Photoaffinity Labeling, Transduction Mechanisms, and Internalization. *J. Neurochem.* **1994**, *63* (1), 19–27. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63010019.x>.
- (54) Kleczkowska, P.; Lipkowski, A. W. Neurotensin and Neurotensin Receptors: Characteristic, Structure–Activity Relationship and Pain Modulation—A Review. *Eur. J. Pharm.* **2013**, *716* (1), 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.03.004>.
- (55) Mazella, J.; Botto, J. M.; Guillemare, E.; Coppola, T.; Sarret, P.; Vincent, J. P. Structure, Functional Expression, and Cerebral Localization of the Levocabastine-Sensitive Neurotensin/Neuromedin N Receptor from Mouse Brain. *J. Neurosci.* **1996**, *16* (18), 5613–5620.
- (56) Tanaka, K.; Masu, M.; Nakanishi, S. Structure and Functional Expression of the Cloned Rat Neurotensin Receptor. *Neuron* **1990**, *4* (6), 847–854. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90137-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90137-5).
- (57) Vita, N.; Laurent, P.; Lefort, S.; Chalon, P.; Dumont, X.; Kaghad, M.; Gully, D.; Le Fur, G.; Ferrara, P.; Caput, D. Cloning and Expression of a Complementary DNA Encoding a High Affinity Human Neurotensin Receptor. *FEBS Lett.* **1993**, *317* (1–2), 139–142. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81509-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81509-x).
- (58) Le, F.; Groshan, K.; Zeng, X. P.; Richelson, E. Characterization of the Genomic Structure, Promoter Region, and a Tetranucleotide Repeat Polymorphism of the Human Neurotensin Receptor Gene. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (2), 1315–1322. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.2.1315>.
- (59) White, J. F.; Noinaj, N.; Shibata, Y.; Love, J.; Kloss, B.; Xu, F.; Gvozdenovic-Jeremic, J.; Shah, P.; Shiloach, J.; Tate, C. G.; Grishammer, R. Structure of the Agonist-Bound Neurotensin Receptor. *Nature* **2012**, *490* (7421), 508–513. <https://doi.org/10.1038/nature11558>.
- (60) Turner, J. T.; James-Kracke, M. R.; Camden, J. M. Regulation of the Neurotensin Receptor and Intracellular Calcium Mobilization in HT29 Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, *253* (3), 1049–1056.
- (61) Hashimoto, K.; Kyoda, Y.; Tanaka, T.; Maeda, T.; Kobayashi, K.; Uchida, K.; Kitamura, H.; Hirata, K.; Tsukamoto, T.; Masumori, N. The Potential of Neurotensin Secreted from Neuroendocrine Tumor Cells to Promote Gelsolin-Mediated Invasiveness of Prostate Adenocarcinoma Cells. *Lab. Invest.* **2015**, *95* (3), 283–295. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.165>.
- (62) Vincent, J. P.; Mazella, J.; Kitabgi, P. Neurotensin and Neurotensin Receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, *20* (7), 302–309. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(99\)01357-7](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(99)01357-7).
- (63) Nielsen, M. S.; Jacobsen, C.; Olivecrona, G.; Gliemann, J.; Petersen, C. M. Sortilin/Neurotensin Receptor-3 Binds and Mediates Degradation of Lipoprotein Lipase. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (13), 8832–8836. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.8832>.
- (64) Nykjaer, A.; Lee, R.; Teng, K. K.; Jansen, P.; Madsen, P.; Nielsen, M. S.; Jacobsen, C.; Kliemann, M.; Schwarz, E.; Willnow, T. E.; Hempstead, B. L.; Petersen, C. M. Sortilin Is Essential for ProNGF-Induced Neuronal Cell Death. *Nature* **2004**, *427* (6977), 843–848. <https://doi.org/10.1038/nature02319>.
- (65) Jacobsen, L.; Madsen, P.; Jacobsen, C.; Nielsen, M. S.; Gliemann, J.; Petersen, C. M. Activation and

Functional Characterization of the Mosaic Receptor SorLA/LR11. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (25), 22788–22796. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100857200>.

(66) Mustain, W. C.; Rychahou, P. G.; Evers, B. M. The Role of Neurotensin in Physiologic and Pathologic Processes. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **2011**, 18 (1), 75–82. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e3283419052>.

(67) St-Gelais, F.; Jomphe, C.; Trudeau, L.-E. The Role of Neurotensin in Central Nervous System Pathophysiology: What Is the Evidence? *J. Psychiatry Neurosci.* **2006**, 31 (4), 229–245.

(68) Fawaz, C. S.; Martel, P.; Leo, D.; Trudeau, L.-E. Presynaptic Action of Neurotensin on Dopamine Release through Inhibition of D(2) Receptor Function. *BMC Neurosci.* **2009**, 10, 96. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-10-96>.

(69) Rossi, G. C.; Matulonis, J. E.; Richelson, E.; Barbut, D.; Pasternak, G. W. Systemically and Topically Active Antinociceptive Neurotensin Compounds. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, 334 (3), 1075–1079. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.165282>.

(70) Dobner, P. R. Neurotensin and Pain Modulation. *Peptides* **2006**, 27 (10), 2405–2414. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.04.025>.

(71) Roussy, G.; Dansereau, M.-A.; Baudisson, S.; Ezzoubaa, F.; Belleville, K.; Beaudet, N.; Martinez, J.; Richelson, E.; Sarret, P. Evidence for a Role of NTS2 Receptors in the Modulation of Tonic Pain Sensitivity. *Mol. Pain* **2009**, 5, 38. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-5-38>.

(72) Popp, E.; Schneider, A.; Vogel, P.; Teschendorf, P.; Böttiger, B. W. Time Course of the Hypothermic Response to Continuously Administered Neurotensin. *Neuropeptides* **2007**, 41 (5), 349–354. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2007.06.002>.

(73) Binder, E. B.; Kinkead, B.; Owens, M. J.; Nemeroff, C. B. The Role of Neurotensin in the Pathophysiology of Schizophrenia and the Mechanism of Action of Antipsychotic Drugs. *Biol. Psychiatry* **2001**, 50 (11), 856–872. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(01\)01211-2](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(01)01211-2).

(74) Chinaglia, G.; Probst, A.; Palacios, J. M. Neurotensin Receptors in Parkinson's Disease and Progressive Supranuclear Palsy: An Autoradiographic Study in Basal Ganglia. *Neuroscience* **1990**, 39 (2), 351–360. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90273-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90273-7).

(75) Nemeroff, C. B.; Youngblood, W. W.; Manberg, P. J.; Prange, A. J.; Kizer, J. S. Regional Brain Concentrations of Neuropeptides in Huntington's Chorea and Schizophrenia. *Science* **1983**, 221 (4614), 972–975. <https://doi.org/10.1126/science.6136092>.

(76) Lee, M. R.; Hinton, D. J.; Song, J. Y.; Lee, K. W.; Choo, C.; Johng, H.; Unal, S. S.; Richelson, E.; Choi, D.-S. Neurotensin Receptor Type 1 Regulates Ethanol Intoxication and Consumption in Mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2010**, 95 (2), 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.01.012>.

(77) Polak, J. M.; Sullivan, S. N.; Bloom, S. R.; Buchan, A. M. J.; Facer, P.; Brown, M. R.; Pearse, A. G. E. Specific Localisation of Neurotensin to the N Cell in Human Intestine by Radioimmunoassay and Immunocytochemistry. *Nature* **1977**, 270 (5633), 183–184. <https://doi.org/10.1038/270183a0>.

(78) Gullo, L.; Pezzilli, R.; Tomassetti, P.; de Giorgio, R. Plasma Cholecystokinin and Neurotensin after an Ordinary Meal in Humans. A Prolonged Time Study. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **1998**, 22 (1), 25–28.

(79) Blackburn, A. M.; Bloom, S. R.; Long, R. G.; Fletcher, D. R.; Christofides, N. D.; Fitzpatrick, M. L.; Baron, J. H. Effect of Neurotensin on Gastric Function in Man. *Lancet* **1980**, 315 (8176), 987–989. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(80\)91434-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(80)91434-8).

(80) Thor, K.; Rosell, S. Neurotensin Increases Colonic Motility. *Gastroenterology* **1986**, 90 (1), 27–31. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(86\)90070-3](https://doi.org/10.1016/0016-5085(86)90070-3).

(81) Gui, X.; Degolier, T. F.; Duke, G. E.; Carraway, R. E. Neurotensin Elevates Hepatic Bile Acid Secretion in Chickens by a Mechanism Requiring an Intact Enterohepatic Circulation. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2000**, 127 (1), 61–70. [https://doi.org/10.1016/s0742-8413\(00\)00126-2](https://doi.org/10.1016/s0742-8413(00)00126-2).

(82) Dupouy, S.; Mourra, N.; Doan, V. K.; Gompel, A.; Alifano, M.; Forgez, P. 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 (9), 1369–1378. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.04.024>.

- (83) Hawkins, M. F.; Barkemeyer, C. A.; Tulley, R. T. Synergistic Effects of Dopamine Agonists and Centrally Administered Neurotensin on Feeding. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1986**, *24* (5), 1195–1201. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90170-x](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90170-x).
- (84) Wood, J. G.; Hoang, H. D.; Bussjaeger, L. J.; Solomon, T. E. Neurotensin Stimulates Growth of Small Intestine in Rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **1988**, *255* (6), G813–G817. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1988.255.6.G813>.
- (85) Thomas, R. P.; Hellmich, M. R.; Townsend, C. M.; Evers, B. M. Role of Gastrointestinal Hormones in the Proliferation of Normal and Neoplastic Tissues. *Endocr. Rev.* **2003**, *24* (5), 571–599. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0028>.
- (86) Brun, P.; Mastrotto, C.; Beggiao, E.; Stefani, A.; Barzon, L.; Sturniolo, G. C.; Palù, G.; Castagliuolo, I. Neuropeptide Neurotensin Stimulates Intestinal Wound Healing Following Chronic Intestinal Inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2005**, *288* (4), G621–629. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00140.2004>.
- (87) Ciriello, J.; Zhang, T. X. Cardiovascular Effects of Neurotensin Microinjections into the Nucleus of the Solitary Tract. *Brain Res.* **1997**, *749* (1), 35–43. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(96\)01176-6](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(96)01176-6).
- (88) Ishizuka, J.; Townsend, C. M.; Thompson, J. C. Neurotensin Regulates Growth of Human Pancreatic Cancer. *Ann. Surg.* **1993**, *217* (5), 439–446.
- (89) Maoret, J. J.; Anini, Y.; Rouyer-Fessard, C.; Gully, D.; Laburthe, M. Neurotensin and a Non-Peptide Neurotensin Receptor Antagonist Control Human Colon Cancer Cell Growth in Cell Culture and in Cells Xenografted into Nude Mice. *Int. J. Cancer* **1999**, *80* (3), 448–454. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19990129\)80:3<448::aid-ijc19>3.0.co;2-n](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19990129)80:3<448::aid-ijc19>3.0.co;2-n).
- (90) Sehgal, I.; Powers, S.; Huntley, B.; Powis, G.; Pittelkow, M.; Maihle, N. J. Neurotensin Is an Autocrine Trophic Factor Stimulated by Androgen Withdrawal in Human Prostate Cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1994**, *91* (11), 4673–4677.
- (91) Alifano, M.; Souaze, F.; Dupouy, S.; Camilleri-Broet, S.; Younes, M.; Ahmed-Zaid, S.-M.; Takahashi, T.; Cancellieri, A.; Damiani, S.; Boaron, M.; Broet, P.; Miller, L. D.; Gespach, C.; Regnard, J. F.; Forgez, P. Neurotensin Receptor 1 Determines the Outcome of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16* (17), 4401–4410. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0659>.
- (92) Somaï, S.; Gompel, A.; Rostène, W.; Forgez, P. Neurotensin Counteracts Apoptosis in Breast Cancer Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *295* (2), 482–488. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)00703-9](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)00703-9).
- (93) Shimizu, S.; Tsukada, J.; Sugimoto, T.; Kikkawa, N.; Sasaki, K.; Chazono, H.; Hanazawa, T.; Okamoto, Y.; Seki, N. 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* (8), 1816–1823. <https://doi.org/10.1002/ijc.23710>.
- (94) Servotte, S.; Camby, I.; Debeir, O.; Deroanne, C.; Lambert, C. A.; Lapière, C. M.; Kiss, R.; Nusgens, B.; Decaestecker, C. The in Vitro Influences of Neurotensin on the Motility Characteristics of Human U373 Glioblastoma Cells. *Neuropath. Appl. Neuro.* **2006**, *32* (6), 575–584. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2006.00760.x>.
- (95) Carraway, R. E.; Plona, A. M. Involvement of Neurotensin in Cancer Growth: Evidence, Mechanisms and Development of Diagnostic Tools. *Peptides* **2006**, *27* (10), 2445–2460. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.04.030>.
- (96) Moody, T. W.; Chiles, J.; Casibang, M.; Moody, E.; Chan, D.; Davis, T. P. SR48692 Is a Neurotensin Receptor Antagonist Which Inhibits the Growth of Small Cell Lung Cancer Cells. *Peptides* **2001**, *22* (1), 109–115. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(00\)00362-4](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(00)00362-4).
- (97) Reubi, J.; Waser, B.; Friess, H.; Buchler, M.; Laissue, J. Neurotensin Receptors: A New Marker for Human Ductal Pancreatic Adenocarcinoma. *Gut* **1998**, *42* (4), 546–550.
- (98) Reubi, J. C.; Waser, B.; Schaer, J. C.; Laissue, J. A. Neurotensin Receptors in Human Neoplasms: High Incidence in Ewing's Sarcomas. *Int. J. Cancer* **1999**, *82* (2), 213–218. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19990719\)82:2<213::aid-ijc11>3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19990719)82:2<213::aid-ijc11>3.0.co;2-8).
- (99) Seethalakshmi, L.; Mitra, S. P.; Dobner, P. R.; Menon, M.; Carraway, R. E. Neurotensin Receptor



- Expression in Prostate Cancer Cell Line and Growth Effect of NT at Physiological Concentrations. *Prostate* **1997**, *31* (3), 183–192. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0045\(19970515\)31:3<183::AID-PROS7>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0045(19970515)31:3<183::AID-PROS7>3.0.CO;2-M).
- (100) Maoret, J. J.; Pospaï, D.; Rouyer-Fessard, C.; Couvineau, A.; Labois, C.; Voisin, T.; Laburthe, M. Neurotensin Receptor and Its mRNA Are Expressed in Many Human Colon Cancer Cell Lines but Not in Normal Colonic Epithelium: Binding Studies and RT-PCR Experiments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *203* (1), 465–471. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2205>.
- (101) Reeve, J. G.; Goedert, M.; Emson, P. C.; Bleechen, N. M. Neurotensin in Human Small Cell Lung Carcinoma. *Recent Results Cancer Res.* **1985**, *99*, 175–176. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-82533-0\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-642-82533-0_18).
- (102) Souazé, F.; Dupouy, S.; Viardot-Foucault, V.; Bruyneel, E.; Attoub, S.; Gespach, C.; Gompel, A.; Forgez, P. Expression of Neurotensin and NT1 Receptor in Human Breast Cancer: A Potential Role in Tumor Progression. *Cancer Res.* **2006**, *66* (12), 6243–6249. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0450>.
- (103) Dupouy, S.; Viardot-Foucault, V.; Alifano, M.; Souazé, F.; Plu-Bureau, G.; Chaouat, M.; Lavour, A.; Hugol, D.; Gespach, C.; Gompel, A.; Forgez, P. The Neurotensin Receptor-1 Pathway Contributes to Human Ductal Breast Cancer Progression. *PLoS ONE* **2009**, *4* (1), e4223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004223>.
- (104) Mijatovic, T.; Gailly, P.; Mathieu, V.; De Nève, N.; Yeaton, P.; Kiss, R.; Decaestecker, C. Neurotensin Is a Versatile Modulator of in Vitro Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell (PDAC) Migration. *Cell. Oncol.* **2007**, *29* (4), 315–326. <https://doi.org/10.1155/2007/701789>.
- (105) Wang, L.; Friess, H.; Zhu, Z.; Graber, H.; Zimmermann, A.; Korc, M.; Reubi, J. C.; Büchler, M. W. Neurotensin Receptor-1 mRNA Analysis in Normal Pancreas and Pancreatic Disease. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6* (2), 566–571.
- (106) Körner, M.; Waser, B.; Strobel, O.; Büchler, M.; Reubi, J. C. Neurotensin Receptors in Pancreatic Ductal Carcinomas. *EJNMMI Res.* **2015**, *5* (1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13550-015-0094-2>.
- (107) Kitabgi, P. Targeting Neurotensin Receptors with Agonists and Antagonists for Therapeutic Purposes. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2002**, *5* (5), 764–776.
- (108) 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.* **2013**, *3*, 184. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00184>.
- (109) Reubi, J. C.; Maecke, H. R. Peptide-Based Probes for Cancer Imaging. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49* (11), 1735–1738. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.053041>.
- (110) Fani, M.; Maecke, H. R.; Okarvi, S. M. Radiolabeled Peptides: Valuable Tools for the Detection and Treatment of Cancer. *Theranostics* **2012**, *2* (5), 481–501. <https://doi.org/10.7150/thno.4024>.
- (111) Staderini, M.; Megia-Fernandez, A.; Dhaliwal, K.; Bradley, M. Peptides for Optical Medical Imaging and Steps towards Therapy. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26* (10), 2816–2826. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.039>.
- (112) Seibold, U.; Wängler, B.; Schirmacher, R.; Wängler, C. Bimodal Imaging Probes for Combined PET and Ol: Recent Developments and Future Directions for Hybrid Agent Development. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/153741>.
- (113) Azhdarinia, A.; Ghosh, P.; Ghosh, S.; Wilganowski, N.; Sevic-Muraca, E. M. Dual-Labeling Strategies for Nuclear and Fluorescence Molecular Imaging: A Review and Analysis. *Mol. Imaging Biol.* **2012**, *14* (3), 261–276. <https://doi.org/10.1007/s11307-011-0528-9>.
- (114) Vaquero, J. J.; Kinahan, P. Positron Emission Tomography: Current Challenges and Opportunities for Technological Advances in Clinical and Preclinical Imaging Systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2015**, *17* (1), 385–414. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071114-040723>.
- (115) Low, P. S.; Singhal, S.; Srinivasarao, M. Fluorescence-Guided Surgery of Cancer: Applications, Tools and Perspectives. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *45*, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.03.002>.
- (116) Xi, L.; Jiang, H. Image-Guided Surgery Using Multimodality Strategy and Molecular Probes. *WIREs Nanomed. Nanobiotech.* **2016**, *8* (1), 46–60. <https://doi.org/10.1002/wnan.1352>.
- (117) Hekman, M. C. H.; Rijpkema, M.; Bos, D. L.; Oosterwijk, E.; Goldenberg, D. M.; Mulders, P. F. A.; Boerman, O. C. Detection of Micrometastases Using SPECT/Fluorescence Dual-Modality Imaging in a CEA-Expressing Tumor

- Model. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (5), 706–710. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.185470>.
- (118) Rijpkema, M.; Oyen, W. J.; Bos, D.; Franssen, G. M.; Goldenberg, D. M.; Boerman, O. C. SPECT- and Fluorescence Image-Guided Surgery Using a Dual-Labeled Carcinoembryonic Antigen-Targeting Antibody. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55* (9), 1519–1524. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.142141>.
- (119) Lütje, S.; Rijpkema, M.; Franssen, G. M.; Fracasso, G.; Helfrich, W.; Eek, A.; Oyen, W. J.; Colombatti, M.; Boerman, O. C. Dual-Modality Image-Guided Surgery of Prostate Cancer with a Radiolabeled Fluorescent Anti-PSMA Monoclonal Antibody. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55* (6), 995–1001. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.138180>.
- (120) Bunschoten, A.; Buckle, T.; Visser, N.; Kuil, J.; Yuan, H.; Josephson, L.; Vahrmeijer, A. L.; van Leeuwen, F. W. B. Multimodal Interventional Molecular Imaging of Tumor Margins and Distant Metastases by Targeting the  $\text{Av}\beta 3$  Integrin. *ChemBioChem* **2012**, *13* (7), 1039–1045. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200034>.
- (121) Hernandez Vargas, S.; Ghosh, S. C.; Azhdarinia, A. New Developments in Dual-Labeled Molecular Imaging Agents. *J. Nucl. Med.* **2019**, *60* (4), 459–465. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.213488>.
- (122) Zhao, J.; Chen, J.; Ma, S.; Liu, Q.; Huang, L.; Chen, X.; Lou, K.; Wang, W. Recent Developments in Multimodality Fluorescence Imaging Probes. *Acta Pharmacol. Sin.* **2018**, *8* (3), 320–338. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.03.010>.
- (123) Bruehlmeier, M.; Garayoa, E. G.; Blanc, A.; Holzer, B.; Gergely, S.; Tourwé, D.; Schubiger, P. A.; Bläuenstein, P. Stabilization of Neurotensin Analogues: Effect on Peptide Catabolism, Biodistribution and Tumor Binding. *Nucl. Med. Biol.* **2002**, *29* (3), 321–327. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(01\)00304-3](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(01)00304-3).
- (124) Yao, J.-F.; Yang, H.; Zhao, Y.-Z.; Xue, M. Metabolism of Peptide Drugs and Strategies to Improve Their Metabolic Stability. *Curr. Drug Metab.* **2018**, *19* (11), 892–901. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180628171531>.
- (125) Mascarín, A.; Valverde, I. E.; Vomstein, S.; Mindt, T. L. 1,2,3-Triazole Stabilized Neurotensin-Based Radiopeptidomimetics for Improved Tumor Targeting. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26* (10), 2143–2152. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00444>.
- (126) Lugin, D.; Vecchini, F.; Doulut, S.; Rodriguez, M.; Martinez, J.; Kitabgi, P. Reduced Peptide Bond Pseadopeptide Analogues of Neurotensins Binding and Biological Activities, and in Vitro Metabolic Stability. *Eur. J. Pharmacol.* **1991**, *205* (2), 191–198. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(91\)90819-C](https://doi.org/10.1016/0014-2999(91)90819-C).
- (127) Heyl, D. L.; Sefler, A. M.; He, J. X.; Sawyer, T. K.; Wustrow, D. J.; Akunne, H. C.; Davis, M. D.; Pugsley, T. A.; Heffner, T. G.; Corbin, A. E. Structure-Activity and Conformational Studies of a Series of Modified C-Terminal Hexapeptide Neurotensin Analogues. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *44* (3), 233–238. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1994.tb00165.x>.
- (128) Hultsch, C.; Pawelke, B.; Bergmann, R.; Wuest, F. Synthesis and Evaluation of Novel Multimeric Neurotensin(8–13) Analogs. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (17), 5913–5920. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.05.024>.
- (129) Kokko, K. P.; Hadden, M. K.; Orwig, K. S.; Mazella, J.; Dix, T. A. In Vitro Analysis of Stable, Receptor-Selective Neurotensin[8–13] Analogues. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (19), 4141–4148. <https://doi.org/10.1021/jm0300633>.
- (130) Maschauer, S.; Prante, O. Radiopharmaceuticals for Imaging and Endoradiotherapy of Neurotensin Receptor-Positive Tumors. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2018**, *61* (3), 309–325. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3581>.
- (131) García-Garayoa, E.; Bläuenstein, P.; Bruehlmeier, M.; Blanc, A.; Iterbeke, K.; Conrath, P.; Tourwé, D.; Schubiger, P. A. Preclinical Evaluation of a New, Stabilized Neurotensin(8–13) Pseudopeptide Radiolabeled with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . *J. Nucl. Med.* **2002**, *43* (3), 374–383.
- (132) García-Garayoa, E.; Bläuenstein, P.; Blanc, A.; Maes, V.; Tourwé, D.; Schubiger, P. A. A Stable Neurotensin-Based Radiopharmaceutical for Targeted Imaging and Therapy of Neurotensin Receptor-Positive Tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2009**, *36* (1), 37–47. <https://doi.org/10.1007/s00259-008-0894-y>.
- (133) Bläuenstein, P.; Garayoa, E. G.; Rüegg, D.; Blanc, A.; Tourwé, D.; Beck-Sickinger, A.; Schubiger, P. A. Improving the Tumor Uptake of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Labeled Neuropeptides Using Stabilized Peptide Analogues. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2004**, *19* (2), 181–188. <https://doi.org/10.1089/108497804323071959>.

- (134) Nock, B. A.; Nikolopoulou, A.; Reubi, J.-C.; Maes, V.; Conrath, P.; Tourwé, D.; Maina, T. Toward Stable N4-Modified Neurotensins for NTS1-Receptor-Targeted Tumor Imaging with <sup>99m</sup>Tc. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (15), 4767–4776. <https://doi.org/10.1021/jm060415g>.
- (135) Gabriel, M.; Decristoforo, C.; Wöll, E.; Eisterer, W.; Nock, B.; Maina, T.; Moncayo, R.; Virgolini, I. [<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* (5), 557–563. <https://doi.org/10.1089/cbr.2010.0952>.
- (136) Erfani, M.; Zarrabi Ahrabi, N.; Shafiei, M.; Shirmardi, S. A (99m) Tc-Tricine-HYNIC-Labeled Peptide Targeting the Neurotensin Receptor for Single-Photon Imaging in Malignant Tumors. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **2014**, *57* (3), 125–131. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3176>.
- (137) de Visser, M.; Janssen, P. J. J. M.; Srinivasan, A.; Reubi, J. C.; Waser, B.; Erion, J. L.; Schmidt, M. A.; Krenning, E. P.; de Jong, M. Stabilised <sup>111</sup>In-Labelled DTPA- and DOTA-Conjugated Neurotensin Analogues for Imaging and Therapy of Exocrine Pancreatic Cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30* (8), 1134–1139. <https://doi.org/10.1007/s00259-003-1189-y>.
- (138) Janssen, P. J. J. M.; de Visser, M.; Verwijnen, S. M.; Bernard, B. F.; Srinivasan, A.; Erion, J. L.; Breeman, W. A. P.; Vulto, A. G.; Krenning, E. P.; de Jong, M. Five Stabilized <sup>111</sup>In-Labeled Neurotensin Analogs in Nude Mice Bearing HT29 Tumors. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2007**, *22* (3), 374–381. <https://doi.org/10.1089/cbr.2007.369.A>.
- (139) Alshoukr, F.; Rosant, C.; Maes, V.; Abdelhak, J.; Raguin, O.; Burg, S.; Sarda, L.; Barbet, J.; Tourwé, D.; Pelapat, D.; Gruaz-Guyon, A. Novel Neurotensin Analogues for Radioisotope Targeting to Neurotensin Receptor-Positive Tumors. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20* (8), 1602–1610. <https://doi.org/10.1021/bc900151z>.
- (140) Alshoukr, F.; Prignon, A.; Brans, L.; Jallane, A.; Mendes, S.; Talbot, J.-N.; Tourwé, D.; Barbet, J.; Gruaz-Guyon, A. 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* (7), 1374–1385. <https://doi.org/10.1021/bc200078p>.
- (141) Röhrich, A.; Bergmann, R.; Kretzschmann, A.; Noll, S.; Steinbach, J.; Pietzsch, J.; Stephan, H. A Novel Tetrabranched Neurotensin(8-13) Cyclam Derivative: Synthesis, <sup>64</sup>Cu-Labeling and Biological Evaluation. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105* (6), 821–832. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.02.011>.
- (142) Bergmann, R.; Scheunemann, M.; Heichert, C.; Mäding, P.; Wittrisch, H.; Kretzschmar, M.; Rodig, H.; Tourwé, D.; Iterbeke, K.; Chavatte, K.; Zips, D.; Reubi, J. C.; Johannsen, B. Biodistribution and Catabolism of <sup>18</sup>F-Labeled Neurotensin(8–13) Analogs. *Nucl. Med. Biol.* **2002**, *29* (1), 61–72. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(01\)00284-0](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(01)00284-0).
- (143) Hultsch, C.; Berndt, M.; Bergmann, R.; Wuest, F. Radiolabeling of Multimeric Neurotensin(8-13) Analogs with the Short-Lived Positron Emitter Fluorine-18. *Appl. Radiat. Isot.* **2007**, *65* (7), 818–826. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2007.02.004>.
- (144) Wu, Z.; Li, L.; Liu, S.; Yakushijin, F.; Yakushijin, K.; Horne, D.; Conti, P. S.; Li, Z.; Kandeel, F.; Shively, J. E. 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* (7), 1178–1184. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.137489>.
- (145) Maschauer, S.; Einsiedel, J.; Hübner, H.; Gmeiner, P.; Prante, O. <sup>18</sup>F- and <sup>68</sup>Ga-Labeled Neurotensin Peptides for PET Imaging of Neurotensin Receptor 1. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (13), 6480–6492. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00675>.
- (146) Maschauer, S.; Einsiedel, J.; Hocke, C.; Hübner, H.; Kuwert, T.; Gmeiner, P.; Prante, O. 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* (5), 224–228. <https://doi.org/10.1021/ml1000728>.
- (147) Sparr, C.; Purkayastha, N.; Yoshinari, T.; Seebach, D.; Maschauer, S.; Prante, O.; Hübner, H.; Gmeiner, P.; Kolesinska, B.; Cescato, R.; Waser, B.; Reubi, J. C. Syntheses, Receptor Bindings, *in Vitro* and *in Vivo* Stabilities and Biodistributions of DOTA-Neurotensin(8-13) Derivatives Containing  $\beta$ -Amino Acid Residues - A Lesson about the Importance of Animal Experiments. *Chem. Biodivers.* **2013**, *10* (12), 2101–2121. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201300331>.
- (148) Prignon, A.; Provost, C.; Alshoukr, F.; Wendum, D.; Couvelard, A.; Barbet, J.; Forgez, P.; Talbot, J.-N.;

- Gruaz-Guyon, A. Preclinical Evaluation of 68Ga-DOTA-NT-20.3: A Promising PET Imaging Probe To Discriminate Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma from Pancreatitis. *Mol. Pharmaceutics* **2019**, *16* (6), 2776–2784. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00283>.
- (149) Lwin, T. M.; Hoffman, R. M.; Bouvet, M. The Development of Fluorescence Guided Surgery for Pancreatic Cancer: From Bench to Clinic. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2018**, *18* (7), 651–662. <https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1477593>.
- (150) Kaushal, S.; McElroy, M. K.; Luiken, G. A.; Talamini, M. A.; Moossa, A. R.; Hoffman, R. M.; Bouvet, M. Fluorophore-Conjugated Anti-CEA Antibody for the Intraoperative Imaging of Pancreatic and Colorectal Cancer. *J. Gastrointest. Surg.* **2008**, *12* (11), 1938–1950. <https://doi.org/10.1007/s11605-008-0581-0>.
- (151) Metildi, C. A.; Kaushal, S.; Pu, M.; Messer, K. A.; Luiken, G. A.; Moossa, A. R.; Hoffman, R. M.; Bouvet, M. Fluorescence-Guided Surgery with a Fluorophore-Conjugated Antibody to Carcinoembryonic Antigen (CEA), That Highlights the Tumor, Improves Surgical Resection and Increases Survival in Orthotopic Mouse Models of Human Pancreatic Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **2014**, *21* (4), 1405–1411. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-3495-y>.
- (152) Gutowski, M.; Framery, B.; Boonstra, M. C.; Garambois, V.; Quenet, F.; Dumas, K.; Scherninski, F.; Cailler, F.; Vahrmeijer, A. L.; Pèlerin, A. SGM-101: An Innovative near-Infrared Dye-Antibody Conjugate That Targets CEA for Fluorescence-Guided Surgery. *Surg. Oncol.* **2017**, *26* (2), 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2017.03.002>.
- (153) Boonstra, M. C.; Tolner, B.; Schaafsma, B. E.; Boogerd, L. S. F.; Prevoo, H. A. J. M.; Bhavsar, G.; Kuppen, P. J. K.; Sier, C. F. M.; Bonsing, B. A.; Frangioni, J. V.; van de Velde, C. J. H.; Chester, K. A.; Vahrmeijer, A. L. Preclinical Evaluation of a Novel CEA-Targeting near-Infrared Fluorescent Tracer Delineating Colorectal and Pancreatic Tumors. *Int. J. Cancer* **2015**, *137* (8), 1910–1920. <https://doi.org/10.1002/ijc.29571>.
- (154) McElroy, M.; Kaushal, S.; Luiken, G. A.; Talamini, M. A.; Moossa, A. R.; Hoffman, R. M.; Bouvet, M. Imaging of Primary and Metastatic Pancreatic Cancer Using a Fluorophore-Conjugated Anti-CA19-9 Antibody for Surgical Navigation. *World J. Surg.* **2008**, *32* (6), 1057–1066. <https://doi.org/10.1007/s00268-007-9452-1>.
- (155) Park, J. Y.; Hiroshima, Y.; Lee, J. Y.; Maawy, A. A.; Hoffman, R. M.; Bouvet, M. MUC1 Selectively Targets Human Pancreatic Cancer in Orthotopic Nude Mouse Models. *PLoS ONE* **2015**, *10* (3), e0122100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122100>.
- (156) Tummers, W. S.; Miller, S. E.; Teraphongphom, N. T.; Gomez, A.; Steinberg, I.; Huland, D. M.; Hong, S.; Kothapalli, S.-R.; Hasan, A.; Ertsey, R.; Bonsing, B. A.; Vahrmeijer, A. L.; Swijnenburg, R.-J.; Longacre, T. A.; Fisher, G. A.; Gambhir, S. S.; Poultsides, G. A.; Rosenthal, E. L. Intraoperative Pancreatic Cancer Detection Using Tumor-Specific Multimodality Molecular Imaging. *Ann. Surg. Oncol.* **2018**, *25* (7), 1880–1888. <https://doi.org/10.1245/s10434-018-6453-2>.
- (157) Harlaar, N. J.; Koller, M.; de Jongh, S. J.; van Leeuwen, B. L.; Hemmer, P. H.; Kruijff, S.; van Ginkel, R. J.; Been, L. B.; de Jong, J. S.; Kats-Ugurlu, G.; Linssen, M. D.; Jorritsma-Smit, A.; van Oosten, M.; Nagengast, W. B.; Ntziachristos, V.; van Dam, G. M. Molecular Fluorescence-Guided Surgery of Peritoneal Carcinomatosis of Colorectal Origin: A Single-Centre Feasibility Study. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *1* (4), 283–290. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(16\)30082-6](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(16)30082-6).
- (158) Cetuximab-IRDye 800CW and Intraoperative Imaging in Finding Pancreatic Cancer in Patients Undergoing Surgery - Full Text View - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02736578> (accessed May 6, 2020).
- (159) Panitumumab-IRDye800 in Patients With Pancreatic Cancer Undergoing Surgery - Full Text View - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03384238> (accessed May 6, 2020).
- (160) Phase I of SGM-101 in Patients With Cancer of the Colon, Rectum or Pancreas - Full Text View - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02973672> (accessed May 6, 2020).
- (161) Liu, L.; Lin, G.; Yin, F.; Law, W.-C.; Yong, K.-T. Near-Infrared Fluorescent Peptide Probes for Imaging of Tumor in Vivo and Their Biototoxicity Evaluation. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2016**, *104* (4), 910–916. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35628>.
- (162) Handgraaf, H. J. M.; Boonstra, M. C.; Prevoo, H. A. J. M.; Kuil, J.; Bordo, M. W.; Boogerd, L. S. F.; Sibinga Mulder, B. G.; Sier, C. F. M.; Vinkenburg-van Slooten, M. L.; Valentijn, A. R. P. M.; Burggraaf, J.; van de Velde, C.



- J. H.; Frangioni, J. V.; Vahrmeijer, A. L. Real-Time near-Infrared Fluorescence Imaging Using CRGD-ZW800-1 for Intraoperative Visualization of Multiple Cancer Types. *Oncotarget* **2017**, *8* (13), 21054–21066. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15486>.
- (163) Tummers, W. S.; Kimura, R. H.; Abou-Elkacem, L.; Beinat, C.; Vahrmeijer, A. L.; Swijnenburg, R.-J.; Willmann, J. K.; Gambhir, S. S. Development and Preclinical Validation of a Cysteine Knottin Peptide Targeting Integrin  $\text{Av}\beta 6$  for Near-Infrared Fluorescent-Guided Surgery in Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24* (7), 1667–1676. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2491>.
- (164) Yin, X.; Wang, M.; Wang, H.; Deng, H.; He, T.; Tan, Y.; Zhu, Z.; Wu, Z.; Hu, S.; Li, Z. Evaluation of Neurotensin Receptor 1 as a Potential Imaging Target in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Amino Acids* **2017**, *49* (8), 1325–1335. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2430-5>.
- (165) Deng, H.; Wang, H.; Wang, M.; Li, Z.; Wu, Z. Synthesis and Evaluation of  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NT-Cy5.5 as a Dual-Modality PET/Fluorescence Probe to Image Neurotensin Receptor-Positive Tumor. *Mol. Pharmaceutics* **2015**, *12* (8), 3054–3061. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00325>.
- (166) Dearling, J. L. J.; Voss, S. D.; Dunning, P.; Snay, E.; Fahey, F.; Smith, S. V.; Huston, J. S.; Meares, C. F.; Treves, S. T.; Packard, A. B. Imaging Cancer Using PET — the Effect of the Bifunctional Chelator on the Biodistribution of a  $^{64}\text{Cu}$ -Labeled Antibody. *Nucl. Med. Biol.* **2011**, *38* (1), 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2010.07.003>.
- (167) Marengo, M.; Lodola, L.; Persico, M. G.; Frangipane, V.; Facchetti, A.; Aprile, C.; Hodolič, M. Evidence of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT-20.3 Uptake in Pancreatic Adenocarcinoma AsPC-1 Cell Line - in Vitro Study. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2018**, *19* (9), 754–759. <https://doi.org/10.2174/1389201019666180829152314>.
- (168) Schindler, L.; Bernhardt, G.; Keller, M. Modifications at Arg and Ile Give Neurotensin(8–13) Derivatives with High Stability and Retained NTS1 Receptor Affinity. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10* (6), 960–965. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00122>.
- (169) Antunes, P.; Ginj, M.; Zhang, H.; Waser, B.; Baum, R. P.; Reubi, J. C.; Maecke, H. Are Radiogallium-Labelled DOTA-Conjugated Somatostatin Analogues Superior to Those Labelled with Other Radiometals? *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, *34* (7), 982–993. <https://doi.org/10.1007/s00259-006-0317-x>.
- (170) Fani, M.; Del Pozzo, L.; Abiraj, K.; Mansi, R.; Tamma, M. L.; Cescato, R.; Waser, B.; Weber, W. A.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R. PET of Somatostatin Receptor-Positive Tumors Using  $^{64}\text{Cu}$ - and  $^{68}\text{Ga}$ -Somatostatin Antagonists: The Chelate Makes the Difference. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52* (7), 1110–1118. <https://doi.org/10.2967/jnumed.111.087999>.
- (171) Varasteh, Z.; Mitran, B.; Rosenström, U.; Velikyan, I.; Rosestedt, M.; Lindeberg, G.; Sörensen, J.; Larhed, M.; Tolmachev, V.; Orlova, A. The Effect of Macrocyclic Chelators on the Targeting Properties of the  $^{68}\text{Ga}$ -Labeled Gastrin Releasing Peptide Receptor Antagonist PEG2-RM26. *Nucl. Med. Biol.* **2015**, *42* (5), 446–454. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2014.12.009>.
- (172) Fani, M.; André, J. P.; Maecke, H. R.  $^{68}\text{Ga}$ -PET: A Powerful Generator-Based Alternative to Cyclotron-Based PET Radiopharmaceuticals. *Contrast Media Mol. Imaging* **2008**, *3* (2), 67–77. <https://doi.org/10.1002/cmml.232>.
- (173) Khan, M. U.; Khan, S.; El-Refaie, S.; Win, Z.; Rubello, D.; Al-Nahhas, A. Clinical Indications for Gallium-68 Positron Emission Tomography Imaging. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2009**, *35* (6), 561–567. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2009.01.007>.
- (174) Velikyan, I. Prospective of  $^{68}\text{Ga}$ -Radiopharmaceutical Development. *Theranostics* **2014**, *4* (1), 47–80. <https://doi.org/10.7150/thno.7447>.
- (175) Brandt, M.; Cardinale, J.; Aulsebrook, M. L.; Gasser, G.; Mindt, T. L. An Overview of PET Radiochemistry, Part 2: Radiometals. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (10), 1500–1506. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.190801>.
- (176) Velikyan, I. Continued Rapid Growth in ( $^{68}\text{Ga}$ ) Ga Applications: Update 2013 to June 2014. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **2015**, *58* (3), 99–121. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3250>.
- (177) Bartholomä, M. D.; Louie, A. S.; Valliant, J. F.; Zubieta, J. Technetium and Gallium Derived Radiopharmaceuticals: Comparing and Contrasting the Chemistry of Two Important Radiometals for the Molecular Imaging Era. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2903–2920. <https://doi.org/10.1021/cr1000755>.

- (178) Price, E. W.; Orvig, C. Matching Chelators to Radiometals for Radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (1), 260–290. <https://doi.org/10.1039/C3CS60304K>.
- (179) Price, T. W.; Greenman, J.; Stasiuk, G. J. Current Advances in Ligand Design for Inorganic Positron Emission Tomography Tracers <sup>68</sup>Ga, <sup>64</sup>Cu, <sup>89</sup>Zr and <sup>44</sup>Sc. *Dalton Trans.* **2016**, *45* (40), 15702–15724. <https://doi.org/10.1039/C5DT04706D>.
- (180) Tsionou, M. I.; Knapp, C. E.; Foley, C. A.; Munteanu, C. R.; Cakebread, A.; Imberti, C.; Eykyn, T. R.; Young, J. D.; Paterson, B. M.; Blower, P. J.; Ma, M. T. Comparison of Macrocyclic and Acyclic Chelators for Gallium-68 Radiolabelling. *RSC Adv.* **2017**, *7* (78), 49586–49599. <https://doi.org/10.1039/C7RA09076E>.
- (181) Bartholomä, M. D. Recent Developments in the Design of Bifunctional Chelators for Metal-Based Radiopharmaceuticals Used in Positron Emission Tomography. *Inorg. Chim. Acta* **2012**, *Complete* (389), 36–51. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2012.01.061>.
- (182) Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson, C. J. Coordinating Radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium, and Zirconium for PET and SPECT Imaging of Disease. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2858–2902. <https://doi.org/10.1021/cr900325h>.
- (183) Pisoni, D. S.; Todeschini, L.; Borges, A. C. A.; Petzhold, C. L.; Rodembusch, F. S.; Campo, L. F. Symmetrical and Asymmetrical Cyanine Dyes. Synthesis, Spectral Properties, and BSA Association Study. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (12), 5511–5520. <https://doi.org/10.1021/jo500657s>.
- (184) Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S. Cyanine Dye Labeling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters. *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4* (2), 105–111. <https://doi.org/10.1021/bc00020a001>.
- (185) Canovas, C.; Moreau, M.; Bernhard, C.; Oudot, A.; Guillemin, M.; Denat, F.; Goncalves, V. Site-Specific Dual Labeling of Proteins on Cysteine Residues with Chlorotetrazines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57* (33), 10646–10650. <https://doi.org/10.1002/anie.201806053>.
- (186) Canovas, C.; Moreau, M.; Vrigneaud, J.-M.; Bellaye, P.-S.; Collin, B.; Denat, F.; Goncalves, V. Modular Assembly of Multimodal Imaging Agents through an Inverse Electron Demand Diels–Alder Reaction. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30* (3), 888–897. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00017>.
- (187) Burggraaf, J.; Kamerling, I. M. C.; Gordon, P. B.; Schrier, L.; de Kam, M. L.; Kales, A. J.; Bendiksen, R.; Indrevoll, B.; Bjerke, R. M.; Moestue, S. A.; Yazdanfar, S.; Langers, A. M. J.; Swaerd-Nordmo, M.; Torheim, G.; Warren, M. V.; Morreau, H.; Voorneveld, P. W.; Buckle, T.; van Leeuwen, F. W. B.; Ødegårdstuen, L.-I.; Dalsgaard, G. T.; Healey, A.; Hardwick, J. C. H. Detection of Colorectal Polyps in Humans Using an Intravenously Administered Fluorescent Peptide Targeted against C-Met. *Nat. Med.* **2015**, *21* (8), 955–961. <https://doi.org/10.1038/nm.3641>.
- (188) Amouroux, G.; Pan, J.; Jenni, S.; Zhang, C.; Zhang, Z.; Hundal-Jabal, N.; Colpo, N.; Liu, Z.; Bénard, F.; Lin, K.-S. Imaging Bradykinin B1 Receptor with <sup>68</sup>Ga-Labeled [Des-Arg<sup>10</sup>]Kallidin Derivatives: Effect of the Linker on Biodistribution and Tumor Uptake. *Mol. Pharmaceutics* **2015**, *12* (8), 2879–2888. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00070>.
- (189) Antunes, P.; Ginj, M.; Walter, M. A.; Chen, J.; Reubi, J.-C.; Maecke, H. R. Influence of Different Spacers on the Biological Profile of a DOTA–Somatostatin Analogue. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18* (1), 84–92. <https://doi.org/10.1021/bc0601673>.
- (190) Jamous, M.; Tamma, M. L.; Gourni, E.; Waser, B.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R.; Mansi, R. PEG Spacers of Different Length Influence the Biological Profile of Bombesin-Based Radiolabeled Antagonists. *Nucl. Med. Biol.* **2014**, *41* (6), 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.nuclmedbio.2014.03.014>.
- (191) Mascarin, A.; Valverde, I. E.; Mindt, T. L. Effect of a Spacer Moiety on Radiometal Labelled Neurotensin Derivatives. *Radiochim. Acta* **2013**, *101* (11), 733–737. <https://doi.org/10.1524/ract.2013.2090>.
- (192) Varasteh, Z.; Rosenström, U.; Velikyan, I.; Mitran, B.; Altai, M.; Honarvar, H.; Rosestedt, M.; Lindeberg, G.; Sörensen, J.; Larhed, M.; Tolmachev, V.; Orlova, A. The Effect of Mini-PEG-Based Spacer Length on Binding and Pharmacokinetic Properties of a <sup>68</sup>Ga-Labeled NOTA-Conjugated Antagonistic Analog of Bombesin. *Molecules* **2014**, *19* (7), 10455–10472. <https://doi.org/10.3390/molecules190710455>.
- (193) Coin, I.; Beyermann, M.; Bienert, M. Solid-Phase Peptide Synthesis: From Standard Procedures to the Synthesis of Difficult Sequences. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (12), 3247–3256. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.454>.

- (194) Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (6), 2455–2504. <https://doi.org/10.1021/cr800323s>.
- (195) Hacht, B. Gallium(III) Ion Hydrolysis under Physiological Conditions. *B. Korean Chem. Soc.* **2008**, *29* (2), 372–376. <https://doi.org/10.5012/BKCS.2008.29.2.372>.
- (196) Boschi, S.; Malizia, C.; Lodi, F. Overview and Perspectives on Automation Strategies in (68)Ga Radiopharmaceutical Preparations. *Recent Results Cancer Res.* **2013**, *194*, 17–31. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-27994-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-27994-2_2).
- (197) Decristoforo, C.; Knopp, R.; von Guggenberg, E.; Rupprich, M.; Dreger, T.; Hess, A.; Virgolini, I.; Haubner, R. A Fully Automated Synthesis for the Preparation of 68Ga-Labelled Peptides. *Nucl. Med. Commun.* **2007**, *28* (11), 870–875. <https://doi.org/10.1097/MNM.0b013e3282f1753d>.
- (198) Andrés, A.; Rosés, M.; Ràfols, C.; Bosch, E.; Espinosa, S.; Segarra, V.; Huerta, J. M. Setup and Validation of Shake-Flask Procedures for the Determination of Partition Coefficients (LogD) from Low Drug Amounts. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *76*, 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.05.008>.
- (199) Vegt, E.; Jong, M. de; Wetzels, J. F. M.; Masereeuw, R.; Melis, M.; Oyen, W. J. G.; Gotthardt, M.; Boerman, O. C. Renal Toxicity of Radiolabeled Peptides and Antibody Fragments: Mechanisms, Impact on Radionuclide Therapy, and Strategies for Prevention. *J. Nucl. Med.* **2010**, *51* (7), 1049–1058. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.075101>.
- (200) Schulz, J.; Rohracker, M.; Stiebler, M.; Goldschmidt, J.; Grosser, O. S.; Osterkamp, F.; Pethe, A.; Reineke, U.; Smerling, C.; Amthauer, H. Comparative Evaluation of the Biodistribution Profiles of a Series of Nonpeptidic Neurotensin Receptor-1 Antagonists Reveals a Promising Candidate for Theranostic Applications. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57* (7), 1120–1123. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.170530>.





---

# CHAPITRE 2

## Développement et optimisation d'un radiotraceur TEP antagoniste des récepteurs NTS<sub>1</sub>

---



<b>CHAPITRE 2 - Développement et optimisation d'un radiotracer TEP antagoniste des récepteurs NTS<sub>1</sub></b> .....	<b>- 143 -</b>
<b>I. Introduction</b> .....	<b>- 147 -</b>
<b>I.1. NTS<sub>1</sub> et antagonistes</b> .....	<b>- 147 -</b>
I.1.1. Découverte et développement d'antagonistes des NTS <sub>1</sub> .....	- 147 -
I.1.2. Avantages des petites molécules antagonistes.....	- 148 -
<b>I.2. État de l'art</b> .....	<b>- 149 -</b>
<b>I.3. Importance du choix de l'agent chélatant</b> .....	<b>- 152 -</b>
<b>I.4. Présentation du projet</b> .....	<b>- 155 -</b>
<b>II. Résultats et discussion</b> .....	<b>- 156 -</b>
<b>II.1. Design des molécules</b> .....	<b>- 156 -</b>
II.1.1. Groupement polyamine.....	- 156 -
II.1.2. Choix des agents chélatants .....	- 156 -
II.1.3. Synthèse et caractérisation .....	- 162 -
<b>II.2. Tests <i>in vitro</i></b> .....	<b>- 168 -</b>
II.2.1. Métallation au <sup>nat</sup> Ga.....	- 168 -
II.2.2. Évaluation de la stabilité .....	- 169 -
II.2.3. Détermination des constantes d'inhibition ( <i>K<sub>i</sub></i> ).....	- 170 -
II.2.4. Radiomarquage .....	- 170 -
II.2.5. Mesure du caractère hydrophile (LogD) .....	- 178 -
<b>II.3. Évaluation des propriétés pharmacocinétiques des différents agents d'imagerie</b> .....	<b>- 179 -</b>
<b>III. Conclusion et perspectives</b> .....	<b>- 183 -</b>
<b>Références</b> .....	<b>- 185 -</b>





## I. Introduction

### I.1. NTS<sub>1</sub> et antagonistes

De par leur implication dans de nombreux cancers, la neurotensine et ses récepteurs ont fait l'objet de très nombreuses études ces dernières années. La majorité d'entre elles relatent le développement et l'évaluation d'analogues peptidiques de la neurotensine, agonistes des NTS<sub>1</sub>.<sup>1</sup> Ces peptides ont été utilisés pour l'imagerie ou la thérapie de divers cancers.<sup>2-8</sup>

Malgré de nombreux avantages, tels que de très bonnes affinité et spécificité pour les NTS<sub>1</sub> ainsi que de bonnes accumulations tumorales et une rapide clairance des tissus sains, les peptides présentent tout de même quelques limitations.<sup>9-12</sup> Ils sont rapidement dégradés par les enzymes *in vivo*, ce qui leur confère des temps de demi-vie relativement courts, même après optimisation de leur structure.<sup>13,14</sup> De plus, ils présentent, en général, une accumulation importante au niveau des reins, ce qui peut poser des problèmes de toxicité. En effet, dans le cadre des thérapies à base de peptides radiomarqués (*peptide receptor radionuclide therapy*, PRRT), les reins sont souvent les organes limitant la dose injectée.<sup>15,16,17</sup> En imagerie, au vu des faibles quantités administrées, cette toxicité est négligeable mais le signal important au niveau des reins peut empêcher la détection de maladies situées dans les organes environnants. Enfin, du fait de leur activité agoniste, les peptides peuvent induire des effets secondaires par activation de leurs voies de signalisation, même si ceci reste limité aux doses utilisées pour l'imagerie.

#### I.1.1. Découverte et développement d'antagonistes des NTS<sub>1</sub>

Plusieurs molécules non peptidiques ont permis la découverte des récepteurs à la neurotensine et la compréhension des voies de signalisation associées. Parmi elles, on compte principalement le SR48692, aussi appelé Méclinertant, le SR142948A et la levocabastine (Figure 78).<sup>18</sup>

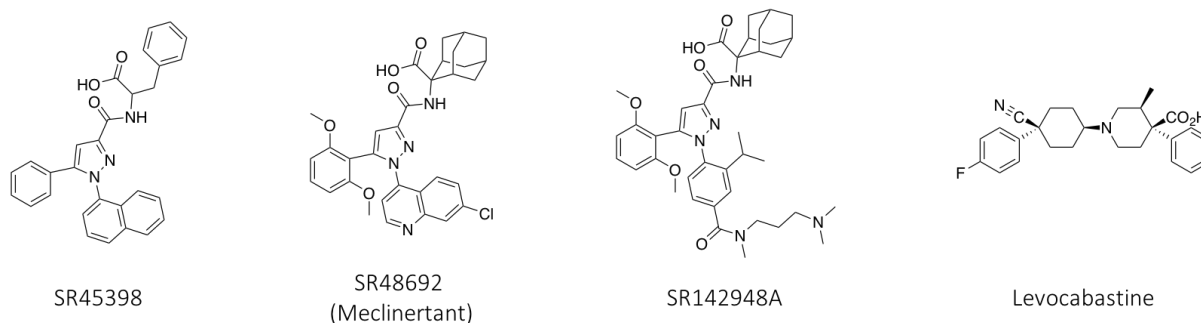


Figure 78. Structures d'antagonistes connus des NTS<sub>1</sub>.

Au début des années 90, Sanofi-Recherche a lancé une campagne de criblage à haut débit afin d'identifier des molécules permettant l'étude du rôle pharmacologique de la neurotensine en neurologie. Ces travaux leur ont permis de découvrir le pyrazole SR45398, possédant une affinité pour les NTS de l'ordre du micromolaire (Figure 78). Après plusieurs modifications structurales (substitution du phényle par un 2,6-diméthoxyphényle, remplacement de la phénylalanine par un dérivé adamantyle, optimisation du substituant naphthyle), Sanofi a donné naissance au SR48692, aussi appelé Méclinertant, le premier antagoniste non peptidique des NTS.<sup>19-21</sup> Cette molécule présente une meilleure affinité pour NTS<sub>1</sub> ( $K_i = 12$  nM) que pour NTS<sub>2</sub> ( $K_i = 200$  nM).<sup>19</sup> En augmentant les concentrations, elle peut aussi se lier aux NTS<sub>3</sub>.<sup>22,23</sup> La découverte de cette molécule a permis de révéler l'implication de la neurotensine et de ses récepteurs dans différents phénomènes.<sup>24</sup> En effet, l'utilisation de l'antagoniste SR48692 a mis en évidence des changements de comportement induits par la neurotensine et des modifications dans la transmission dopaminergique.<sup>25</sup> Enfin, plusieurs études ont montré que le SR48692 inhibe efficacement, chez l'animal, la prolifération tumorale dans plusieurs cancers tels que les cancers du côlon,<sup>26,27</sup> de la prostate,<sup>28,29</sup> de la tête,<sup>30</sup> du pancréas,<sup>31,32</sup> et du poumon à petites cellules.<sup>33</sup> Le Méclinertant a fait l'objet d'un essai clinique pour le traitement du cancer du poumon à petites cellules.<sup>34</sup> Les résultats de l'étude n'ont pas été publiés.

Sanofi a ensuite décrit un nouvel antagoniste, de seconde génération, appelé SR142948A.<sup>35</sup> Cette molécule se lie aux NTS<sub>1</sub> et NTS<sub>2</sub> avec d'excellentes affinités ( $K_i = 0.28$  nM), similaires à la neurotensine.<sup>35,36</sup> Contrairement au SR48692, le SR142948A inhibe l'hypothermie et les effets antinociceptifs de la neurotensine.<sup>35</sup> Cette molécule est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et a permis de mieux comprendre le rôle et les mécanismes d'action de la neurotensine au niveau neurologique,<sup>37-39</sup> cardiovasculaire<sup>40</sup> et dans les pathologies associées.

Présentant de bonnes affinités pour les NTS, ces molécules antagonistes constituent un bon point de départ pour le développement d'agents pharmaceutiques dans des domaines tels que les pathologies neurologiques, l'obésité, la douleur ou l'oncologie.<sup>41</sup>

### I.1.2. Avantages des petites molécules antagonistes

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, l'utilisation d'agonistes comme radiotraceurs a longtemps semblé avantageuse car ceux-ci montrent souvent une internalisation dans les cellules par endocytose et donc un temps de séjour plus long, ce qui peut être favorable pour l'imagerie et la thérapie. Cependant, de plus en plus d'études montrent que, malgré une affinité pour les récepteurs parfois inférieure, la rétention tumorale des antagonistes peut être meilleure. Il semblerait que certains antagonistes possèdent plus de sites de liaison à la surface des cellules que leur équivalent agoniste. Ils peuvent parfois se lier au récepteur indépendamment de son état d'activation.<sup>42-44</sup> Ainsi, une étude réalisée par

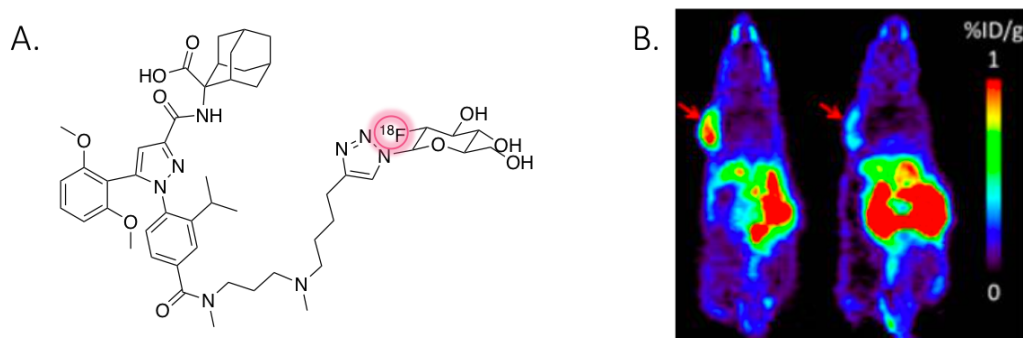
Betancur en 1998 a montré que le nombre de récepteurs marqués par l'antagoniste [<sup>3</sup>H]SR142948A, sur des membranes cellulaires issues d'homogénats de cerveau de rat, était 80% plus élevé que le nombre détecté lors de l'utilisation de l'agoniste [<sup>3</sup>H]neurotensine.<sup>36</sup>

L'utilisation de petites molécules antagonistes comme vecteurs présente de nombreux avantages. Tout d'abord, leur petite taille permet une bonne pénétration dans les tumeurs et une clairance rapide des tissus sains et du sang par excrétion rénale. Elles présentent souvent une meilleure stabilité métabolique que les peptides.<sup>45,46</sup> Enfin, l'absence d'activation des voies de signalisation permet de réduire les effets pharmacologiques et les effets indésirables pouvant y être liés.

## I.2. État de l'art

En se basant sur la structure du SR142948A, quelques équipes ont développé des radiotraceurs pour le diagnostic ou la thérapie de cancers.

En 2013, Lang *et al.* sont les premiers à synthétiser un analogue du SR142948A sur lequel un groupement 2-déoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluoroglucosylazide est greffé par réaction de chimie *click* (Figure 79A).<sup>45</sup> Ce radiotracer TEP a montré une très bonne affinité pour les NTS<sub>1</sub> ( $K_i = 0.98$  nM). Cependant, malgré une assez bonne accumulation tumorale (0.74%ID/g) à 1 h après l'injection, une accumulation importante est aussi observée dans le foie (Figure 79B).

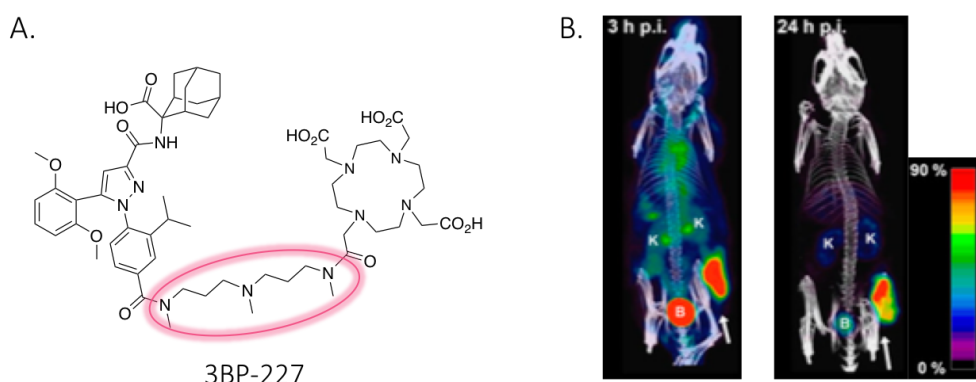


**Figure 79.** A. Structure du composé [<sup>18</sup>F]8 ; B. Images obtenues par TEP d'une souris présentant une xénogreffe de tumeur colorectale (HT-29) entre 45 et 65 min après l'injection du composé [<sup>18</sup>F]8 sans (gauche) ou avec *blocking* (droite). Les tumeurs sont désignées avec une flèche rouge ; figure adaptée d'article.<sup>45</sup>

En 2016, Schulz *et al.* ont publié trois composés analogues du SR142948A sur lesquels ils ont introduit un agent chélatant DOTA afin de radiomarquer les composés à l'indium-111 pour l'imagerie TEMP.<sup>47</sup>

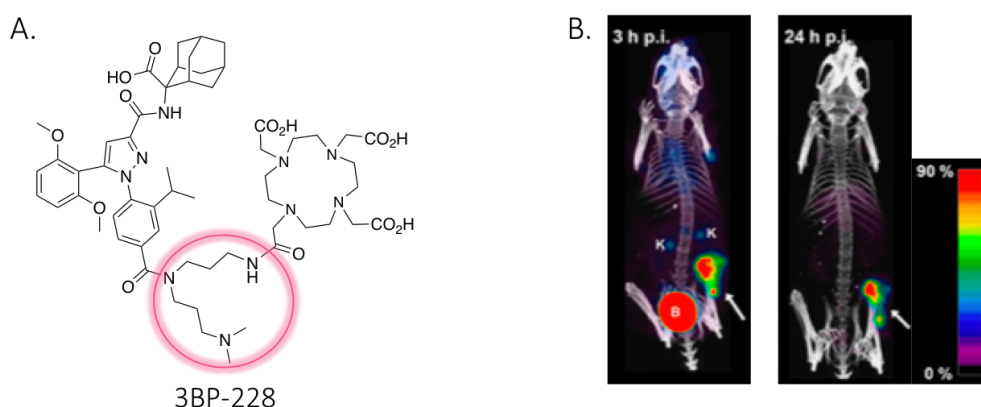
Le composé [<sup>111</sup>In]In-3BP-227 contient un bras amine linéaire à l'extrémité duquel le DOTA a été introduit (Figure 80A). Ce radiotracer possède une bonne affinité pour les NTS<sub>1</sub> ( $K_i = 5.3$  nM). Il montre une très bonne accumulation tumorale à des temps courts ( $7.5 \pm 2.9\%$ ID/g, 3 h p.i.) et à des temps plus longs ( $2.3 \pm 1.3\%$ ID/g, 24 h p.i.). En revanche, on remarque qu'à 3 h

p.i. le signal circulant est encore très élevé tandis que d'excellents contrastes sont observés à 24 h p.i. (Figure 80B).



**Figure 80.** A. Structure du composé 3BP-227 ; B. Images obtenues par TEMP-CT d'une souris présentant une xéno greffe de tumeur colorectale (HT-29) à 3 h (gauche) et 24 h (droite) après l'injection du composé [<sup>111</sup>In]In-3BP-227. Les tumeurs sont désignées avec une flèche blanche ; figure adaptée d'article.<sup>47</sup>

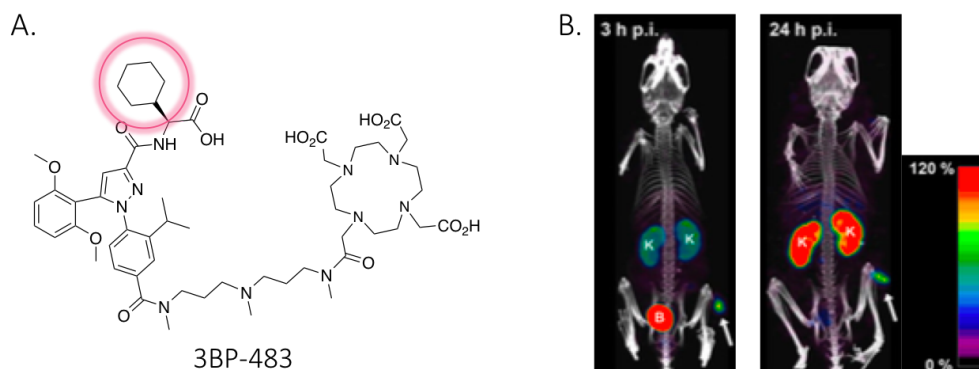
Le deuxième composé [<sup>111</sup>In]In-3BP-228 présente un bras amine ramifié (Figure 81A). Lui aussi présente une bonne affinité pour les NTS<sub>1</sub> ( $K_i = 14.4$  nM), toutefois, le changement apporté au bras amine modifie significativement la biodistribution du composé. En effet, le composé [<sup>111</sup>In]In-3BP-228 montre une très bonne accumulation tumorale à des temps courts ( $10.2 \pm 5.3\%$ ID/g, 3 h p.i.) mais beaucoup moins élevée à des temps plus longs ( $0.8 \pm 0.2\%$ ID/g, 24 h p.i.). De plus, dès 3 h p.i., les contrastes sont excellents avec un signal circulant beaucoup moins présent (Figure 81B). La clairance est donc largement accélérée par l'introduction du bras amine ramifié.



**Figure 81.** A. Structure du composé 3BP-228 ; B. Images obtenues par TEMP-CT d'une souris présentant une xéno greffe de tumeur colorectale (HT-29) à 3 h (gauche) et 24 h (droite) après l'injection du composé [<sup>111</sup>In]In-3BP-228. Les tumeurs sont désignées avec une flèche blanche ; figure adaptée d'article.<sup>47</sup>

Le troisième composé, [<sup>111</sup>In]In-3BP-483, possède un cyclohexane à la place de l'adamantane (Figure 82A). Cette modification engendre une perte d'affinité pour les NTS<sub>1</sub> et conduit à une faible accumulation tumorale ( $1.9 \pm 0.8\%$ ID/g, 3 h p.i. et  $0.8 \pm 0.6\%$ ID/g, 24 h p.i.). Comme

pour le composé 3BP-228, le signal circulant est très faible dès 3 h ce qui conduit à de très bons contrastes. En revanche, l'accumulation rénale est plus importante (Figure 82B).



**Figure 82.** A. Structure du composé 3BP-483 ; B. Images obtenues par TEMP-CT d'une souris présentant une xélogreffe de tumeur colorectale (HT-29) à 3 h (gauche) et 24 h (droite) après l'injection du composé [<sup>111</sup>In]In-3BP-483. Les tumeurs sont désignées avec une flèche blanche ; figure adaptée d'article.<sup>47</sup>

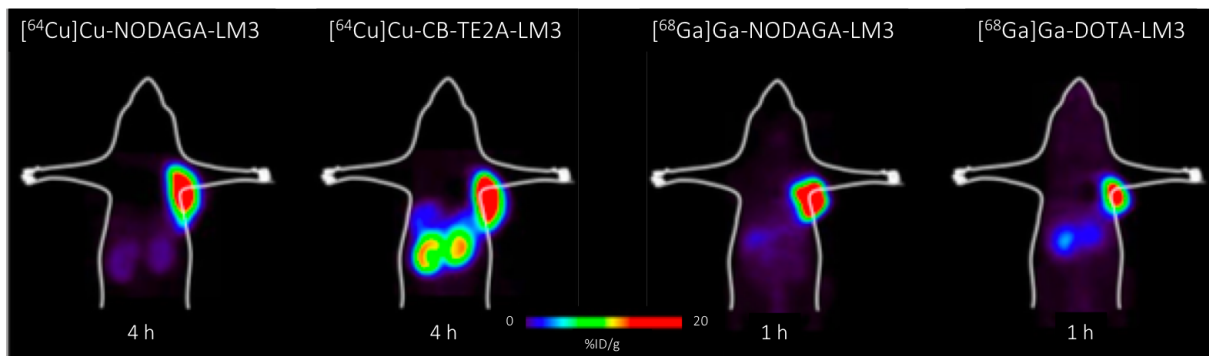
Compte tenu de ses propriétés pharmacocinétiques (bonne accumulation et rétention tumorale), le composé 3BP-227 a été considéré comme un candidat intéressant pour la radiothérapie de cancers exprimant NTS<sub>1</sub>. En 2017, Schulz *et al.* ont évalué le composé [<sup>177</sup>Lu]Lu-3BP-227 sur un modèle de cancer du côlon (HT-29).<sup>46</sup> Ce composé a montré une excellente accumulation tumorale à 3 h p.i. ( $19.0 \pm 3.6\%ID/g$ ), toujours très élevée à 69 h p.i. ( $2.7 \pm 1.6\%ID/g$ ) et du signal encore présent 93 h après l'injection. L'administration de hautes activités (110 et 165 MBq par animal) a permis de réduire le volume des tumeurs de 55% et 88% respectivement sans causer de dommage rénal.

Ces résultats prometteurs ont permis à Baum *et al.* de démarrer en 2018 un essai clinique utilisant le composé 3BP-227. Dans cette étude, [<sup>177</sup>Lu]Lu-3BP-227 (aussi appelé [<sup>177</sup>Lu]Lu-IPN01087) est utilisé pour la radiothérapie de cancers exprimant les NTS<sub>1</sub> (cancer du pancréas, cancer colorectal, cancers gastriques, carcinome épidermoïde de la tête et du cou, cancer des os).<sup>48</sup> Les premiers résultats obtenus pour le traitement de l'adénocarcinome pancréatique métastatique ont été publiés en 2018.<sup>49</sup> Parmi les six patients ayant reçu le [<sup>177</sup>Lu]Lu-3BP-227, cinq ont montré une bonne accumulation tumorale du traceur. Le [<sup>177</sup>Lu]Lu-3BP-227 a été bien toléré par les patients, présentant peu d'effets secondaires, les reins étant les organes limitant la dose injectée. Un patient présentant un très mauvais pronostic a montré une rémission partielle définie par une amélioration des symptômes et de la qualité de vie ainsi qu'une prolongation de la durée de vie de 11 mois après la première injection de [<sup>177</sup>Lu]Lu-3BP-227. Ces résultats démontrent la faisabilité du traitement du PDAC grâce au [<sup>177</sup>Lu]Lu-3BP-227.

### I.3. Importance du choix de l'agent chélatant

De nombreux paramètres influencent les propriétés pharmacocinétiques d'un traceur. Parmi eux, l'agent chélatant introduit sur la molécule vectrice peut modifier la charge, le caractère hydrophile, ou encore la conformation de la molécule. Ceci peut influencer les interactions spécifiques (affinité, spécificité, internalisation) et les interactions non ciblées (liaison aux protéines sanguines, interaction avec d'autres récepteurs...), entraînant une modification des profils de biodistribution.

En 2011, Fani *et al.* ont déclaré "*the chelate makes the difference*".<sup>50</sup> Dans leur étude, ils ont évalué différents radiotraceurs peptidiques, antagonistes des récepteurs à la somatostatine, marqués au cuivre-64 ou au gallium-68 en utilisant le TE2A, le NODAGA ou le DOTA comme agent chélatant. L'affinité pour les récepteurs ainsi que les profils de biodistribution se sont avérés être grandement dépendants du chélateur et du radionucléide utilisés (Figure 83).

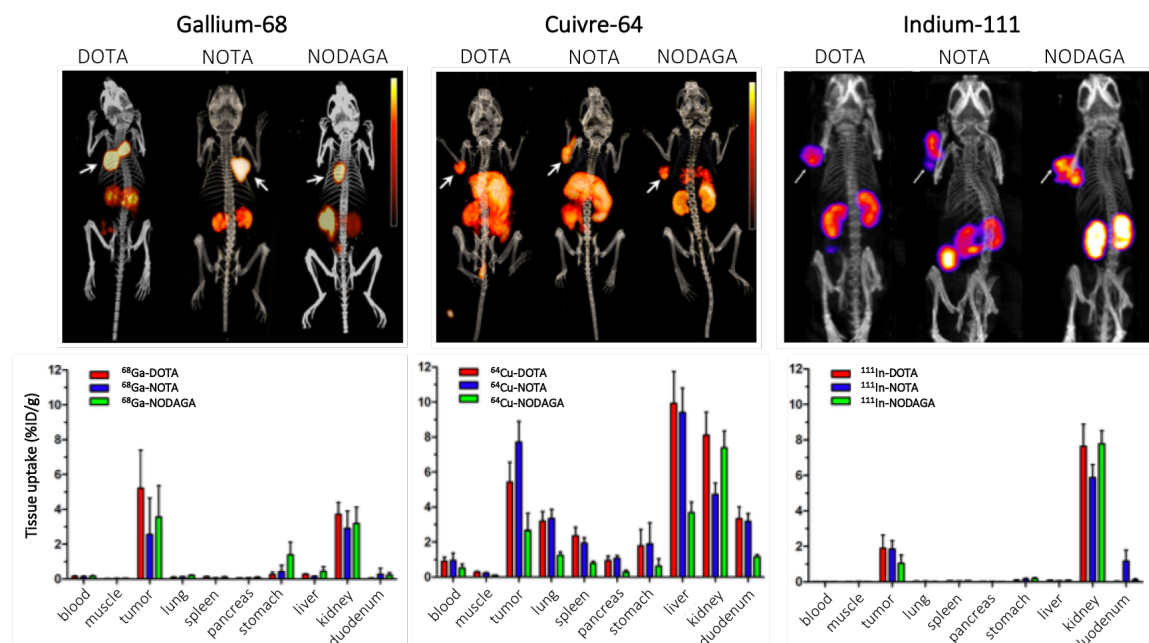


**Figure 83.** Images obtenues par TEP de souris présentant une xénogreffe de cellules embryonnaires rénales humaines (HEK) à 1 h ou 4 h après l'injection des différents composés ; figure adaptée d'article.<sup>50</sup>

Depuis cette étude, de nombreuses équipes ont confirmé l'impact de l'agent chélatant, du radionucléide et de la charge totale de la molécule sur les propriétés pharmacocinétiques d'un radiotracer.

Roosenburg *et al.* ont ainsi évalué l'importance du chélateur et du radionucléide en introduisant trois agents chélatants différents (DOTA, NOTA et NODAGA) sur un analogue peptidique de la minigastrine pour le radiomarquage avec du gallium-68, du cuivre-64 et de l'indium-111.<sup>51</sup> Les affinités pour les récepteurs n'ont pas été significativement affectées, cependant, les profils de biodistribution ont été nettement impactés (Figure 84). Le changement de radionucléide a engendré des modifications importantes, particulièrement pour le cuivre. En effet, pour ce dernier, une part importante de l'activité a été observée dans les tissus sains. La nature du radionucléide semble aussi impacter l'accumulation tumorale. En revanche, dans cette étude, le choix du chélateur n'a pas montré d'influence significative sur les propriétés pharmacocinétiques.





**Figure 84.** Images obtenues par TEP/CT (gauche et milieu) ou TEMP/CT (droite) de souris présentant une xénogreffe A431-CCK2R à 1 h (gauche) ou 4 h (milieu et droite) après l'injection des différents composés ; figure adaptée d'article.<sup>51</sup>

Lin *et al.* ont étudié l'impact de la charge sur les profils de biodistribution en comparant différents chélateurs comportant un nombre variable de groupements acides carboxyliques.<sup>52</sup> Pour cela, ils ont introduit différents dérivés de NOTA sur un peptide analogue de la somatostatine. Dans leur étude, l'augmentation du nombre d'acides carboxyliques s'est accompagnée d'une diminution significative de l'affinité et de l'accumulation tumorale.

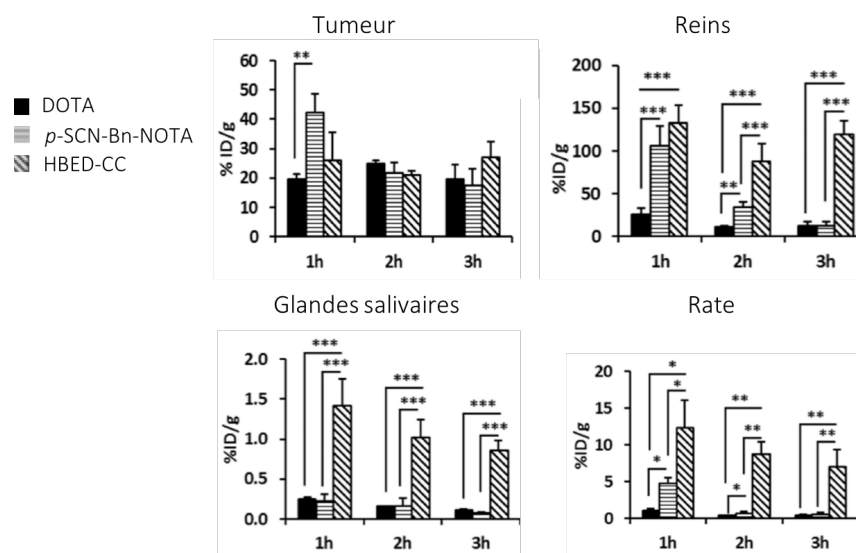
Varasteh *et al.* ont introduit quatre agents chélatants différents (NOTA, NODAGA, DOTA et DOTAGA) sur un analogue peptidique de la bombésine.<sup>53</sup> Les composés ont ensuite été marqués au gallium-68 et évalués *in vitro* et *in vivo*. À nouveau, cette étude a mis en évidence l'impact du chélateur sur les affinités et les propriétés pharmacocinétiques. Comme on peut le voir sur la Figure 85, les ratios tumeur/organe diffèrent énormément. Dans cette étude, l'introduction du NOTA (présentant une charge positive une fois le gallium complexé) a montré les meilleurs résultats.

Tumor/organ	NOTA	NODAGA	DOTA	DOTAGA
Blood	25 ± 3	22 ± 7	14 ± 6	5.5 ± 1.4
Lung	32 ± 4	15 ± 6	8 ± 1	8 ± 1
Liver	5 ± 1	4.4 ± 1.4	5.4 ± 1.8	4 ± 1
Spleen	5 ± 1	4.3 ± 1.6	5 ± 2	4 ± 2
Pancreas	3 ± 1	3.7 ± 2.2	2.7 ± 0.7	5.7 ± 0.7
Stomach	4 ± 1	4 ± 1	3.1 ± 0.6	5.6 ± 0.3
Small int.	9 ± 2	8 ± 2	5 ± 1	9 ± 1
Kidney	3 ± 1	1.5 ± 0.4	1.8 ± 0.2	1.1 ± 0.1
Muscle	157 ± 23	102 ± 23	61 ± 10	22 ± 3
Bone	39 ± 4	33 ± 4	23 ± 4	10 ± 2

**Figure 85.** Ratio tumeur/organe 2 h après l'injection des différents composés marqués au gallium-68 à des souris portant une xénogreffe du cancer de la prostate (PC-3) ; figure adaptée d'article.<sup>53</sup>

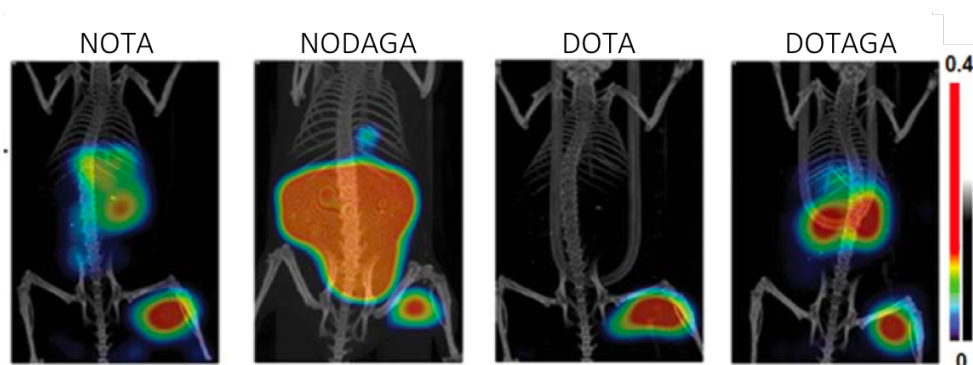


Dans une autre étude, Banerjee *et al.* ont évalué l'influence de l'agent chélatant sur la biodistribution d'un radiotracer ciblant le PSMA.<sup>54</sup> Pour cela, ils ont comparé les composés contenant un DOTA, un *p*-SCN-Bn-NOTA et un chélateur acyclique, HBED-CC, après marquage au gallium-68. Des différences importantes ont été observées au niveau de l'accumulation dans les tissus sains tels que les reins, les glandes salivaires ou la rate, contrairement à l'accumulation tumorale (Figure 86).



**Figure 86.** Comparaison des accumulations dans certains tissus après l'injection des différents composés marqués au gallium-68 à des souris portant une xénogreffe de tumeur de la prostate (PC-3 PIP) ; figure adaptée d'article.<sup>54</sup>

Mitran *et al.* ont également étudié l'impact de la charge du complexe sur le profil de biodistribution de radiotraceurs en introduisant différents agents chélatants (NOTA, NODAGA, DOTA et DOTAGA) sur des peptides ciblant les GRPR, marqués à l'indium-111 ou au cobalt-55.<sup>55,56</sup> Ces études ont montré que plus les complexes sont chargés négativement (DOTAGA) plus l'accumulation rénale est importante et longue (Figure 87). Plus les molécules sont chargées positivement (NOTA), plus l'accumulation hépatique augmente. Enfin, parmi les composés testés, il semblerait que les charges positives ou neutres améliorent l'accumulation tumorale.



**Figure 87.** Images obtenues par TEMP/CT de souris portant une xénogreffe de cancer de la prostate (PC-3) 4 h après l'injection des différents composés marqués à l'indium-111 ; figure extraite d'article.<sup>56</sup>

Enfin, Tolmachev et ses collaborateurs ont aussi évalué l'importance de l'agent chélatant et de la charge du complexe sur la biodistribution d'Affibodies en évaluant différents chélateurs tels que le DOTA, le DOTAGA, le NODAGA et le NOTA marqués au gallium-68 ou à l'indium-111.<sup>57-63</sup> À nouveau, d'après ces travaux, il semblerait que les charges neutres et négatives diminuent le signal dans le foie. En revanche, il ne semble pas y avoir de corrélation entre la bonne accumulation tumorale, la rapide clairance du sang et des organes sains et la charge des molécules ou chélateurs utilisés, même si le NODAGA a montré à plusieurs reprises une clairance sanguine rapide.<sup>59,61-63</sup>

Cet impact du chélateur et du radionucléide a aussi été observé sur des molécules de poids moléculaire plus important telles que des anticorps entiers<sup>64</sup> ou des fragments d'anticorps.<sup>65</sup>

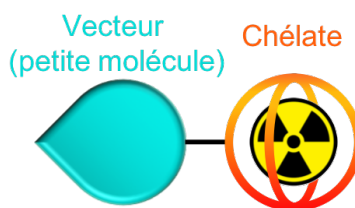
Pour résumer, toutes ces études démontrent l'importance que peuvent avoir l'agent chélatant, le radionucléide et la charge globale de la molécule sur les propriétés pharmacocinétiques d'un composé.

Pour l'imagerie TEP, le gallium-68 présente habituellement de meilleures propriétés que le cuivre-64 avec une meilleure stabilité des complexes *in vivo* et donc de meilleurs profils de biodistribution. En revanche, ces études montrent qu'aucune corrélation ne peut être faite entre la charge globale de la molécule et le profil de biodistribution. Cela va dépendre du récepteur et du type de molécule évaluée. Aucun agent chélatant ne semble être idéal et convenir à chaque application, c'est pourquoi l'étude de différents chélateurs pour chaque nouveau composé est préconisée.

## I.4. Présentation du projet

Au vu des résultats obtenus pour la radiothérapie de tumeurs exprimant NTS<sub>1</sub>, il nous a semblé intéressant de développer un compagnon diagnostique TEP qui permettrait de diagnostiquer les patients et faciliterait la sélection des patients éligibles pour la radiothérapie ciblant NTS<sub>1</sub>. La combinaison des avantages des petites molécules et ceux des molécules antagonistes font du SR142948A un vecteur intéressant pour l'imagerie des NTS<sub>1</sub>.

L'objectif de ce projet a été de développer, optimiser et évaluer un radiotracer permettant l'imagerie TEP de tumeurs exprimant NTS<sub>1</sub>. Nous avons choisi d'introduire différents agents chélatants complexant le gallium-68 sur une petite molécule antagoniste en se basant sur la structure du SR142948A, afin d'identifier un radiotracer présentant un profil de biodistribution idéal (Figure 88).



**Figure 88.** Représentation schématique de la structure des composés étudiés.

Les différents composés ont été synthétisés puis évalués *in vitro*, radiomarqués au gallium-68 et testés *in vivo* sur des souris xénogreffées avec un modèle de tumeur colorectale humaine (HT-29) afin d'évaluer l'influence de l'agent chélatant sur les propriétés pharmacocinétiques.

## II. Résultats et discussion

### II.1. Design des molécules

#### II.1.1. Groupement polyamine

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les composés développés par Schulz *et al.* ont montré des propriétés pharmacocinétiques intéressantes. Les composés 3BP-227 et 3BP-228 diffèrent de par leur groupement polyamine (linéaire ou ramifié), induisant des différences de biodistribution importantes (Figure 80 et 81). En effet, la bonne accumulation tumorale et le long temps de rétention dans la tumeur de 3BP-227 en font un bon agent pour la radiothérapie au lutécium-177. En revanche, le composé [<sup>111</sup>In]In-3BP-228 a montré une très bonne accumulation tumorale et une clairance rapide des tissus sains conduisant à de très bons contrastes et ratios tumeur/organe à des temps courts après l'injection du composé. Notre objectif étant ici de faire de l'imagerie TEP, il nous a semblé intéressant de baser la structure de nos composés sur celle du 3BP-228, possédant un groupement polyamine ramifié.

#### II.1.2. Choix des agents chélatants

Le gallium-68 est un radionucléide dédié à l'imagerie TEP qui présente de nombreux avantages. Parmi eux, le temps de demi-vie court, la disponibilité ainsi que la bonne stabilité des complexes formés *in vivo* nous semblent les plus importants.

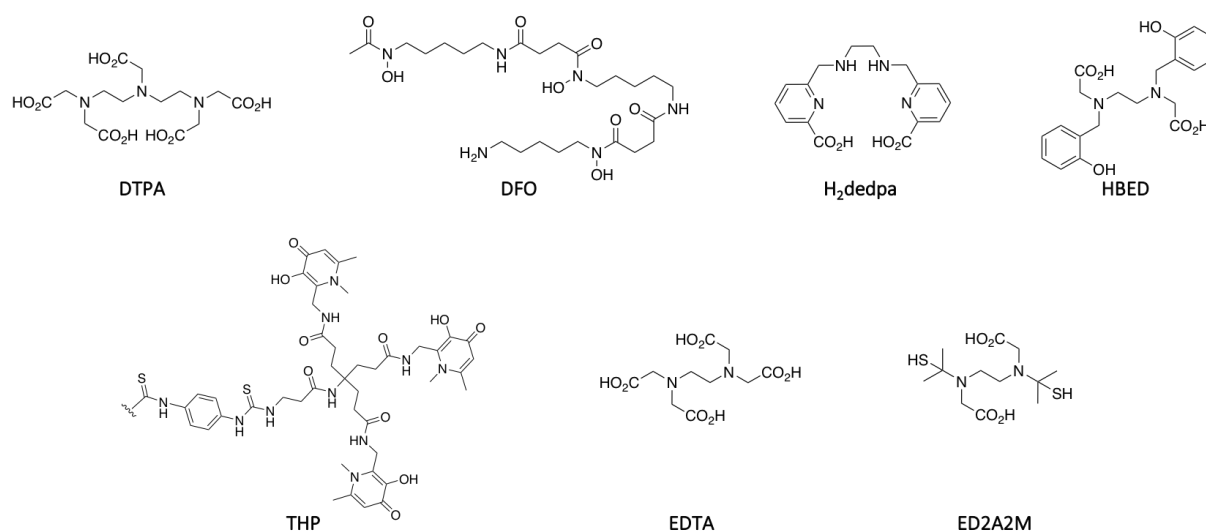
Le gallium (III) possède des propriétés voisines de celles du fer (III), très présent *in vivo*. En effet, ces deux ions métalliques privilégient une hexacoordination, et donc, certaines métalloprotéines qui chélatent normalement le fer *in vivo* peuvent complexer le gallium. Ainsi, le Ga(III) présente une forte affinité pour la transferrine, c'est pourquoi il est important

d'utiliser des bons chélateurs. La transcomplexation du gallium par la transferrine entraînerait une perte de spécificité et une accumulation de gallium dans le foie, les poumons et les os.<sup>66</sup>

De nombreux agents chélatants sont disponibles pour la complexation du gallium-68 (Tableau 7, Figures 12 et 13).<sup>67-69</sup>

Il existe deux types d'agents chélatants : les acycliques (Figure 89) et les cycliques (Figure 90), chacun ayant des propriétés de complexation différentes.

Les chélateurs acycliques présentent des cinétiques de complexation plus favorables dans des conditions douces (température ambiante, temps courts). Ceci est important lorsque l'on travaille avec des molécules sensibles ou avec des radionucléides possédant une demi-vie courte. En revanche, la stabilité des complexes est généralement moins bonne *in vivo*.<sup>66</sup>



**Figure 89.** Exemples d'agents chélatants acycliques utilisés pour la complexation du gallium-68.

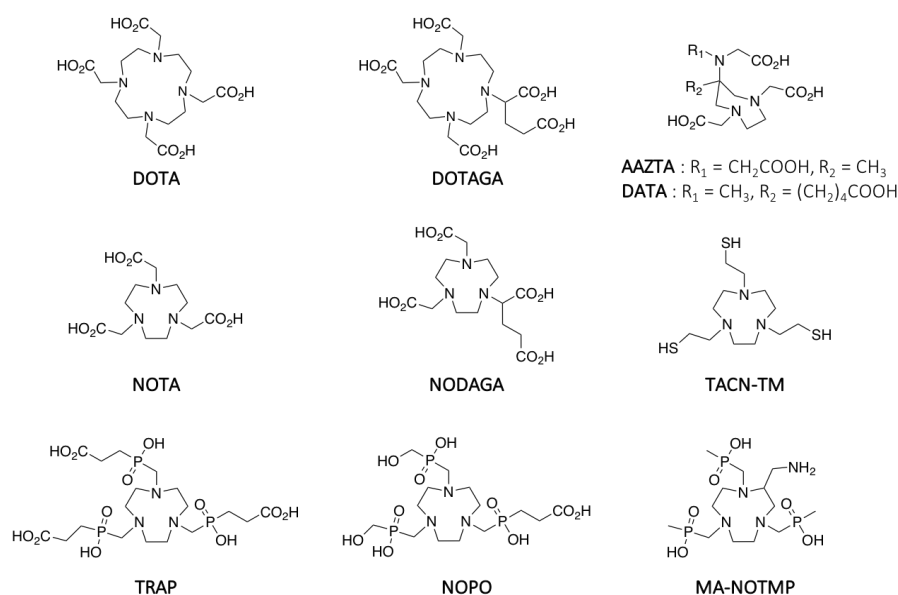
Parmi eux, on retrouve :

- DTPA : ce chélateur linéaire est l'un des plus utilisés en radiochimie car il permet la chélation de nombreux radiométaux tels que le <sup>64</sup>Cu, le <sup>67/68</sup>Ga, le <sup>44/47</sup>Sc, l'<sup>111</sup>In ou le <sup>177</sup>Lu dans des conditions douces. Toutefois, il n'est pas idéal pour le gallium car son nombre de coordination est 8, et la constante de complexation est seulement de 24.3 (Tableau 7).
- DFO (desferrioxamine B) : la DFO est un excellent chélateur pour le fer (III), présentant une bonne constante de stabilité avec le gallium (28.6). Le radiomarquage en conditions douces est possible mais réclame un temps assez long, qui est peu compatible avec la courte demi-vie du gallium-68.
- H<sub>2</sub>dedpa : la structure de ce chélateur est basée sur un squelette éthylènediamine fonctionnalisé avec deux cycles pyridines. Des groupements carboxyles sur les cycles pyridine viennent compléter la sphère de coordination du Ga (III). La constante de

stabilité du complexe est élevée (28.1) et le radiomarquage se fait en conditions douces (Tableau 7).

- HBED : cet agent chélatant est basé sur la structure de l'EDTA, dans lequel deux groupements acétates ont été substitués par des phénols. La constante de stabilité du complexe avec le Ga(III) est très élevée (38.5) et sa structure permet des conditions douces de radiomarquage et une bonne stabilité *in vivo* (Tableau 7).
- THP : ce ligand est constitué de trois groupements hydroxypyridinones permettant une bonne complexation du fer (III) ou du gallium (III). Il permet de très bons radiomarquages dans des conditions douces. De plus, les complexes formés sont stables (Tableau 7).<sup>70</sup>

Les agents chélatants cycliques, plus rigides, présentent une cinétique de chélation plus lente nécessitant donc de plus longues durées de complexation ou des conditions plus difficiles (températures élevées), peu compatibles avec les biomolécules.<sup>66</sup> Pourtant, les chélateurs cycliques sont beaucoup plus utilisés car ils sont compatibles avec de nombreux métaux et les complexes formés sont souvent plus stables du fait de la rigidité des complexes formés. La préorganisation des fonctions chélatantes dans l'espace permet d'abaisser le coût entropique nécessaire à la coordination du métal. On parle d'effet macrocyclique. La réorganisation conformationnelle est plus importante dans le cas d'un agent chélatant acyclique.<sup>71</sup>



**Figure 90.** Exemples d'agents chélatants cycliques utilisés pour la complexation du gallium-68.

De nombreux agents chélatants macrocycliques sont utilisés pour complexer le gallium :

- DOTA : sa structure est basée sur celle du cyclène. C'est le chélateur le plus utilisé en radiochimie car il est capable de chélater de nombreux métaux tels que <sup>68</sup>Ga, <sup>111</sup>In, <sup>177</sup>Lu, <sup>90</sup>Y et <sup>225</sup>Ac. Le DOTA est très utilisé pour le gallium et le lutécium et pourtant ce n'est pas le chélateur idéal. La constante de stabilité du complexe de Ga (III) est

relativement faible. Elle a d'abord été évaluée à 21.3 puis révisée à 26.1.<sup>72,73</sup> Pour obtenir de bons rendements de radiomarquage, il est nécessaire de chauffer le mélange réactionnel ce qui le rend incompatible avec des molécules sensibles (Tableau 7).<sup>74</sup> En revanche la stabilité du complexe *in vivo* est assez bonne.

- DOTAGA : ce macrocycle a une structure similaire au DOTA mais il présente un groupement acétate supplémentaire. La complexation du gallium est bonne (26.1) et les conditions de radiomarquage sont similaires à celles du DOTA. Ce chélateur a montré de bons résultats.<sup>75,76</sup>
- NOTA : cet agent chélatant est le « *gold standard* » pour la complexation du gallium. Sa structure est basée sur celle du 1,4,7-triazacyclononane (TACN) et permet d'obtenir une des meilleures constantes de complexation (31.0). En effet, la petite taille de la cavité du NOTA est très adaptée au petit rayon ionique du gallium (III). On remarque que l'expansion du cycle azoté entraîne une diminution de la constante de complexation (31.0 vs 26.1 et 19.7 pour le NOTA, le DOTA et le TETA).<sup>66</sup> Ceci démontre l'importance de la correspondance taille de la cavité/rayon ionique dans la stabilité thermodynamique des complexes formés. En raison de ces bonnes propriétés, de bons radiomarquages sont obtenus dans des conditions relativement douces et la stabilité des complexes *in vivo* est très bonne (Tableau 7).<sup>77</sup>
- NODAGA : lorsque le NOTA est bioconjugué, l'un des bras carboxylates n'est plus disponible pour la coordination. Afin de compléter la sphère de coordination du gallium, des composés tels que le NODAGA ont été développés. Il possède la même structure que le NOTA mais avec un groupe carboxylate supplémentaire.<sup>78,79</sup> Les cinétiques de complexation sont similaires au NOTA et les complexes formés sont très stables *in vivo*. Cependant, la charge du complexe formé sera différente de celle avec le NOTA, ce qui peut avoir des conséquences importantes sur la biodistribution.
- TRAP/NOPO/MA-NOTMP : la modification du NOTA, en introduisant des groupements acides phosphiniques, a permis de développer des composés tels que le TRAP ou le NOPO.<sup>80</sup> Les constantes de complexation de ces ligands sont assez bonnes, cependant, des températures élevées sont nécessaires pour obtenir de bons rendements de radiomarquage. Ces chélateurs permettent néanmoins des radiomarquages à pH très acides. Une version bifonctionnelle (MA-NOTMP) a été développée et permet un radiomarquage dans des conditions assez douces, compatibles avec les biomolécules.<sup>81</sup>
- DATA/AAZTA : ces composés bifonctionnels, hybrides, sont constitués d'une partie cyclique et d'une partie acyclique. Les radiomarquages se font en conditions douces et les complexes formés sont stables dans le sérum. Encore assez peu utilisés, ces chélateurs semblent assez prometteurs.

Les groupements thiols semblent être aussi de bons ligands pour la chélation du gallium (III). En effet, si l'on compare les constantes de complexation du NOTA (34.0) et du TACN-TM (34.2) (Figure 90), on remarque que l'agent chélatant contenant les thiols tend à montrer une

stabilité plus élevée. Cette tendance s'observe aussi pour des chélateurs acycliques tels que l'EDTA (22) et l'ED2A2M (31.6). De même, les complexes contenant des groupements phénols, comme dans le cas de HBED, montrent une stabilité très élevée (38.5). Cependant, malgré ces constantes élevées, peu de systèmes utilisent les thiols ou phénols comme ligands de coordination pour le gallium. Ceci est probablement dû à la plus faible acidité de ces fonctions comparées aux acides carboxyliques, ce qui ralentit la cinétique de coordination dans les conditions de radiomarquages acides requises pour empêcher la formation de l'hydroxyde Ga(OH)<sub>3</sub>, insoluble (pH 3.5-4).<sup>66</sup>

**Tableau 7.** Propriétés d'une sélection de chélateurs adaptés à la complexation du gallium-68 ; tableau adapté de revues.<sup>67,68</sup>

Agents chélatants	Constantes de complexation	Coordination	Conditions de radiomarquage
DTPA	24.3	N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	25°C, 30 min, pH 3.5
DFO	28.6	O <sub>6</sub>	25°C, 30 min, pH 3.5
H <sub>2</sub> dedpa	28.1	N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	25°C, 5-10 min, pH 4.5
HBED	38.5	N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	25°C, 10-20 min, pH 4-4.5
THP	-	O <sub>6</sub>	25°C, 5 min, pH 6.5
DOTA/DOTAGA	26.1	N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	37-90°C, 10-30 min, pH 4.0-5.5
NOTA/NODAGA	31.0	N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	25°C, 30-60 min, pH 4.0-5.5
TACN-TM	34.2	N <sub>3</sub> S <sub>3</sub>	25°C, 10 min, éthanol
TRAP/NOPO	26.2	N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	95°C, 5 min, pH 3.2
DATA	21.7	N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	25°C, 1-5 min, pH 4-6.8

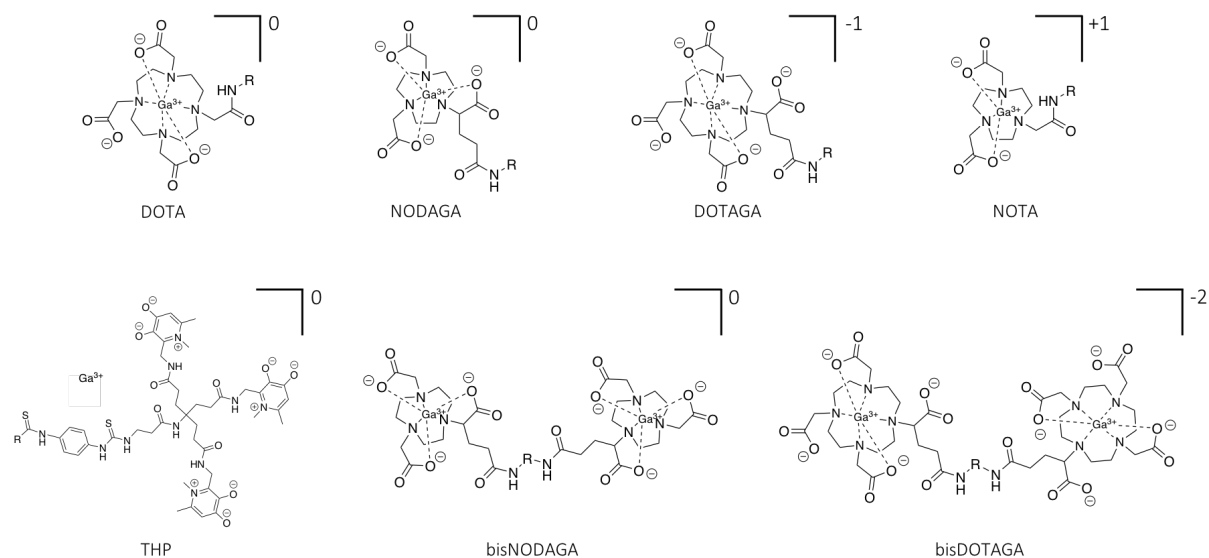
Pour notre étude, nous avons choisi d'introduire le DOTA, le DOTAGA, le NOTA, le (R)-NODAGA et le THP sur notre vecteur (Figure 91). Ces agents chélatants présentent tous de bonnes propriétés de complexation mais des différences de charge et de lipophilie susceptibles d'influencer la pharmacocinétique de l'agent d'imagerie.

Comme nous l'avons vu, le gallium (III) doit être hexacoordiné. L'étude de la complexation du gallium par les différents agents chélatants est importante pour définir la charge du complexe *in vivo*. Le DOTA libre contient quatre atomes d'azote, dont deux sont protonnés à pH physiologique, et quatre groupements acides carboxyliques, déprotonnés à pH physiologique. Lors de la complexation du gallium, quatre sites de coordination du gallium sont remplis par les azotes, deux groupements carboxylates servent à compléter la sphère de coordination, le troisième sert à la bioconjugaison et le quatrième est déprotonné à pH physiologique ce qui confère au complexe Ga<sup>3+</sup>/DOTA conjugué une charge neutre.<sup>82,83</sup> Sur le même principe, le complexe Ga<sup>3+</sup>/NODAGA conjugué aura lui aussi une charge neutre, le complexe Ga<sup>3+</sup>/DOTAGA conjugué aura une charge -1 *in vivo*, de par son groupement carboxylate supplémentaire et le complexe Ga<sup>3+</sup>/NOTA conjugué aura une charge +1, due à son bras carboxylate manquant. Dans le cas du THP, ce sont les fonctions cétones et hydroxyles, sous



forme déprotonnées, des motifs 3,4-hydroxypyridinones qui complexent le gallium. La charge de ce complexe conjugué sera donc neutre (Figure 91).

Roxin *et al.* ont montré que l'introduction d'un DOTA libre sur un radiotracteur marqué au fluor-18 permettait d'améliorer l'accumulation tumorale et accélérer la clairance rénale.<sup>84</sup> En s'inspirant de ces travaux, nous avons donc choisi d'évaluer des composés portant deux agents chélatants NODAGA ou deux DOTAGA. Lors du radiomarquage, plusieurs espèces peuvent être obtenues. Une des possibilités est l'obtention de molécules comportant un Ga<sup>3+</sup> dans chaque agent chélatant. Dans ce cas, le composé bisNODAGA aurait une charge neutre tandis que le composé bisDOTAGA aurait une charge -2. Cependant, il est statistiquement peu probable d'obtenir ce type de molécule. Une autre possibilité est l'obtention de molécules comportant un Ga<sup>3+</sup> dans un agent chélatant et un autre élément dans l'autre chélateur. Les éléments les plus probables sont du germanium, du zinc (II) ou du fer (III). Les deuxièmes chélateurs peuvent aussi être vides mais, du fait de leur bonne capacité à complexer les métaux, il y a de fortes chances qu'ils complexent un métal *in vivo* (le cuivre, principalement Cu<sup>2+</sup>, le zinc, principalement Zn<sup>2+</sup> et le fer). Dans ce cas, le composé bisNODAGA aurait principalement une charge neutre mais pourrait aussi être chargé -1 tandis que le bisDOTAGA aurait principalement une charge -2 mais pourrait aussi posséder une charge -3 (Figure 91).



**Figure 91.** Illustration des complexes Ga<sup>3+</sup>/agent chélatant liés par liaison amide ou thiourée à un composé vecteur, et de leur charge globale à pH physiologique.

Pour cette étude, nous avons donc développé sept composés basés sur la structure de 3BP-228 et contenant différents chélateurs (DOTA, DOTAGA, NOTA, (R)-NODAGA, THP, bisNODAGA et bisDOTAGA). Le composé 3BP-227 a aussi été synthétisé afin de l'utiliser comme référence. Une autre référence utilisée est le peptide agoniste DOTA-NT-20.3 qui a montré de très bons résultats pour la détection de tumeurs exprimant NTS<sub>1</sub>.<sup>3,85,86</sup>



### II.1.3. Synthèse et caractérisation

Les composés ont été synthétisés *via* une synthèse multi-étapes convergente, à partir de quatre synthons.

#### Synthèse du synthon A

Le synthon **A** a été synthétisé en six étapes avec un rendement global de 9% (Figure 92).<sup>87</sup>

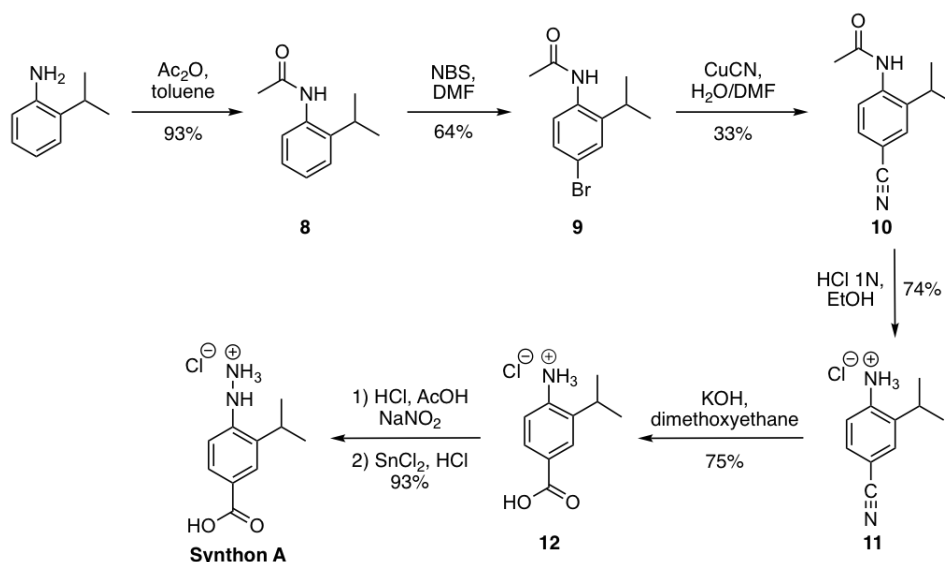


Figure 92. Synthèse du synthon **A** à partir de la 2-isopropylaniline.

La première étape a consisté en la protection de l'amine de la 2-isopropylaniline sous la forme d'un acétamide pour conduire au produit **8**. Celui-ci a ensuite été bromé grâce au *N*-bromosuccinimide puis la substitution de ce brome par un groupement nitrile *via* la réaction de Rosenmund-von Braun a conduit au composé **10**. Des traitements acides puis basiques ont permis d'hydrolyser la fonction amide, puis le groupement nitrile, afin d'obtenir le composé **12** avec une amine libre et un acide carboxylique. Enfin, le synthon **A** a été obtenu après formation et réduction du sel de diazonium correspondant.

#### Synthèse du synthon B

La synthèse du composé **B** a été réalisée en une étape de condensation à partir de la 2,6-diméthoxyacétophénone et de l'oxalate de diéthyle en présence d'une base (Figure 93).<sup>88</sup>

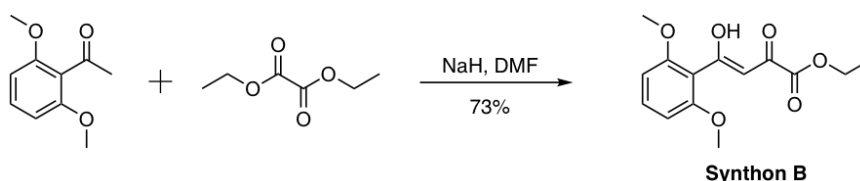


Figure 93. Synthèse du synthon **B** à partir de la 2,6-diméthoxyacétophénone et de l'oxalate de diéthyle.

Des bases telles que le *tert*-butanolate de potassium (tBuOK) ou l'éthanoate de sodium (EtONa) n'ont pas permis la conversion. En revanche, l'utilisation d'une base plus forte telle que l'hydrure de sodium (NaH) a permis d'obtenir le composé avec un bon rendement de 73% après recristallisation.

### Synthèse du synthon C

Le groupement polyamine ramifié (synthon C) a été obtenu en trois étapes avec un rendement global de 50% (Figure 94).<sup>89</sup>

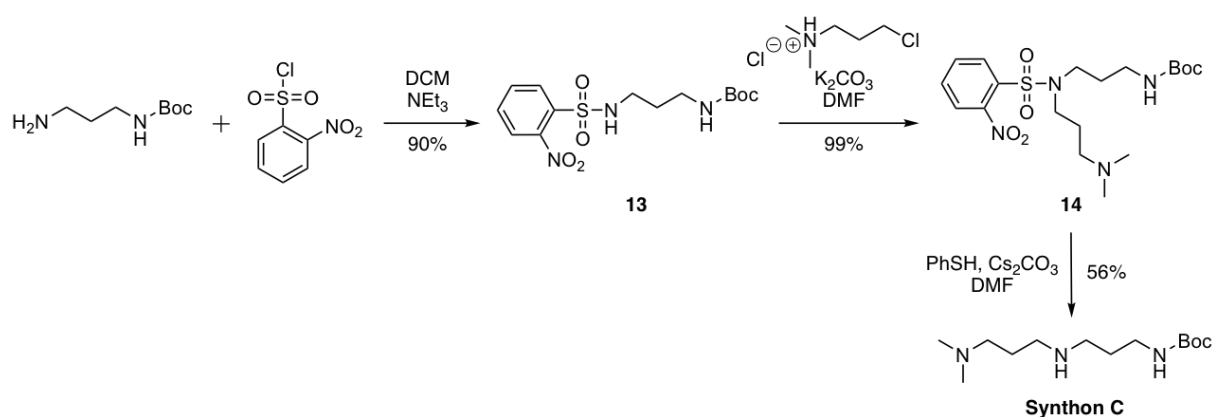


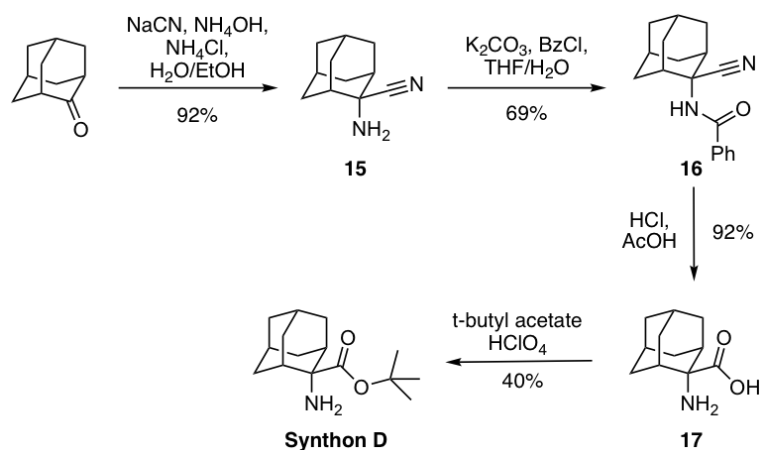
Figure 94. Synthèse du synthon C à partir de la *N*-Boc-1,3-propanediamine.

La 1,3-propanediamine, mono-protégée par un groupement Boc, a tout d'abord été sulfonylée par le chlorure de 2-nitrobenzène sulfonyle pour donner le composé **13**. Le sulfonamide a ensuite été alkylé par le chlorhydrate de la *N,N*-diméthyl-3-chloropropanamine conduisant au composé **14**. Enfin, le clivage du groupement nosyle a conduit au synthon C.

Il est à noter que la réaction de substitution nucléophile de la 1,3-propanediamine mono-protégée sur la *N,N*-diméthyl-3-chloropropanamine n'a pas permis d'obtenir le composé souhaité mais majoritairement le composé disubstitué.

### Synthèse du synthon D

Le synthon **D** a été obtenu en quatre étapes avec un rendement de 23% (Figure 95).<sup>90,91</sup> Pour cela, l'acide  $\alpha$ -aminé adamantane **17** a été formé en trois étapes à partir de l'adamantanone grâce à la synthèse de Strecker. La première étape a consisté à condenser la cétone avec du chlorure d'ammonium en présence de cyanure de sodium pour conduire à l'aminonitrile **15** correspondant. L'amine a ensuite été mise à réagir avec le chlorure de benzoyle pour activer l'aminonitrile connu pour être résistant à l'hydrolyse.<sup>92</sup> Le composé **16** a ensuite pu être hydrolysé pour obtenir le composé **17**. Enfin, la protection du groupement acide carboxylique par un groupement *tert*-butyle a conduit au synthon **D**.

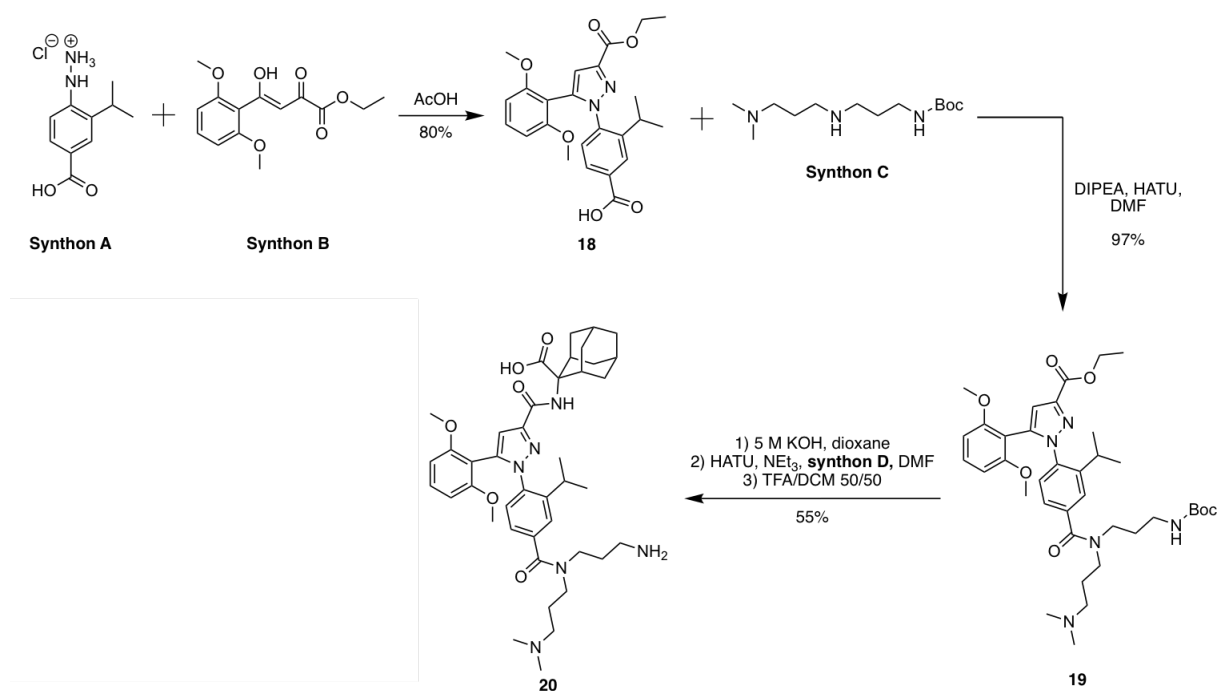


**Figure 95.** Synthèse du synthon **D** à partir de l'adamantanone.

Plusieurs conditions d'hydrolyse ont été testées pour obtenir le composé **17** (HCl 6N/THF à T.A. ou au reflux, NaOH 10N/EtOH au reflux, HCl 12N/AcOH/H<sub>2</sub>O à T.A. ou au reflux) mais seule l'utilisation d'acide chlorhydrique concentré dans l'acide acétique au reflux pendant cinq jours a permis la formation du produit désiré.

### Synthèse du précurseur ramifié

Le précurseur **20** possédant le groupement polyamine ramifié a été synthétisé en trois étapes à partir de ces quatre synthons avec un rendement global de 43% (Figure 96).<sup>87,93</sup>



**Figure 96.** Synthèse du précurseur **20** à partir des quatre synthons **A**, **B**, **C** et **D**.

Tout d'abord, les synthons **A** et **B** ont été condensés pour obtenir le pyrazole **18** (synthèse de Knorr). L'acide carboxylique a ensuite été activé avec HATU puis mis à réagir avec l'amine secondaire du synthon **C** pour conduire au composé **19**. Un premier traitement basique a permis de saponifier l'ester afin d'obtenir un acide carboxylique qui, après activation, a pu réagir avec l'amine primaire du synthon **D**. Enfin un traitement acide a permis d'éliminer les groupements Boc et *t*Bu pour conduire au précurseur **20**.

### Synthèse des composés « mono-chélateur »

À partir du précurseur **20**, les différents composés comportant un agent chélatant ont été synthétisés en une étape avec des rendements compris entre 30 et 65% après purification par chromatographie semi-préparative (Figure 97). Pour cela le précurseur **20** a été mis à réagir avec les agents chélatants activés sous forme d'esters de *N*-hydroxysuccinimide (DOTA, NOTA et (*R*)-NODAGA), d'anhydride (DOTAGA) ou d'isothiocyanate (THP) en solution basique.

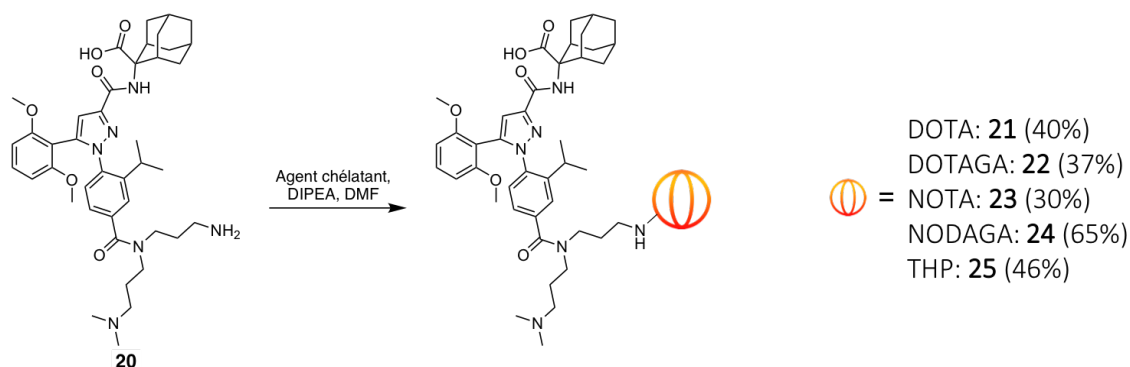


Figure 97. Couplage des différents agents chélatants sur le précurseur **20**.

### Synthèse des composés « bis-chélateur »

Souhaitant introduire deux agents chélatants sur le précurseur **20**, il nous a semblé intéressant d'utiliser la lysine comme plateforme. Les composés contenant deux chélateurs ont donc été synthétisés en deux étapes (Figure 98). Tout d'abord, les agents chélatants protégés sous forme d'esters de *tert*-butyle (NODAGA(*t*Bu)<sub>3</sub> et DOTAGA(*t*Bu)<sub>4</sub>) ont été activés grâce au TSTU puis les deux fonctions amines de la lysine ont été acylées par l'acide activé en milieu basique pour donner les composés **26** et **28**. Ensuite, l'activation de l'acide carboxylique de la lysine grâce au HATU a permis la réaction avec l'amine libre du précurseur **20**. Enfin, la déprotection des acides carboxyliques en milieu acide a conduit aux composés désirés **27** (bisNODAGA) et **29** (bisDOTAGA), avec des rendements de 37 et 15% respectivement.

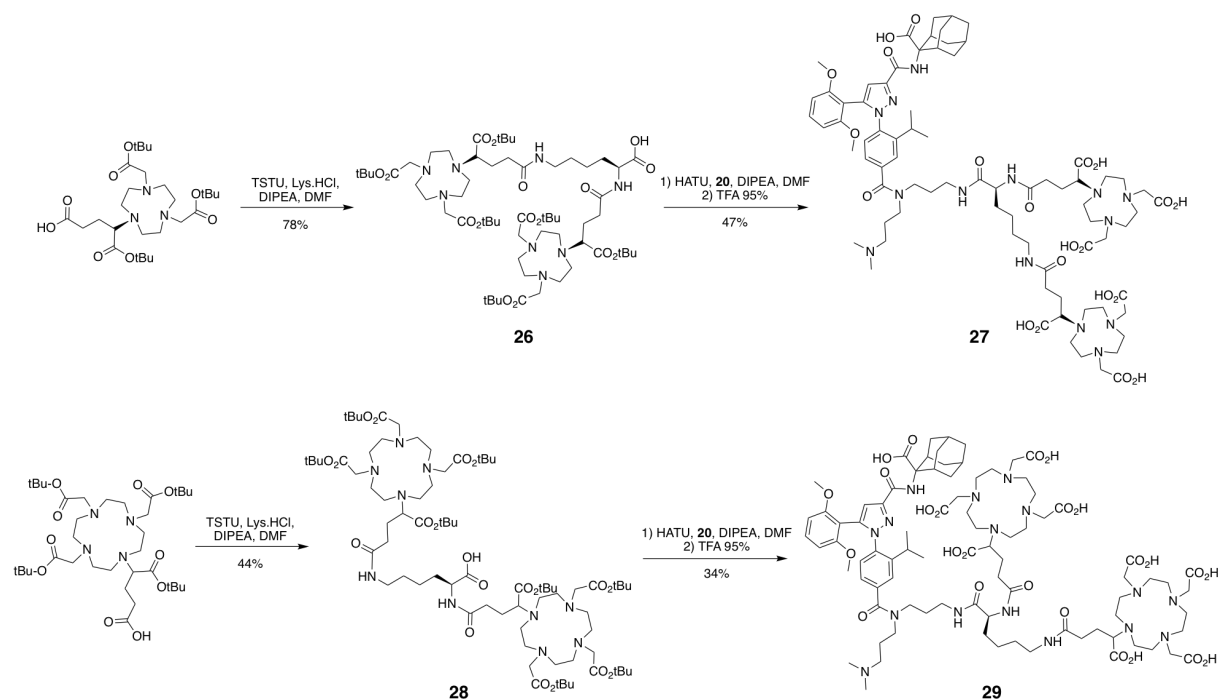
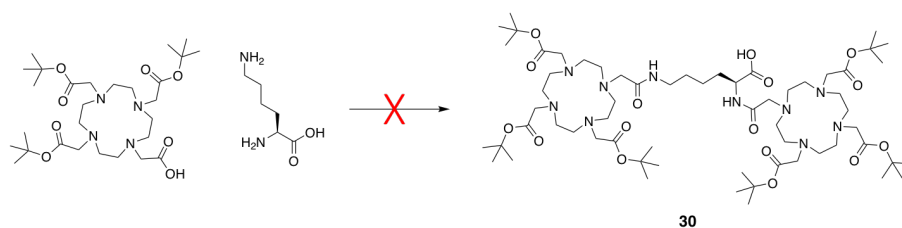


Figure 98. Synthèse des composés « bis-chélateur » et couplage au précurseur **20**.

Initialement, nous souhaitons introduire deux DOTA au lieu de deux DOTAGA mais nous n'avons pas réussi à isoler le composé **30** (Lys(DOTA(tBu)<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). Aucun des tests réalisés (conditions réactionnelles variées et lots de DOTA(tBu)<sub>3</sub> différents) n'a permis l'obtention du produit **30** (Figure 99). La formation du DOTA(tBu)<sub>3</sub> activé ainsi que celle du composé **30** ont pu être observées par HPLC-MS mais la présence de nombreuses autres espèces non identifiées n'a pas permis d'isoler un produit assez pur pour la suite.



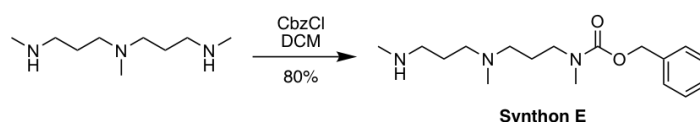
Agent d'activation	Base	Solvant	Température
TSTU	DIPEA	DMF	T.A.
TSTU	DIPEA	DMF	50 °C
TSTU	DIPEA	DMF/H <sub>2</sub> O	T.A.
HATU	DIPEA	DMF	T.A.
TSTU	NEt <sub>3</sub>	DMF	T.A.
TSTU	NEt <sub>3</sub>	DMF	50 °C
TSTU	DIPEA	NMP	T.A.

Figure 99. Conditions de synthèse évaluées pour la synthèse du composé **30**.

Le composé 3BP-227 a été utilisé comme référence dans notre étude. Nous l'avons donc synthétisé à partir des mêmes synthons que précédemment (**A**, **B** et **D**) excepté pour le groupement polyamine qui a nécessité la préparation du synthon **E**.

### Synthèse du synthon E

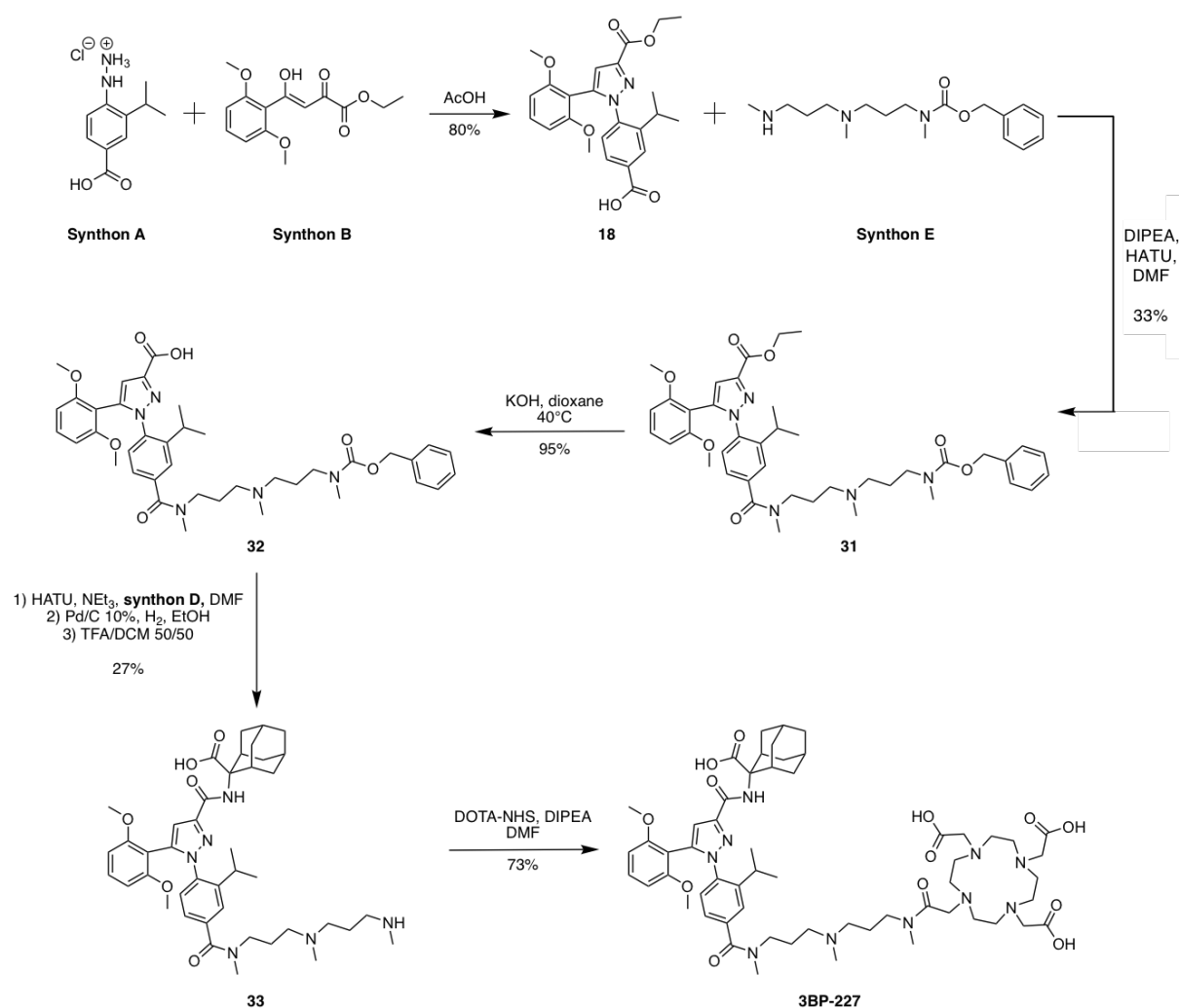
Ce groupement polyamine linéaire, mono-protégé par un groupement Cbz, a été synthétisé en une étape avec un rendement de 80% (Figure 100). Deux difficultés ont été rencontrées : la formation du produit résultant de la double protection des deux amines secondaires et la purification. Pour résoudre ces problèmes, nous avons dû travailler en conditions diluées (0.5 M), à basse température (-78 °C), et ajouter le chloroformiate de benzyle sur 1 h. La purification a été effectuée en phase inverse.



**Figure 100.** Synthèse du synthon E à partir du *N,N*-bis[3-(méthylamino)propyl]méthylamine.

### Synthèse du composé 3BP-227

Le composé 3BP-227 a été obtenu en cinq étapes à partir des synthons **A**, **B**, **D** et **E** avec un rendement global de 5% (Figure 101).<sup>87,93</sup> Les synthons **A** et **B** ont été condensés pour former **18** qui, après activation avec HATU, a pu réagir avec l'amine secondaire du synthon **E** pour donner **31**. Ce composé a ensuite été saponifié pour obtenir l'acide carboxylique libre **32** afin de l'activer au HATU et le faire réagir avec l'amine de l'adamantane du synthon **D**. Ensuite, la déprotection de l'amine a été réalisée par hydrogénation catalytique, puis le groupement *t*Bu de l'adamantane a été hydrolysé en milieu acide pour conduire au précurseur **33** possédant le groupement polyamine linéaire. Enfin, le DOTA-NHS a été couplé à l'amine libre afin de former le composé 3BP-227.

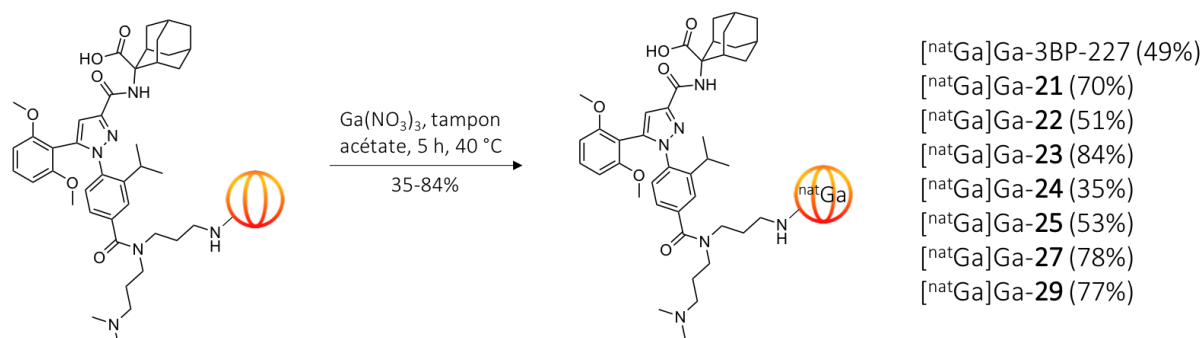


**Figure 101.** Synthèse du composé 3BP-227 à partir des quatre synthons **A**, **B**, **D** et **E**.

## II.2. Tests *in vitro*

### II.2.1. Méallation au <sup>nat</sup>Ga

Les sept composés **21-25**, **27**, **29**, ainsi que la référence 3BP-227, ont été métallés par le gallium dans une solution de tampon acétate 0.1 M à pH 3.48 à 40 °C en utilisant du nitrate de gallium, Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (1.5 équiv. pour les « mono-chélateurs » et 4 équiv. pour les « bis-chélateurs ») (Figure 102). L'excès de gallium a ensuite été éliminé par chromatographie semi-préparative afin d'obtenir les complexes purs, avec des rendements compris entre 35 et 84%.



**Figure 102.** Métallation des différents agents avec du <sup>nat</sup>Ga.

## II.2.2. Évaluation de la stabilité

Afin d'évaluer la stabilité face à la dégradation enzymatique, nous avons incubé chaque composé métallé dans du sérum murin à 37 °C (Tableau 8). Des prélèvements ont été effectués à 0 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h et 24 h. Une quantité constante d'étalon a été ajoutée à chaque prélèvement, puis les échantillons ont été analysés par RP-HPLC-MS. Cette étude a été réalisée en duplicate.

Les composés portant les chélateurs NOTA, NODAGA et THP ont montré une excellente stabilité avec plus de 99% de produit intact après 4 h. En revanche, les composés portant des chélateurs DOTA ou DOTAGA se sont avérés moins stables avec environ 80% de composé intact après 4 h. Les principaux produits de dégradation sont issus de la perte de gallium. Ceci s'explique par la différence de taille de cavité des agents chélatants. Les dérivés à base de TACN possèdent une cavité de petite taille adaptée au rayon ionique du gallium tandis que celle plus grande des dérivés à base de cyclène est moins adaptée, conduisant à une stabilité plus faible. Comme nous avons pu le voir en introduction, l'augmentation de la taille du macrocycle est liée à la diminution des constantes de complexation ( $\log K_{\text{Ga-NOTA}} = 31.0$  vs  $\log K_{\text{Ga-DOTA}} = 26.1$ ) ce qui explique un relargage du métal pour les dérivés à base de cyclène. De plus, après 24 h d'incubation, un produit de dégradation correspondant à une perte de masse de 27 a été observé pour les dérivés à base de cyclène. Nous n'avons pour le moment pas déterminé la nature de ce produit.

Dans ces conditions, seulement 55% de la neurotensine a été retrouvé intact après 4 h d'incubation. Cela montre que les petites molécules sont plus stables que les peptides même si ces conditions *in vitro* ne reflètent pas ce qu'il se passe réellement *in vivo*.

**Tableau 8.** Pourcentages de composé intact après 4 h d'incubation dans du sérum de souris à 37 °C.

	NT	$[\text{natGa}]\text{Ga-3BP-227}$	$[\text{natGa}]\text{Ga-21}$	$[\text{natGa}]\text{Ga-22}$	$[\text{natGa}]\text{Ga-23}$	$[\text{natGa}]\text{Ga-24}$	$[\text{natGa}]\text{Ga-25}$	$[\text{natGa}]\text{Ga-27}$	$[\text{natGa}]\text{Ga-29}$
% intact après 4 h	55%	90%	80%	78%	> 99%	> 99%	90%	> 99%	78%

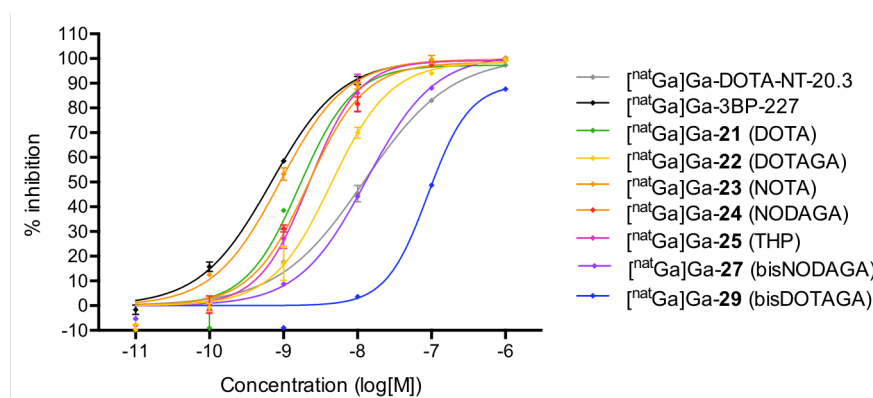


### II.2.3. Détermination des constantes d'inhibition ( $K_i$ )

Afin de déterminer les affinités des sept composés et de la référence 3BP-227 pour NTS<sub>1</sub>, un test de compétition a été réalisé sur des cellules CHO surexprimant NTS<sub>1</sub>. [<sup>125</sup>I]-Tyr<sup>3</sup>-neurotensine (0.05 nM;  $K_d = 0.22$  nM) a été utilisé comme ligand. Ce test a été effectué en duplicate par la société Eurofins.<sup>94</sup>

Toutes les constantes d'inhibition sont de l'ordre du nanomolaire (Figure 103). Les composés contenant un seul chélateur montrent d'excellentes affinités ( $K_i$  compris entre 0.73 et 3.59 nM), du même ordre que celle de 3BP-227 ( $K_i = 0.55$  nM). En revanche, l'introduction de deux chélateurs engendre une augmentation importante des constantes d'inhibition ( $K_i = 9.05$  et 61.9 nM pour les composés bisNODAGA et bisDOTAGA respectivement).

Ces résultats semblent aussi montrer que la présence d'une charge positive sur le complexe améliore l'affinité pour les NTS<sub>1</sub> (NOTA,  $K_i = 0.73$  nM) par rapport aux complexes neutres (DOTA, NODAGA et THP,  $K_i = 1.35$ , 1.75 et 1.80 nM respectivement). En revanche, les charges négatives semblent diminuer l'affinité (DOTAGA,  $K_i = 3.59$  nM).



	[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-DOTA-NT-20.3	[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-3BP-227	[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-21	[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-22	[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-23	[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-24	[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-25	[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-27	[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-29
$K_i$ (nM)	10.0 [6.51 – 15.4]	0.55 [0.51 – 0.59]	1.35 [0.99 – 1.83]	3.59 [3.03 – 4.26]	0.73 [0.60 – 0.88]	1.75 [0.77 – 3.96]	1.80 [1.55 – 2.10]	9.05 [7.28 – 11.2]	61.9 [51.9 – 73.8]

**Figure 103.** (Haut) Détermination de l'IC<sub>50</sub> des composés évalués par le test de compétition (régression non linéaire). (Bas) Tableau résumant les constantes d'inhibition des composés pour NTS<sub>1</sub> ; les valeurs sont données en « moyenne [intervalle de confiance à 95%] ».

### II.2.4. Radiomarquage

Nous nous sommes ensuite intéressés au radiomarquage des composés avec du gallium-68. L'efficacité du radiomarquage au gallium-68 est dépendante de nombreux paramètres, ce qui nécessite un certain temps d'optimisation afin d'obtenir de bons rendements radiochimiques, des conditions de radiomarquage optimales, de bonnes activités spécifiques et un protocole robuste et reproductible. Le développement du procédé de radiomarquage a été réalisé à la plateforme d'imagerie préclinique du centre Georges François Leclerc (Dijon) avec le Dr. Mathieu Moreau.

L'efficacité de radiomarquage est dépendante de plusieurs paramètres tels que :

- la quantité de composé par rapport à celle de <sup>68</sup>Ga : elle fait varier l'activité spécifique ciblée ;
- le pH de la solution : les tampons acétate ou HEPES sont les plus utilisés pour obtenir un pH idéal autour de 3.5-4 car ils sont biocompatibles et ne présentent pas de toxicité ;<sup>95,96</sup>
- la température et le temps de réaction ;
- la radiolyse du composé ;
- la pureté du <sup>68</sup>Ga introduit dans la réaction.

Tous ces paramètres ont été évalués afin d'obtenir les meilleures conditions de radiomarquage possibles. Pour cela, de nombreux tests ont été réalisés en prenant comme molécule de référence le composé **21** (DOTA). En effet, le radiomarquage au <sup>68</sup>Ga des dérivés à base de DOTA est en général plus compliqué que celui des dérivés contenant du NOTA, du NODAGA ou du THP. Pour chaque test, le générateur <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga a été élué par une solution de HCl (0.1 M), la réaction de radiomarquage a été effectuée, puis un contrôle qualité par radio-HPLC et iTLC a été réalisé.

Pour définir l'efficacité du radiomarquage, nous nous sommes basés principalement sur deux données obtenues grâce à la radio-HPLC (Figure 104) :

- le pourcentage d'incorporation : il s'agit de la quantité de gallium-68 ayant réagi avec le composé (ici 95%) ;
- la pureté radiochimique : il s'agit de la quantité de composé radiomarqué pur comparée à la totalité de gallium-68 engagée dans la réaction (ici 75%).

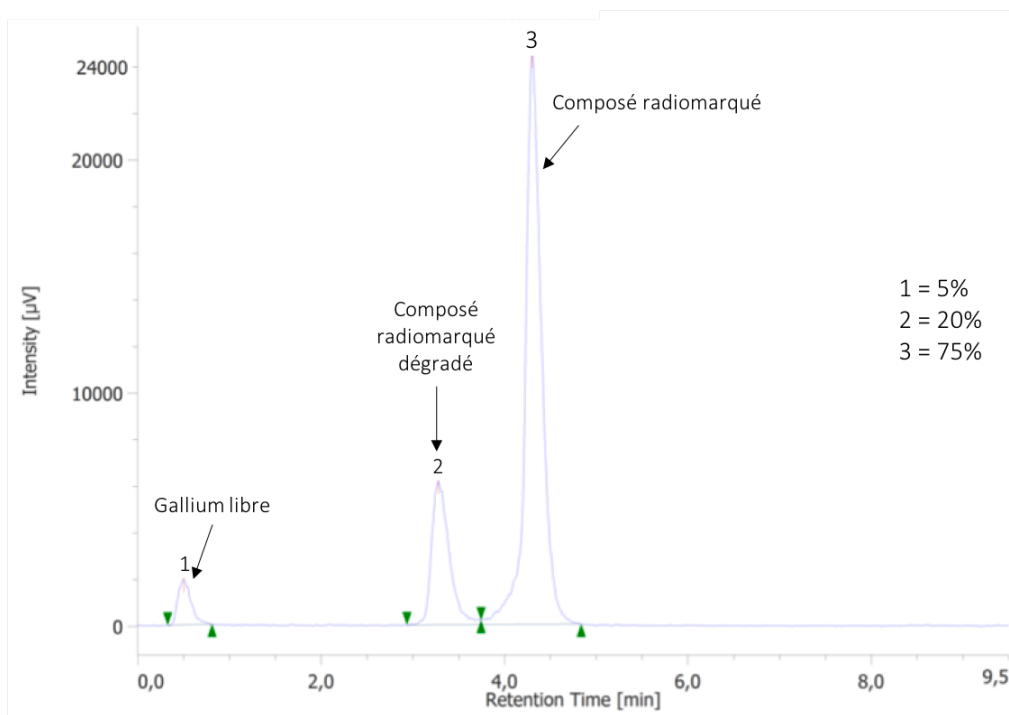


Figure 104. Chromatogramme issu de la radio-HPLC.

## Élution du générateur

Lors de l'élution du générateur, l'éluat peut contenir des impuretés métalliques (<sup>68</sup>Ge, <sup>68</sup>Zn, Fe (III), ...) qui diminuent les performances du radiomarquage en entrant en compétition avec le gallium-68. De plus, les volumes d'élution sont en général élevés (5 à 8 mL), ce qui implique des conditions de réaction diluées et donc des performances réduites. Il existe plusieurs techniques permettant de concentrer le gallium et d'éliminer les impuretés. La teneur en impuretés métalliques et en <sup>68</sup>Ge peut être réduite par une élution régulière du générateur et une élution avant la synthèse. Il est aussi possible de purifier l'éluat en utilisant la méthode de fractionnement ou des pré-purifications anioniques ou cationiques (Figure 105).<sup>97,98</sup>

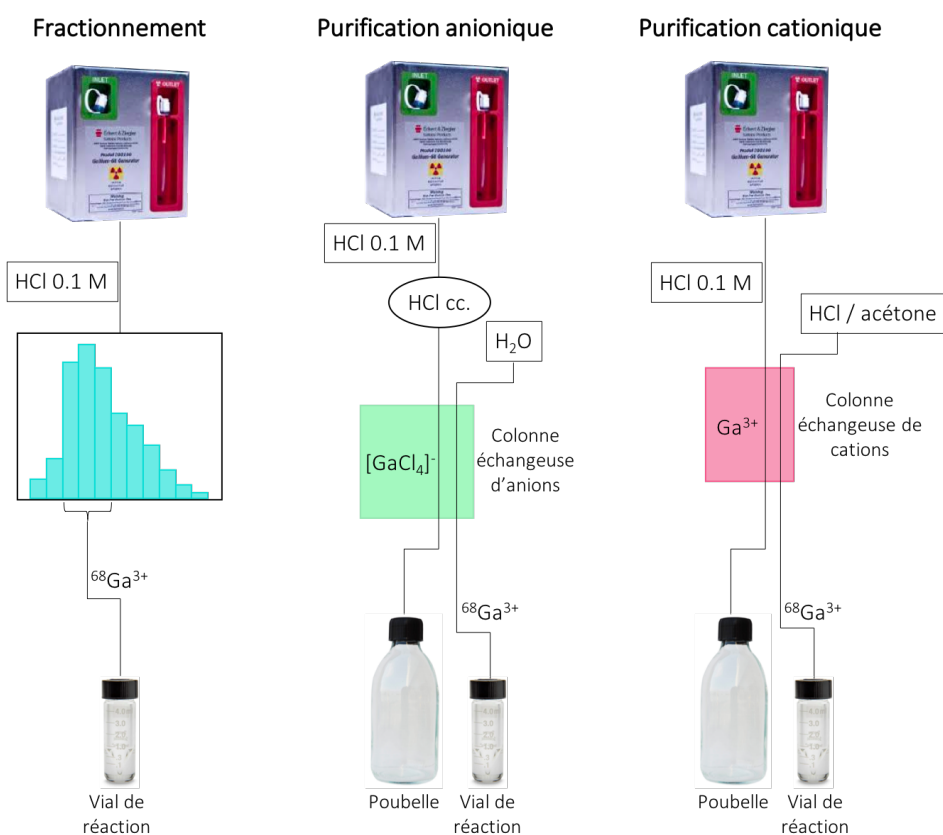


Figure 105. Représentation des trois techniques permettant l'obtention de solutions de <sup>68</sup>Ga pures.

La méthode de fractionnement consiste à éliminer les premières et dernières fractions de l'élution et à récupérer uniquement les fractions centrales. Les impuretés sont éliminées dans les premières fractions, et les fractions centrales contiennent la plus forte concentration de <sup>68</sup>Ga pur.<sup>99</sup> Un inconvénient de cette méthode réside dans le fait que la procédure n'utilise qu'une fraction de l'activité du <sup>68</sup>Ga éluable, ce qui peut réduire l'activité spécifique du produit radiopharmaceutique final.

La purification anionique consiste à récupérer l'éluat du générateur dans une solution concentrée d'acide chlorhydrique afin de former des ions  $GaCl_4^-$ . La solution est ensuite éluee sur une colonne échangeuse d'anions qui va fixer les ions  $[^{68}Ga]GaCl_4^-$ , la colonne est séchée

avec un gaz inerte ou de l'air, puis le <sup>68</sup>Ga est élué avec un petit volume d'eau. Dans ce cas, les impuretés sont éliminées et le gallium-68 est concentré dans un faible volume.<sup>96</sup>

La purification cationique fonctionne selon le même principe, mais l'éluat du générateur est dans ce cas directement élué sur une colonne échangeuse de cations qui va piéger le <sup>68</sup>Ga sous forme de Ga<sup>3+</sup>, qui est ensuite élué avec une solution HCl/acétone.<sup>100</sup>

Plusieurs tentatives de pré-purification sur colonne échangeuse d'anions ont été réalisées mais nous n'avons pas réussi à obtenir un protocole efficace. Nous avons donc choisi d'utiliser la méthode de fractionnement pour notre étude.

### **Radiolyse**

Lors du radiomarquage, les rayonnements ionisants émis par le radionucléide entraînent la formation de radicaux libres tels que des radicaux hydroxyles et superoxydes dans les solutions aqueuses, qui peuvent réagir avec les traceurs et engendrer leur décomposition ; ce phénomène s'appelle la radiolyse. Dans les conditions standards utilisées (1.3 nmol de composé, 100 µL de <sup>68</sup>Ga, tampon AcONa 1 M (pH 5.76) pour obtenir un pH final d'environ 3.5-4), nous avons pu observer que nos molécules subissaient ce phénomène de radiolyse lors du radiomarquage. Seuls les résultats obtenus pour les composés **21** et **23** sont présentés ici (entrées 1 et 4, Tableau 9).

L'utilisation de molécules capables de piéger les radicaux libres permet de réduire la radiolyse. L'ajout d'acide ascorbique, d'acide gentsique, de thiols ou d'éthanol sont des techniques envisageables.<sup>95</sup> Nous avons tout d'abord testé l'utilisation d'un tampon contenant de l'acide gentsique (entrées 2 et 5, Tableau 9). On remarque que les composés ne sont plus dégradés mais les pourcentages d'incorporation sont nettement réduits.

L'ajout d'éthanol au milieu réactionnel a ensuite été évalué. En effet, celui-ci est biocompatible, n'engendre pas de problèmes de toxicité ou d'immunoréactivité et est compatible avec les conditions GMP. Le plus souvent, il n'interfère pas avec la réaction de marquage et il peut favoriser la solubilité des précurseurs lipophiles.<sup>101,95</sup> Nous avons donc ajouté 10% d'éthanol (entrées 3 et 6, Tableau 9), ce qui a permis de conserver de bons taux d'incorporation tout en empêchant la radiolyse. Ce résultat a été observé pour toutes les molécules. On remarque toutefois que le taux d'incorporation pour le composé DOTA (**21**) est passé de 94% à 60%. Ces expériences ayant été réalisées en début d'optimisation, les conditions montraient encore une variabilité importante (pH par exemple) pouvant expliquer cette diminution du taux d'incorporation.

L'ajout de 10% d'éthanol pour limiter la radiolyse a donc été conservé dans la suite du projet.

**Tableau 9.** Résumé des différentes conditions utilisées et leur impact sur le phénomène de radiolyse. Le pH indiqué est celui de la solution tampon.

	Composés	Tampon	Volume de tampon ( $\mu\text{L}$ )	Volume d'EtOH ( $\mu\text{L}$ )	Conditions	Pourcentage incorporation	Pureté radiochimique
1	<b>23</b>	AcONa 1 M pH 5.76	2.5	-	5 min, 37 °C	95%	75%
2	<b>23</b>	AcONH <sub>4</sub> 0.4 M + Ac. gentisique 0.325 M pH 4.14	70	-	5 min, 37 °C	4%	4%
3	<b>23</b>	AcONa 1 M pH 5.76	2.5	10	5 min, 37 °C	96%	96%
4	<b>21</b>	AcONa 1 M pH 5.76	2.5	-	15 min, 95 °C	94%	85%
5	<b>21</b>	AcONH <sub>4</sub> 0.4 M + Ac. gentisique 0.325 M pH 4.14	70	-	15 min, 95 °C	14%	14%
6	<b>21</b>	AcONa 1 M pH 5.76	2.5	10	15 min, 95 °C	60%	60%

### Température et temps de réaction

Nous nous sommes aussi intéressés à la température et au temps de réaction nécessaires pour trouver le bon compromis afin d'avoir de bons rendements tout en ne dégradant pas la molécule, et ceci en un temps assez court au vu de la courte demi-vie du <sup>68</sup>Ga (67.7 min).

Pour cela, une quantité fixe de composé (1.3 nmol) a été ajoutée à un volume constant de tampon AcONa 1 M (pH 5.76) (2.5  $\mu\text{L}$ ) et de <sup>68</sup>Ga (100  $\mu\text{L}$ ). Les dérivés contenant le NOTA, le NODAGA ou le THP montrent de bonnes capacités de complexation du gallium. Il est possible de les marquer à température ambiante. Nous avons néanmoins choisi de chauffer à 37 °C afin d'accélérer la réaction pour pouvoir raccourcir sa durée (5 min). Ceci a permis de bons taux d'incorporation sans influence de l'éthanol (entrées 1 et 2, Tableau 10).

**Tableau 10.** Résumé des différentes conditions utilisées et leur impact sur les taux d'incorporation (le pH indiqué est celui de la solution tampon).

	Composés	Tampon	Volume de tampon ( $\mu\text{L}$ )	Volume d'EtOH ( $\mu\text{L}$ )	Conditions	Pourcentage incorporation
1	<b>23</b>	AcONa 1 M pH 5.76	2.5	-	5 min, 37 °C	95%
2	<b>23</b>	AcONa 1 M pH 5.76	2.5	10	5 min, 37 °C	96%
3	<b>21</b>	AcONa 1 M pH 5.76	2.5	-	5 min, 37 °C	81%
4	<b>21</b>	AcONa 1 M pH 5.76	2.5	-	15 min, 95 °C	94%
5	<b>21</b>	AcONa 1 M pH 5.76	2.5	10	10 min, 95 °C	88%

Pour les dérivés à base de DOTA il est souvent nécessaire de chauffer davantage. Plusieurs conditions ont été évaluées (entrées 3 à 5, Tableau 10) et il nous a semblé que le meilleur compromis était 10 min à 95 °C. À nouveau, le taux d'incorporation à 37 °C est relativement élevé par rapport à ce qui est attendu pour le composé **21** (81%). Ceci est probablement dû au manque de reproductibilité des expériences à ce stade de l'optimisation. En effet, des taux

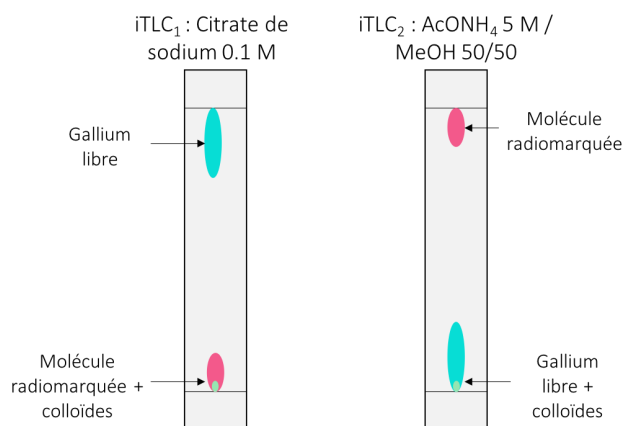
d'incorporation de 53% pour le composé 3BP-228 et 70% pour le composé **22** (DOTAGA) ont été obtenus dans ces mêmes conditions.

Nous avons donc choisi de marquer les dérivés contenant NOTA, NODAGA ou THP à 37 °C pendant 5 min et les composés contenant DOTA et DOTAGA à 95 °C pendant 10 min.

### pH de la solution

Comme nous avons pu le voir précédemment, le pH est un paramètre très important qui peut énormément faire varier l'efficacité du radiomarquage. S'il est trop élevé (> 4) le gallium (III) est hydrolysé et forme des colloïdes insolubles diminuant les performances de radiomarquage ; s'il est trop acide les rendements sont médiocres car les bras coordinants sont protonés.<sup>102</sup> Il est donc impératif de trouver le tampon idéal qui permette de tamponner suffisamment l'éluat de  $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$  pour obtenir un pH proche de 3.5-4, de façon reproductible.

La quantité de colloïdes est déterminée en utilisant une combinaison de deux iTLC (*instant thin layer chromatography*) (Figure 106). L'une est éluée par une solution de citrate de sodium 0.1 M à pH 5 ce qui permet de faire migrer le gallium libre. L'autre est éluée par une solution d'acétate d'ammonium 5 M/MeOH 50/50, faisant migrer la molécule marquée. La soustraction (taux de molécule marquée + colloïdes) – (quantité de molécule marquée), déterminés par comptage-gamma, permet de déduire la quantité de colloïdes.



**Figure 106.** Représentation schématique des iTLC obtenues après élution dans les deux conditions utilisées.

Pour chaque test décrit ci-après, une solution du composé **21** (0.24 nmol) dans 10  $\mu\text{L}$  d'éthanol, 100  $\mu\text{L}$  de  $^{68}\text{Ga}$  et un volume donné de tampon, a été chauffée 10 min à 95 °C. Tout d'abord, nous avons étudié le tampon AcONa 1 M (entrées 1 et 2, Tableau 11). Ce tampon ne nous a pas permis d'obtenir des résultats reproductibles, probablement dû aux volumes assez faibles à introduire, entraînant des pourcentages d'erreur importants. Nous avons donc testé un tampon AcONa plus dilué (0.5 M) (entrées 3 à 5, Tableau 11). Comme nous pouvons le voir, l'augmentation du pH s'accompagne d'une augmentation de la quantité de colloïdes ainsi que d'une diminution du pourcentage d'incorporation. L'utilisation de 25  $\mu\text{L}$  de tampon permet

d'obtenir un pourcentage d'incorporation assez élevé et plusieurs tests ont permis de montrer une bonne reproductibilité. Un autre tampon couramment utilisé est l'HEPES 1 M. Nous l'avons donc évalué (entrées 6 à 10, Tableau 11) mais les résultats n'ont pas été satisfaisants. On remarque à nouveau que le taux d'incorporation est très dépendant du pH et que la gamme de pH idéale est très fine. Par exemple, dans le cas de l'HEPES, on observe seulement 30% d'incorporation à pH 3.6, 70% à pH 3.8 et à nouveau seulement 26% à pH 4.1 (entrées 7 à 9, Tableau 11), ce qui laisse une marge de manœuvre relativement étroite, d'où la nécessité de garantir la reproductibilité du pH.

Pour la suite de l'étude nous avons choisi d'utiliser le tampon AcONa 0.5 M car c'est celui qui nous a donné la meilleure combinaison « taux d'incorporation et reproductibilité de pH ». De plus, les tampons acétates sont injectables chez l'homme contrairement aux tampons HEPES.

**Tableau 11.** Résumé des différentes conditions utilisées (nature du tampon et volume) et leur impact sur le taux d'incorporation, le pH et le pourcentage de colloïdes.

	Composé	Tampon	Volume de tampon (μL)	Pourcentage incorporation	pH	Pourcentage de colloïdes
1	21	AcONa 1 M pH 5.76	11	88%	3.5	0%
2	21	AcONa 1 M pH 5.76	11	81%	3.2	0%
3	21	AcONa 0.5 M pH 5.58	25	82%	3.6	0%
4	21	AcONa 0.5 M pH 5.58	30	19%	4.1	13%
5	21	AcONa 0.5 M pH 5.58	40	1%	4.4	14%
6	21	HEPES 1 M pH 5.37	20	9%	2.9	8%
7	21	HEPES 1 M pH 5.37	40	30%	3.6	7%
8	21	HEPES 1 M pH 5.37	50	70%	3.8	1%
9	21	HEPES 1 M pH 5.37	80	27%	4.1	10%
10	21	HEPES 1 M pH 5.37	150	1%	4.6	2%

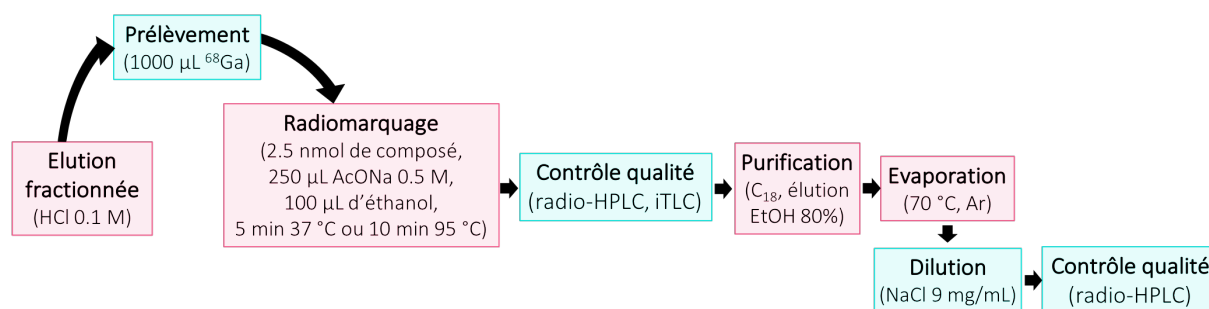
### **Purification après radiomarquage**

Une fois le radiomarquage réalisé, il est important de purifier la solution finale afin d'éliminer les éventuelles traces de gallium libre et les complexes formés avec les ions acétates du tampon. Pour cela, la solution est éluée sur une colonne C<sub>18</sub> qui retient le composé marqué. Celle-ci est ensuite lavée et séchée pour éliminer les impuretés puis éluée avec une solution d'éthanol 80%. Enfin, l'éthanol est évaporé puis le composé est dilué avec une solution de chlorure de sodium à 9 g/L afin d'obtenir des solutions injectables aux souris/patients.

### **Radioprotection et automatisation**

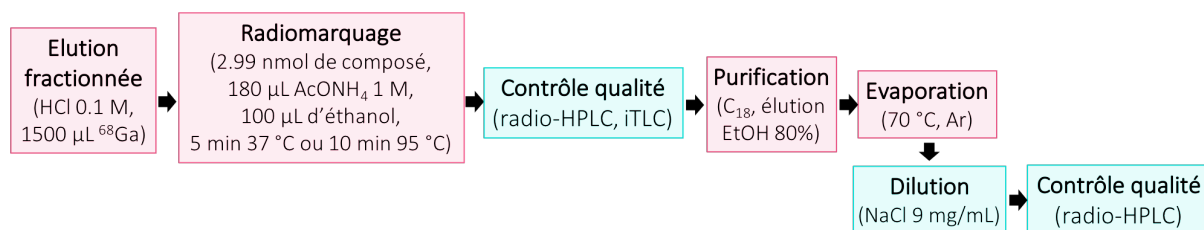
Tous les tests d'optimisation ont été réalisés dans une cellule blindée de façon semi-automatisée : l'éluion, la purification finale et l'évaporation se faisant automatiquement, l'ajout du <sup>68</sup>Ga et le lancement de la réaction manuellement. Ceci nous a permis d'obtenir un

protocole reproductible permettant d'obtenir de bons radiomarquages (Figure 107). Ce protocole (appelé « Protocole 1 ») consiste à faire une élution fractionnée, prélever 1000  $\mu\text{L}$  de  $^{68}\text{Ga}$  élué et les ajouter à une solution contenant 2.5 nmol de composé, 250  $\mu\text{L}$  de tampon AcONa 0.5 M et 100  $\mu\text{L}$  d'éthanol, chauffer 10 min à 95 °C ou 5 min à 37 °C selon les composés, purifier sur colonne C<sub>18</sub>, évaporer l'éthanol et diluer le produit dans une solution saline. Bien que ce protocole donne de bons résultats, il engendre une exposition aux rayonnements ionisants et n'est pas donc pas adapté, en l'état, à un potentiel transfert vers la clinique.



**Figure 107.** Schéma représentant le protocole de radiomarquage semi-automatisé (protocole 1), avec en rose les étapes automatisées et en bleu les étapes manuelles.

Nous avons donc tenté d'automatiser complètement le procédé de radiomarquage pour améliorer la radioprotection. Le problème majeur rencontré a été la variabilité des volumes de  $^{68}\text{Ga}$  élués ce qui engendrait des différences de pH et donc des variations des taux d'incorporation. L'utilisation de tampon AcONH<sub>4</sub> 1 M a permis de mieux tamponner le milieu réactionnel en diminuant les variations de pH. Ceci a permis d'obtenir un protocole efficace, robuste, reproductible, sécurisé et extrapolable à plus grande échelle (Figure 108). Ce protocole (appelé « Protocole 2 ») consiste à éluer le  $^{68}\text{Ga}$  par la méthode de fractionnement avec une solution de HCl 0.1 M, envoyer la solution de  $^{68}\text{Ga}$  (1500  $\mu\text{L}$ ) dans un *vial* de réaction contenant 2.99 nmol de composé, 180  $\mu\text{L}$  de tampon AcONH<sub>4</sub> 1 M et 100  $\mu\text{L}$  d'éthanol, faire réagir 10 min à 95 °C ou 5 min à 37 °C selon les composés, purifier sur colonne C<sub>18</sub>, éluer avec une solution d'EtOH 80%, évaporer l'éthanol et diluer dans une solution de NaCl. Un prélèvement est effectué avant la purification afin de mesurer le taux d'incorporation par radio-HPLC et la présence de colloïdes par iTLC puis à la fin de la réaction pour déterminer la pureté du composé injecté aux souris par radio-HPLC.



**Figure 108.** Schéma représentant le protocole de radiomarquage automatisé (protocole 2), avec en rose les étapes automatisées, en bleu les étapes manuelles.



Le Tableau 12 compare l'utilisation du protocole 1 et du protocole 2 sur différents composés. Les pourcentages d'incorporation, les puretés ainsi que les pH sont similaires pour les deux protocoles.

**Tableau 12.** Résumé des résultats obtenus pour le radiomarquage de différents composés en utilisant le protocole 1 ou le protocole 2.

	21	21	21	22	22	22	29	29	24	24	27	27	27
Protocole	1	2	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	2
Pourcentage incorporation	74%	73%	66%	89%	80%	80%	81%	81%	95%	49%	98%	87%	90%
Pureté après purification	99%	99%	< 99%	< 99%	99%	< 99%	< 99%	< 99%	< 99%	97%	< 99%	99%	99%
pH	3.5	3.4	3.3	3.6	3.4	3.5	3.5	3.5	3.8	3.4	4.1	3.9	4.0

Le protocole automatisé nous a permis de marquer les sept composés ainsi que les deux références avec des rendements radiochimiques compris entre 35 et 80%, des activités molaires de 8.8 à 17.8 MBq/nmol et des puretés radiochimiques supérieures à 95% (Tableau 13).

**Tableau 13.** Résumé des rendements radiochimiques, pourcentages de colloïdes, activités molaires et puretés radiochimiques pour chaque composé radiomarké.

Composés	Rendement radiochimique	Pourcentage de colloïdes	Activité molaire (MBq/nmol)	Pureté radiochimique
[ <sup>68</sup> Ga]Ga-DOTA-NT-20.3 (n=1)	87%	< 0.1%	17.26	> 99%
[ <sup>68</sup> Ga]Ga-3BP-227 (n=1)	75%	6%	8.75	98%
[ <sup>68</sup> Ga]Ga-21 (n=2)	75%	2.3% ± 2	15.1 ± 1.5	> 99%
[ <sup>68</sup> Ga]Ga-22 (n=1)	75%	0.3% ± 0.2	16.1	> 99%
[ <sup>68</sup> Ga]Ga-23 (n=1)	-	-	-	94%
[ <sup>68</sup> Ga]Ga-24 (n=1)	35%	17.8%	9.75	97%
[ <sup>68</sup> Ga]Ga-25 (n=1)	-	-	-	99%
[ <sup>68</sup> Ga]Ga-27 (n=2)	75% ± 5	0.4% ± 2.7	17.8 ± 0.3	> 99%
[ <sup>68</sup> Ga]Ga-29 (n=1)	80%	< 0.1%	16.3	> 99%

### II.2.5. Mesure du caractère hydrophile (LogD)

La lipophilie des composés radiomarkés a été déterminée par mesure des coefficients de partition (logD) dans un milieu octanol/PBS à pH 7.4 par la méthode « shake-flask ». <sup>103</sup>

Tous les composés se sont avérés hydrophiles (Tableau 14). Comme attendu, les composés portant deux agents chélatants sont plus hydrophiles avec des logD d'environ -3.5 tandis que des valeurs allant de -1.7 à -2.6 ont été obtenues pour les composés présentant un seul agent chélatant. Le composé [<sup>68</sup>Ga]Ga-25 contenant le THP est quant à lui le moins hydrophile de tous avec un logD de -1.17.

**Tableau 14.** Résumé des coefficients de partage (logD).

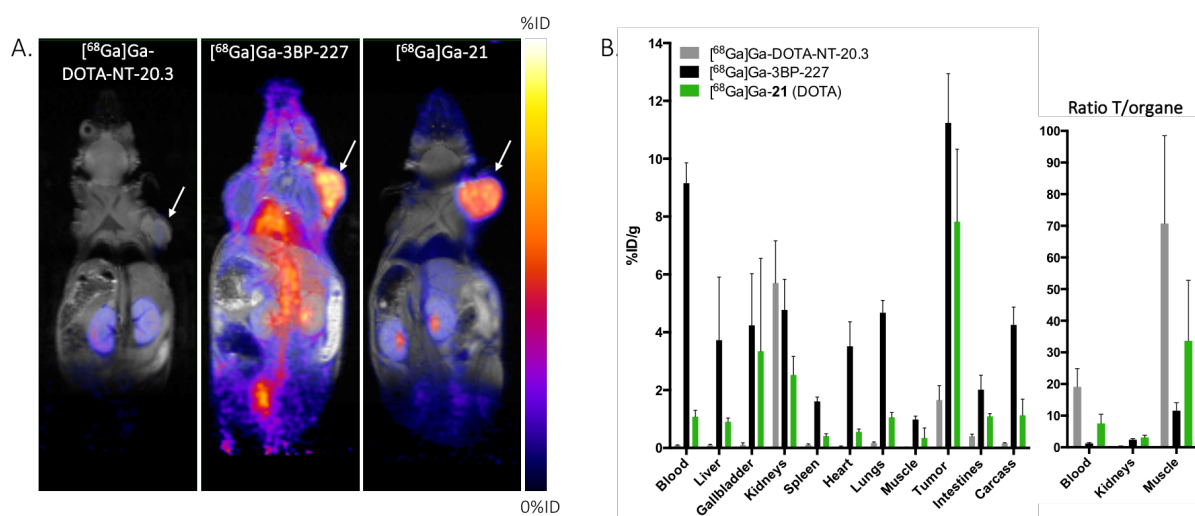
	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-21	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-22	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-23	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-24	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-25	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-27	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-29	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-3BP-227	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-DOTA-NT-20.3
LogD	-2.45 ± 0.01	-1.75 ± 0.00	-1.85 ± 0.02	-1.74 ± 0.01	-1.17 ± 0.10	-3.44 ± 0.02	-3.62 ± 0.00	-2.62 ± 0.03	-2.50 ± 0.31

### II.3. Évaluation des propriétés pharmacocinétiques des différents agents d'imagerie par imagerie TEP-IRM

Pour évaluer les profils de biodistribution, chaque composé radiomarqué a été injecté (500 pmol, 3-8 MBq) à des souris *nude* portant une xénogreffe de cellules HT-29 (cancer colorectal humain) exprimant NTS<sub>1</sub> (n = 4).<sup>94</sup> Des images TEP/IRM ont été enregistrées entre 1.5 h et 2 h après l'injection. Après 2 h, les souris ont été euthanasiées, les organes ont été récoltés, pesés, et la radioactivité a été comptée.

Nous avons tout d'abord comparé les références entre elles. Comme nous l'avions prévu d'après les résultats de Schulz *et al.*, le composé [<sup>68</sup>Ga]Ga-**21** (3BP-228) montre un profil de biodistribution bien plus propre que le composé [<sup>68</sup>Ga]Ga-3BP-227 avec beaucoup moins de signal circulant (Figure 109A). Ceci a été confirmé par la biodistribution *ex vivo*, qui montre des ratios tumeur/organe bien meilleurs (Figure 109B). Par exemple, le ratio tumeur/sang est de ~1.2 pour le [<sup>68</sup>Ga]Ga-3BP-227 contre ~7.5 pour [<sup>68</sup>Ga]Ga-**21** ; de même pour le ratio tumeur/muscle (~11.6 contre ~33.7 respectivement).

En revanche, le composé [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-NT-20.3 montre un profil de biodistribution typique des peptides avec une moins bonne accumulation tumorale que [<sup>68</sup>Ga]Ga-**21** (~1.7%ID/g contre ~7.8%ID/g respectivement) mais très peu de signal dans tous les tissus sains hormis les reins, ce qui conduit à d'excellents ratios tumeur/organe (Figure 109).



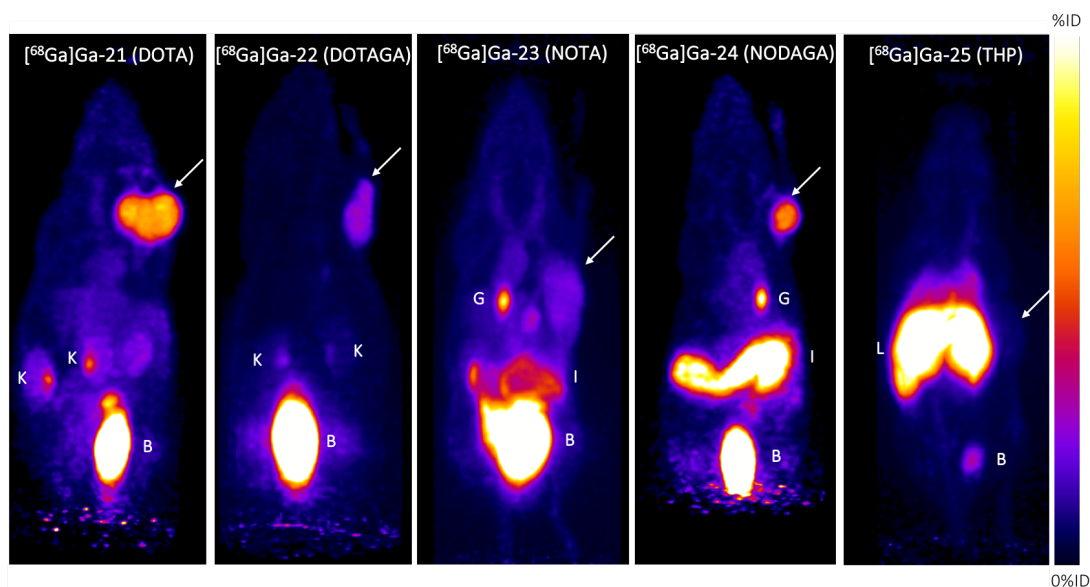
**Figure 109.** A. Images TEP/IRM de souris portant une xénogreffe HT-29 entre 1.5 h et 2 h après l'injection des composés [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-NT-20.3, [<sup>68</sup>Ga]Ga-3BP-227 et [<sup>68</sup>Ga]Ga-**21** (3BP-228). Les tumeurs sont désignées par des flèches blanches. B. (Gauche) Biodistribution *ex vivo* 2 h p.i. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de

dose injectée par gramme (%ID/g, moyenne  $\pm$  SD) pour chaque organe collecté. (Droite) Ratios tumeur/organe provenant de la biodistribution *ex vivo*, valeurs exprimées en moyenne  $\pm$  SD.

Pour la partie suivante, les images TEP sont présentées sous forme de MIP (*maximum intensity projection*) car cela permet une meilleure visualisation de l'accumulation dans tous les organes que les coupes TEP/IRM. Toutes les données numériques (%ID/g et ratios pour chaque organe et chaque composé) ainsi que les images TEP/IRM sont consultables dans la partie expérimentale.

Nous avons ensuite comparé les cinq composés comportant un seul agent chélatant. De nombreuses différences ont pu être observées (Figure 110). Tout d'abord, le composé [<sup>68</sup>Ga]Ga-25 (THP) montre un signal très élevé au niveau des poumons, du foie et de la rate avec  $\sim 12.7$ ,  $\sim 46.4$ ,  $\sim 42\%$ ID/g respectivement, comparé aux autres composés ( $\sim 0.5$ - $1.3\%$ ID/g). De plus, la tumeur n'est pas visible sur l'image. En effet, seulement  $1.3\%$ ID/g y est accumulée. Nous estimons que ce comportement est dû à la lipophilie du composé.

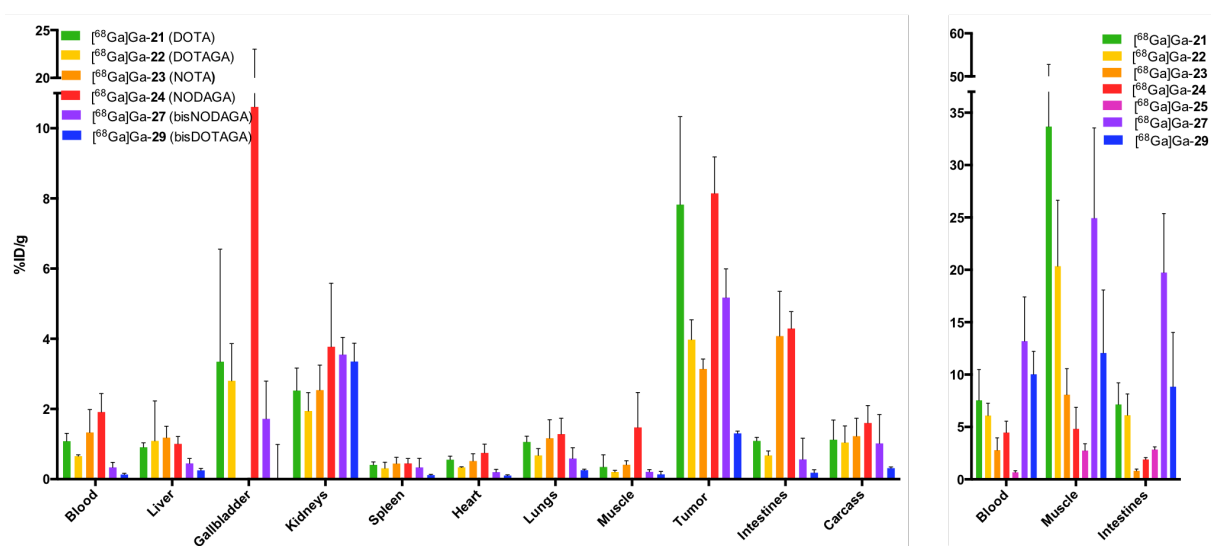
Les quatre autres composés ont montré des profils plus semblables pour la plupart des organes avec une voie d'élimination rénale (reins et vessie visibles), peu de signal circulant et une bonne accumulation tumorale. Cependant, une première différence est observée au niveau des intestins et de la vésicule biliaire (Figure 110). En effet, les composés dérivés du NOTA ([<sup>68</sup>Ga]Ga-23 et [<sup>68</sup>Ga]Ga-24) montrent un signal important dans ces organes par rapport aux dérivés du DOTA ([<sup>68</sup>Ga]Ga-21 et [<sup>68</sup>Ga]Ga-22).



**Figure 110.** Projections du signal TEP obtenu en 30 min d'acquisition entre 1.5 h et 2 h après l'injection des composés [<sup>68</sup>Ga]Ga-21, [<sup>68</sup>Ga]Ga-22, [<sup>68</sup>Ga]Ga-23, [<sup>68</sup>Ga]Ga-24, [<sup>68</sup>Ga]Ga-25, [<sup>68</sup>Ga]Ga-27 et [<sup>68</sup>Ga]Ga-29 à des souris portant une xénogreffe de tumeur HT-29. K : reins, B : vessie, G : vésicule biliaire, I : intestin, L : foie. Les flèches blanches pointent les tumeurs.

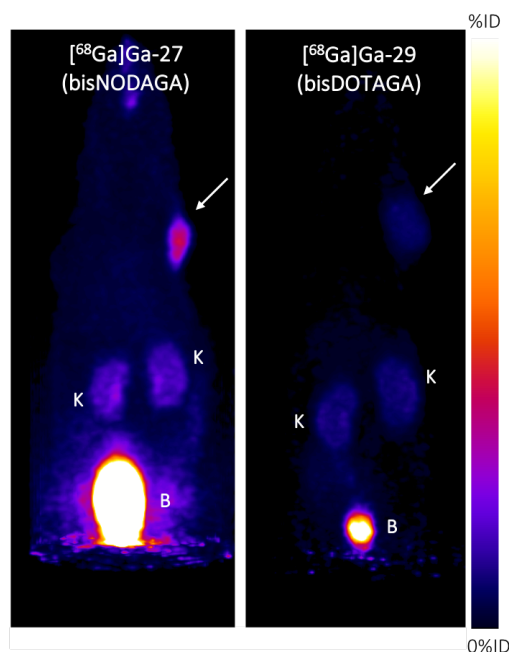
Ces résultats ont été confirmés par la biodistribution *ex vivo* (Figure 111). Ils suggèrent une élimination partielle par voie hépatobiliaire, qui peut être une limite pour la détection de tumeurs abdominales. Une autre différence est observée au niveau de l'accumulation tumorale. En effet, on remarque sur les images TEP que les composés [<sup>68</sup>Ga]Ga-**21** et [<sup>68</sup>Ga]Ga-**24** présentent une meilleure accumulation tumorale que les composés [<sup>68</sup>Ga]Ga-**22** et [<sup>68</sup>Ga]Ga-**23** (Figure 110). Ceci est vérifié par la biodistribution *ex vivo* (~8%ID/g contre ~3-4%ID/g respectivement) (Figure 111). Ce résultat peut être dû à la charge des composés. En effet, les composés présentant une meilleure accumulation ont tous deux une charge neutre au niveau du complexe métal/chélateur tandis que les autres présentent une charge négative ou positive.

Parmi les composés « mono-chélateur », les meilleurs ratios tumeur/organe sont observés pour les composés dérivés du DOTA ([<sup>68</sup>Ga]Ga-**21** et [<sup>68</sup>Ga]Ga-**22**) (Figure 111).



**Figure 111.** Biodistribution *ex vivo* 2 h p.i. (gauche). Les valeurs sont exprimées en pourcentage de dose injectée par gramme (%ID/g, moyenne  $\pm$  SD) pour chaque organe collecté. Ratios tumeur/organe provenant de la biodistribution *ex vivo* (droite) ; valeurs exprimées en moyenne  $\pm$  SD.

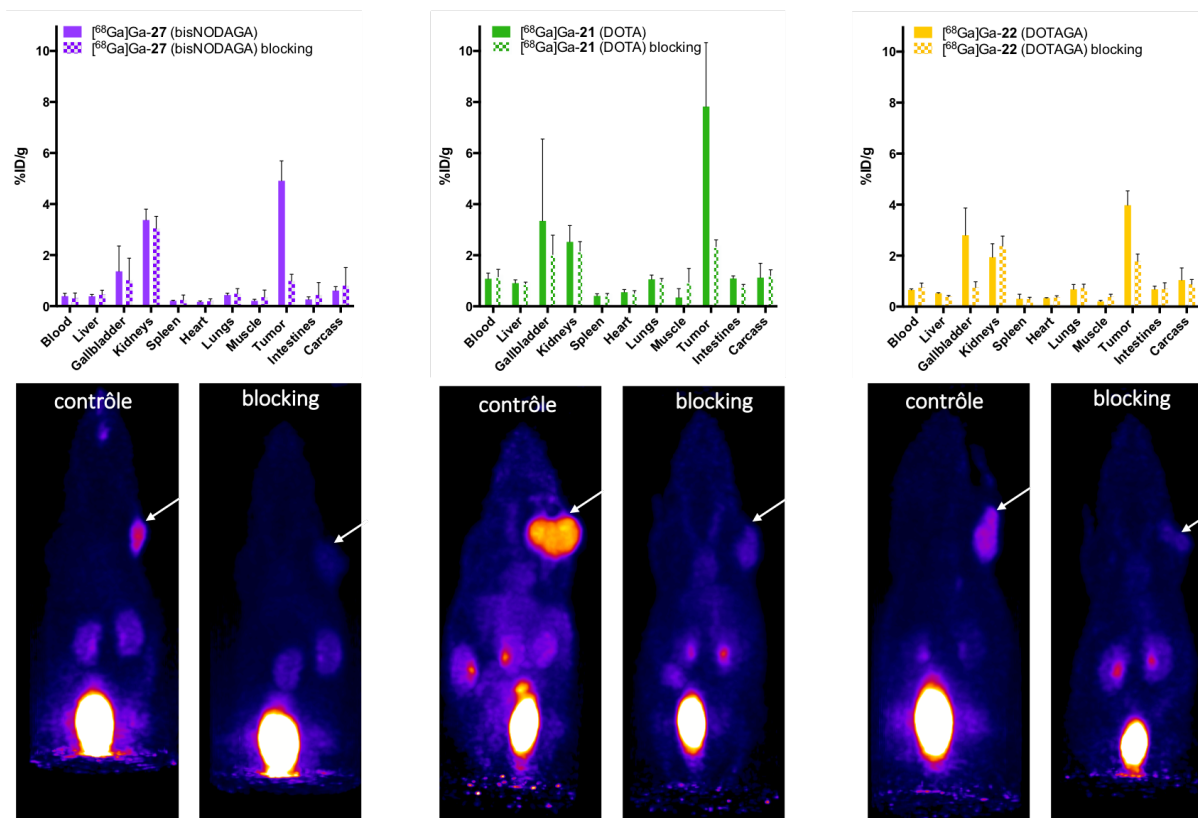
Nous avons choisi d'introduire deux agents chélatants sur une même molécule afin d'accélérer la clairance des tissus pour obtenir des images présentant de meilleurs contrastes. Comme nous pouvons le voir sur les images Figure 112, les profils de biodistribution de ce traceur sont en effet beaucoup plus propres, avec quasiment aucun signal circulant après 2 h p.i.



**Figure 112.** Projections du signal TEP obtenu en 30 min d'acquisition entre 1.5 h et 2 h après l'injection des composés  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-27}$  et  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-29}$  à des souris portant une xénogreffe de cellules HT-29. K : reins, B : vessie. Les flèches blanches pointent les tumeurs.

Le composé  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-29}$  (bisDOTAGA) montre très peu de signal dans les tissus sains mais aussi une faible accumulation tumorale ( $\sim 1.3\% \text{ID/g}$ ) ce qui conduit à des ratios tumeur/organe comparables à ceux obtenus avec les dérivés de DOTA « mono-chélateur » (Figure 111). La faible accumulation tumorale peut être due à l'affinité pour NTS<sub>1</sub> qui est nettement moins bonne que pour les autres composés ( $K_i = 61.9 \text{ nM}$  contre  $\sim 0.5\text{-}3.6 \text{ nM}$  respectivement) ou à une clairance trop rapide. En revanche, le composé  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-27}$  (bisNODAGA) montre un profil de biodistribution extrêmement propre avec beaucoup moins de signal dans les organes sains, tout en conservant une bonne accumulation tumorale ( $\sim 4.9\% \text{ID/g}$ ), conduisant ainsi aux meilleurs ratios tumeur/organe (Figure 111). Étonnamment, contrairement aux autres dérivés de TACN, ce composé ne montre pas de signal au niveau des intestins et de la vésicule biliaire.

Nous avons ensuite étudié la spécificité des composés pour NTS<sub>1</sub>. Pour cela, nous avons réalisé une expérience de compétition (co-injection d'un excès de 100 équivalents du composé non marqué SR142948A) avec les meilleurs composés  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-21}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-22}$  et  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-27}$  ( $n = 4$ ). Comme nous pouvons le voir sur la Figure 113, l'accumulation dans tous les organes est restée quasiment identique, exceptée pour la tumeur. Ces résultats montrent bien la spécificité des radiotraceurs pour les récepteurs à la neurotensine.



**Figure 113.** Étude de la spécificité des composés  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-21}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-22}$  et  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-27}$  pour NTS<sub>1</sub>, 2 h après l'injection à des souris portant une xénogreffe HT-29, sans ou avec un excès de SR142948A. (Haut) Biodistribution *ex vivo*, (Bas) Images TEP.

### III. Conclusion et perspectives

Pour conclure, nous avons synthétisé sept radiotraceurs antagonistes des récepteurs à la neurotensine en une vingtaine d'étapes. Ces composés diffèrent par la nature des agents chélatants et leur nombre. Nous avons aussi synthétisé le composé 3BP-227 afin de l'utiliser comme référence. Il diffère des autres radiotraceurs de par son groupement polyamine linéaire. Le peptide DOTA-NT-20.3 a aussi été utilisé comme référence tout au long de l'étude. Les sept radiotraceurs ont montré une bonne stabilité métabolique et de bonnes affinités pour NTS<sub>1</sub>, de l'ordre du nanomolaire, comparables aux références, excepté pour le composé **29** pour lequel l'affinité a été réduite par un facteur 6. L'optimisation des conditions de radiomarquage a permis de développer un protocole efficace, reproductible et automatisé afin de marquer les composés au gallium-68 avec de bons rendements et puretés radiochimiques, ainsi que de bonnes activités spécifiques. Le caractère hydrophile a ensuite été mesuré, montrant une augmentation de l'hydrophilie pour les composés « bis chélateurs » et une hydrophilie réduite pour le composé contenant le THP. Tous les composés radiomarqués ont ensuite été injectés à des souris porteuses d'une xénogreffe de tumeur colorectale humaine (HT-29) afin d'évaluer les propriétés pharmacocinétiques. De nombreuses différences ont pu être observées telles qu'une forte accumulation du composé  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-25}$  (THP) au niveau des poumons et du foie, l'accumulation au niveau des intestins

et de la vésicule biliaire des composés [<sup>68</sup>Ga]Ga-**23** et [<sup>68</sup>Ga]Ga-**24** (NOTA et NODAGA), une meilleure accumulation tumorale pour les composés [<sup>68</sup>Ga]Ga-**21**, [<sup>68</sup>Ga]Ga-**24** et [<sup>68</sup>Ga]Ga-**27** (DOTA, NODAGA et bisNODAGA), ainsi qu'une clairance accélérée pour les composés contenant deux chélateurs [<sup>68</sup>Ga]Ga-**27** et [<sup>68</sup>Ga]Ga-**29** (bisNODAGA et bisDOTAGA). Ceci a permis d'identifier le composé [<sup>68</sup>Ga]Ga-**27** comme étant le composé présentant le meilleur profil de biodistribution avec une bonne accumulation tumorale ( $4.917 \pm 0.776\%ID/g$ , 2 h p.i.) et une rapide clairance du sang et des tissus sains, conduisant aux meilleurs ratios tumeur/organe et à de bons contrastes en imagerie TEP.

Alors que le composé [<sup>177</sup>Lu]Lu-IPN01087 est actuellement en étude clinique pour le traitement de cancers exprimant les NTS<sub>1</sub>, il nous semble que la découverte du composé [<sup>68</sup>Ga]Ga-**27** pourrait en faire un bon compagnon diagnostique. En effet, ce radiotracer semble prometteur pour la détection de tumeurs exprimant les NTS<sub>1</sub> et la sélection des patients éligibles pour cette radiothérapie.

Au travers de cette étude, nous avons une nouvelle fois montré, l'importance du choix du chélateur et son impact sur les propriétés pharmacocinétiques d'une molécule. Cependant, à ce jour, il est encore difficile de prévoir l'effet que peut avoir un agent chélatant sur le profil de biodistribution d'un traceur. En effet, il n'existe pas de « chélateur idéal » qui conférerait un bon profil de biodistribution à n'importe quel traceur. Il est donc nécessaire d'évaluer différents agents chélatants pour chaque nouvelle molécule vectrice. Dans notre cas, par exemple, l'introduction d'un THP a entraîné une mauvaise accumulation tumorale et une élimination hépatique tandis que dans l'étude de Young *et al.*, l'introduction du même chélateur THP sur un radiotracer PSMA avait montré d'excellents résultats.<sup>104</sup> En revanche, il semble que l'introduction de plusieurs agents chélatants sur une même molécule soit une stratégie robuste qui permet l'accélération de la clairance des composés, conduisant à de bons contrastes entre les tissus sains et les tissus tumoraux.

Dans des travaux futurs, il serait intéressant d'évaluer ce composé sur un modèle orthotopique et différents modèles de cancers exprimant les NTS<sub>1</sub>. Il pourrait aussi être intéressant d'évaluer la stratégie bisNODAGA sur d'autres familles de radiotraceurs.



## Références

- (1) Maschauer, S.; Prante, O. Radiopharmaceuticals for Imaging and Endoradiotherapy of Neurotensin Receptor-Positive Tumors. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2018**, *61* (3), 309–325. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3581>.
- (2) Deng, H.; Wang, H.; Wang, M.; Li, Z.; Wu, Z. Synthesis and Evaluation of <sup>64</sup>Cu-DOTA-NT-Cy5.5 as a Dual-Modality PET/Fluorescence Probe to Image Neurotensin Receptor-Positive Tumor. *Mol. Pharmaceutics* **2015**, *12* (8), 3054–3061. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00325>.
- (3) Prignon, A.; Provost, C.; Alshoukr, F.; Wendum, D.; Couvelard, A.; Barbet, J.; Forgez, P.; Talbot, J.-N.; Gruaz-Guyon, A. Preclinical Evaluation of <sup>68</sup>Ga-DOTA-NT-20.3: A Promising PET Imaging Probe To Discriminate Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma from Pancreatitis. *Mol. Pharmaceutics* **2019**, *16* (6), 2776–2784. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00283>.
- (4) Mascarín, A.; Valverde, I. E.; Mindt, T. L. Radiolabeled Analogs of Neurotensin (8–13) Containing Multiple 1,2,3-Triazoles as Stable Amide Bond Mimics in the Backbone. *Med. Chem. Commun.* **2016**, *7* (8), 1640–1646. <https://doi.org/10.1039/C6MD00208K>.
- (5) Maschauer, S.; Einsiedel, J.; Hübner, H.; Gmeiner, P.; Prante, O. <sup>18</sup>F- and <sup>68</sup>Ga-Labeled Neurotensin Peptides for PET Imaging of Neurotensin Receptor 1. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (13), 6480–6492. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00675>.
- (6) Maschauer, S.; Greff, C.; Einsiedel, J.; Ott, J.; P, P.; Hübner, H.; Gmeiner, P.; Prante, O. Improved Radiosynthesis and Preliminary in Vivo Evaluation of a (<sup>18</sup>F)-Labeled Glycopeptide-Peptoid Hybrid for PET Imaging of Neurotensin Receptor 2. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (14), 4026–4033. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.01.053>.
- (7) Morgat, C.; Chastel, A.; Molinie, V.; Schollhammer, R.; Macgrogan, G.; Vélasco, V.; Malavaud, B.; Fernandez, P.; Hindié, E. Neurotensin Receptor-1 Expression in Human Prostate Cancer: A Pilot Study on Primary Tumors and Lymph Node Metastases. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (7). <https://doi.org/10.3390/ijms20071721>.
- (8) Erfani, M.; Zarrabi Ahrabi, N.; Shafiei, M.; Shirmardi, S. A (<sup>99m</sup>Tc)-Tricine-HYNIC-Labeled Peptide Targeting the Neurotensin Receptor for Single-Photon Imaging in Malignant Tumors. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2014**, *57* (3), 125–131. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3176>.
- (9) Fani, M.; Maecke, H. R.; Okarvi, S. M. Radiolabeled Peptides: Valuable Tools for the Detection and Treatment of Cancer. *Theranostics* **2012**, *2* (5), 481–501. <https://doi.org/10.7150/thno.4024>.
- (10) Lau, J. L.; Dunn, M. K. Therapeutic Peptides: Historical Perspectives, Current Development Trends, and Future Directions. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26* (10), 2700–2707. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>.
- (11) Sun, X.; Li, Y.; Liu, T.; Li, Z.; Zhang, X.; Chen, X. Peptide-Based Imaging Agents for Cancer Detection. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *110–111*, 38–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.007>.
- (12) Tornesello, A. L.; Buonaguro, L.; Tornesello, M. L.; Buonaguro, F. M. New Insights in the Design of Bioactive Peptides and Chelating Agents for Imaging and Therapy in Oncology. *Molecules* **2017**, *22* (8). <https://doi.org/10.3390/molecules22081282>.
- (13) Sparr, C.; Purkayastha, N.; Yoshinari, T.; Seebach, D.; Maschauer, S.; Prante, O.; Hübner, H.; Gmeiner, P.; Kolesinska, B.; Cescato, R.; Waser, B.; Reubi, J. C. Syntheses, Receptor Bindings, *in Vitro* and *in Vivo* Stabilities and Biodistributions of DOTA-Neurotensin(8-13) Derivatives Containing  $\beta$ -Amino Acid Residues - A Lesson about the Importance of Animal Experiments. *Chem. Biodivers.* **2013**, *10* (12), 2101–2121. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201300331>.
- (14) Kitabgi, P.; De Nadai, F.; Rovère, C.; Bidard, J. N. Biosynthesis, Maturation, Release, and Degradation of Neurotensin and Neuromedin N. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1992**, *668*, 30–42. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb27337.x>.
- (15) Afshar-Oromieh, A.; Hetzheim, H.; Kübler, W.; Kratochwil, C.; Giesel, F. L.; Hope, T. A.; Eder, M.; Eisenhut, M.; Kopka, K.; Haberkorn, U. Radiation Dosimetry of (<sup>68</sup>Ga)-PSMA-11 (HBED-CC) and Preliminary Evaluation of Optimal Imaging Timing. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2016**, *43* (9), 1611–1620.



<https://doi.org/10.1007/s00259-016-3419-0>.

- (16) Sandström, M.; Velikyan, I.; Garske-Román, U.; Sörensen, J.; Eriksson, B.; Granberg, D.; Lundqvist, H.; Sundin, A.; Lubberink, M. Comparative Biodistribution and Radiation Dosimetry of <sup>68</sup>Ga-DOTATOC and <sup>68</sup>Ga-DOTATATE in Patients with Neuroendocrine Tumors. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54* (10), 1755–1759. <https://doi.org/10.2967/jnumed.113.120600>.
- (17) Vegt, E.; Jong, M. de; Wetzels, J. F. M.; Masreeuw, R.; Melis, M.; Oyen, W. J. G.; Gotthardt, M.; Boerman, O. C. Renal Toxicity of Radiolabeled Peptides and Antibody Fragments: Mechanisms, Impact on Radionuclide Therapy, and Strategies for Prevention. *J. Nucl. Med.* **2010**, *51* (7), 1049–1058. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.075101>.
- (18) Myers, R. M.; Shearman, J. W.; Kitching, M. O.; Ramos-Montoya, A.; Neal, D. E.; Ley, S. V. Cancer, Chemistry, and the Cell: Molecules That Interact with the Neurotensin Receptors. *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4* (7), 503–525. <https://doi.org/10.1021/cb900038e>.
- (19) Gully, D.; Canton, M.; Boigegrain, R.; Jeanjean, F.; Molimard, J. C.; Poncelet, M.; Gueudet, C.; Heulme, M.; Leyris, R.; Brouard, A. Biochemical and Pharmacological Profile of a Potent and Selective Nonpeptide Antagonist of the Neurotensin Receptor. *PNAS* **1993**, *90* (1), 65–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.1.65>.
- (20) Gully, D.; Jeanjean, F.; Poncelet, M.; Steinberg, R.; Soubrié, P.; Fur, G. L.; Maffrand, J. Neuropharmacological Profile of Non-Peptide Neurotensin Antagonists. *Fund. Clin. Pharmacol.* **1995**, *9* (6), 513–521. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.1995.tb00528.x>.
- (21) Labbé-Jullié, C.; Botto, J. M.; Mas, M. V.; Chabry, J.; Mazella, J.; Vincent, J. P.; Gully, D.; Maffrand, J. P.; Kitabgi, P. [<sup>3</sup>H]SR 48692, the First Nonpeptide Neurotensin Antagonist Radioligand: Characterization of Binding Properties and Evidence for Distinct Agonist and Antagonist Binding Domains on the Rat Neurotensin Receptor. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *47* (5), 1050–1056.
- (22) Botto, J. M.; Chabry, J.; Sarret, P.; Vincent, J. P.; Mazella, J. Stable Expression of the Mouse Levocabastine-Sensitive Neurotensin Receptor in HEK 293 Cell Line: Binding Properties, Photoaffinity Labeling, and Internalization Mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *243* (2), 585–590. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.8071>.
- (23) Navarro, V.; Martin, S.; Sarret, P.; Nielsen, M. S.; Petersen, C. M.; Vincent, J.; Mazella, J. Pharmacological Properties of the Mouse Neurotensin Receptor 3. Maintenance of Cell Surface Receptor during Internalization of Neurotensin. *FEBS Lett.* **2001**, *495* (1–2), 100–105. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02367-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02367-5).
- (24) Dubuc, I.; Costentin, J.; Terranova, J. P.; Barnouin, M. C.; Soubrié, P.; Le Fur, G.; Rostène, W.; Kitabgi, P. The Nonpeptide Neurotensin Antagonist, SR 48692, Used as a Tool to Reveal Putative Neurotensin Receptor Subtypes. *Br. J. Pharmacol.* **1994**, *112* (2), 352–354. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1994.tb13077.x>.
- (25) Steinberg, R.; Brun, P.; Fournier, M.; Souilhac, J.; Rodier, D.; Mons, G.; Terranova, J. P.; Le Fur, G.; Soubrié, P. SR 48692, a Non-Peptide Neurotensin Receptor Antagonist Differentially Affects Neurotensin-Induced Behaviour and Changes in Dopaminergic Transmission. *Neuroscience* **1994**, *59* (4), 921–929. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90295-x](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90295-x).
- (26) Iwase, K.; Evers, B. M.; Hellmich, M. R.; Kim, H. J.; Higashide, S.; Gully, D.; Townsend, C. M. Indirect Inhibitory Effect of a Neurotensin Receptor Antagonist on Human Colon Cancer (LoVo) Growth. *Surg. Oncol.* **1996**, *5* (5), 245–251. [https://doi.org/10.1016/S0960-7404\(96\)80028-4](https://doi.org/10.1016/S0960-7404(96)80028-4).
- (27) Maoret, J. J.; Anini, Y.; Rouyer-Fessard, C.; Gully, D.; Laburthe, M. Neurotensin and a Non-Peptide Neurotensin Receptor Antagonist Control Human Colon Cancer Cell Growth in Cell Culture and in Cells Xenografted into Nude Mice. *Int. J. Cancer* **1999**, *80* (3), 448–454. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19990129\)80:3<448::aid-ijc19>3.0.co;2-n](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19990129)80:3<448::aid-ijc19>3.0.co;2-n).
- (28) Seethalakshmi, L.; Mitra, S. P.; Dobner, P. R.; Menon, M.; Carraway, R. E. Neurotensin Receptor Expression in Prostate Cancer Cell Line and Growth Effect of NT at Physiological Concentrations. *Prostate* **1997**, *31* (3), 183–192. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0045\(19970515\)31:3<183::AID-PROS7>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0045(19970515)31:3<183::AID-PROS7>3.0.CO;2-M).
- (29) Valerie, N. C. K.; Casarez, E. V.; Dasilva, J. O.; Dunlap-Brown, M. E.; Parsons, S. J.; Amorino, G. P.; Dziegielewska, J. Inhibition of Neurotensin Receptor 1 Selectively Sensitizes Prostate Cancer to Ionizing Radiation. *Cancer Res.* **2011**, *71* (21), 6817–6826. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1646>.
- (30) Shimizu, S.; Tsukada, J.; Sugimoto, T.; Kikkawa, N.; Sasaki, K.; Chazono, H.; Hanazawa, T.; Okamoto, Y.;

- Seki, N. 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* (8), 1816–1823. <https://doi.org/10.1002/ijc.23710>.
- (31) Iwase, K.; Evers, B. M.; Hellmich, M. R.; Kim, H. J.; Higashide, S.; Gully, D.; Thompson, J. C.; Townsend, C. M. Inhibition of Neurotensin-Induced Pancreatic Carcinoma Growth by a Nonpeptide Neurotensin Receptor Antagonist, SR48692. *Cancer* **1997**, *79* (9), 1787–1793. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19970501\)79:9<1787::aid-cnrc22>3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19970501)79:9<1787::aid-cnrc22>3.0.co;2-t).
- (32) Wang, J.-G.; Li, N.-N.; Li, H.-N.; Cui, L.; Wang, P. Pancreatic Cancer Bears Overexpression of Neurotensin and Neurotensin Receptor Subtype-1 and SR 48692 Counteracts Neurotensin Induced Cell Proliferation in Human Pancreatic Ductal Carcinoma Cell Line PANC-1. *Neuropeptides* **2011**, *45* (2), 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2011.01.002>.
- (33) Moody, T. W.; Chiles, J.; Casibang, M.; Moody, E.; Chan, D.; Davis, T. P. SR48692 Is a Neurotensin Receptor Antagonist Which Inhibits the Growth of Small Cell Lung Cancer Cells. *Peptides* **2001**, *22* (1), 109–115. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(00\)00362-4](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(00)00362-4).
- (34) Evaluation of the Overall Survival of Meclizolant Versus Placebo After a First Line Chemotherapy With Cisplatin + Etoposide - Full Text View - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00290953> (accessed May 18, 2020).
- (35) Gully, D.; Labeeuw, B.; Boigegrain, R.; Oury-Donat, F.; Bachy, A.; Poncelet, M.; Pecceu, F.; Maffrand, J. P. Biochemical and Pharmacological Activities of SR 142948A, a New Potent Neurotensin Receptor Antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *280*, 802–812.
- (36) Betancur, C.; Canton, M.; Burgos, A.; Labeeuw, B.; Gully, D.; Rostene, W.; Pelaprat, D. Characterization of Binding Sites of a New Neurotensin Receptor Antagonist, [3H]SR 142948A, in the Rat Brain. *Eur. J. Pharm.* **1998**, *343*, 67–77.
- (37) Kreitel, K. D.; Swisher, C. B.; Behbehani, M. M. The Effects of Diphenhydramine and SR142948A on Periaqueductal Gray Neurons and on the Interactions between the Medial Preoptic Nucleus and the Periaqueductal Gray. *Neuroscience* **2002**, *114* (4), 935–943. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00360-3](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00360-3).
- (38) Binder, E. B.; Kinkead, B.; Owens, M. J.; Nemeroff, C. B. Neurotensin Receptor Antagonist SR 142948A Alters Fos Expression and Extrapyramidal Side Effect Profile of Typical and Atypical Antipsychotic Drugs. *Neuropsychopharmacology* **2004**, *29* (12), 2200–2207. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300546>.
- (39) Meyer-Spasche, A.; Reed, H. E.; Piggins, H. D. Neurotensin Phase-Shifts the Firing Rate Rhythm of Neurons in the Rat Suprachiasmatic Nuclei in Vitro. *Eur. J. Neurosci.* **2002**, *16* (2), 339–344. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02067.x>.
- (40) Schaeffer, P.; Laplace, M. C.; Bernat, A.; Prabonnaud, V.; Gully, D.; Lespy, L.; Herbert, J. M. SR142948A Is a Potent Antagonist of the Cardiovascular Effects of Neurotensin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1998**, *31* (4), 545–550. <https://doi.org/10.1097/00005344-199804000-00012>.
- (41) Kitabgi, P. Targeting Neurotensin Receptors with Agonists and Antagonists for Therapeutic Purposes. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2002**, *5* (5), 764–776.
- (42) Ginj, M.; Zhang, H.; Waser, B.; Cescato, R.; Wild, D.; Wang, X.; Erchegeyi, J.; Rivier, J.; Mäcke, H. R.; Reubi, J. C. 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* (44), 16436–16441. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607761103>.
- (43) Dash, A.; Chakraborty, S.; Pillai, M. R. A.; Knapp, F. F. R. Peptide Receptor Radionuclide Therapy: An Overview. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2015**, *30* (2), 47–71. <https://doi.org/10.1089/cbr.2014.1741>.
- (44) Fani, M.; Maecke, H. R. Radiopharmaceutical Development of Radiolabelled Peptides. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39* (Suppl 1), S11-30. <https://doi.org/10.1007/s00259-011-2001-z>.
- (45) Lang, C.; Maschauer, S.; Hübner, H.; Gmeiner, P.; Prante, O. Synthesis and Evaluation of a <sup>18</sup>F-Labeled Diarylpyrazole Glycoconjugate for the Imaging of NTS<sub>1</sub>-Positive Tumors. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (22), 9361–9365. <https://doi.org/10.1021/jm401491e>.
- (46) Schulz, J.; Rohracker, M.; Stiebler, M.; Goldschmidt, J.; Stöber, F.; Noriega, M.; Pethe, A.; Lukas, M.; Osterkamp, F.; Reineke, U.; Höhne, A.; Smerling, C.; Amthauer, H. Proof of Therapeutic Efficacy of a <sup>177</sup>Lu-Labeled

- Neurotensin Receptor 1 Antagonist in a Colon Carcinoma Xenograft Model. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (6), 936–941. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.185140>.
- (47) Schulz, J.; Rohracker, M.; Stiebler, M.; Goldschmidt, J.; Grosser, O. S.; Osterkamp, F.; Pethe, A.; Reineke, U.; Smerling, C.; Amthauer, H. Comparative Evaluation of the Biodistribution Profiles of a Series of Nonpeptidic Neurotensin Receptor-1 Antagonists Reveals a Promising Candidate for Theranostic Applications. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57* (7), 1120–1123. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.170530>.
- (48) Study to Evaluate the Safety and Activity (Including Distribution) of 177Lu-3BP-227 in Subjects With Solid Tumours Expressing Neurotensin Receptor Type 1. - Tabular View - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT03525392> (accessed Apr 23, 2020).
- (49) Baum, R. P.; Singh, A.; Schuchardt, C.; Kulkarni, H. R.; Klette, I.; Wiessalla, S.; Osterkamp, F.; Reineke, U.; Smerling, C. <sup>177</sup>Lu-3BP-227 for Neurotensin Receptor 1–Targeted Therapy of Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma: First Clinical Results. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (5), 809–814. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.193847>.
- (50) Fani, M.; Del Pozzo, L.; Abiraj, K.; Mansi, R.; Tamma, M. L.; Cescato, R.; Waser, B.; Weber, W. A.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R. PET of Somatostatin Receptor-Positive Tumors Using <sup>64</sup>Cu- and <sup>68</sup>Ga-Somatostatin Antagonists: The Chelate Makes the Difference. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52* (7), 1110–1118. <https://doi.org/10.2967/jnumed.111.087999>.
- (51) Roosenburg, S.; Laverman, P.; Joosten, L.; Cooper, M. S.; Kolenc-Peitl, P. K.; Foster, J. M.; Hudson, C.; Leyton, J.; Burnet, J.; Oyen, W. J. G.; Blower, P. J.; Mather, S. J.; Boerman, O. C.; Sosabowski, J. K. PET and SPECT Imaging of a Radiolabeled Minigastrin Analogue Conjugated with DOTA, NOTA, and NODAGA and Labeled with (<sup>64</sup>Cu, <sup>68</sup>Ga, and <sup>111</sup>In). *Mol. Pharm.* **2014**, *11* (11), 3930–3937. <https://doi.org/10.1021/mp500283k>.
- (52) Lin, M.; Welch, M. J.; Lapi, S. E. Effects of Chelator Modifications on <sup>68</sup>Ga-Labeled [Tyr<sup>3</sup>]Octreotide Conjugates. *Mol. Imaging Biol.* **2013**, *15* (5), 606–613. <https://doi.org/10.1007/s11307-013-0627-x>.
- (53) Varasteh, Z.; Mitran, B.; Rosenström, U.; Velikyan, I.; Rosestedt, M.; Lindeberg, G.; Sörensen, J.; Larhed, M.; Tolmachev, V.; Orlova, A. The Effect of Macrocyclic Chelators on the Targeting Properties of the <sup>68</sup>Ga-Labeled Gastrin Releasing Peptide Receptor Antagonist PEG2-RM26. *Nucl. Med. Biol.* **2015**, *42* (5), 446–454. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2014.12.009>.
- (54) Banerjee, S. R.; Chen, Z.; Pullambhatla, M.; Lisok, A.; Chen, J.; Mease, R. C.; Pomper, M. G. Preclinical Comparative Study of <sup>68</sup>Ga-Labeled DOTA, NOTA, and HBED-CC Chelated Radiotracers for Targeting PSMA. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (6), 1447–1455. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00679>.
- (55) Mitran, B.; Thisgaard, H.; Rinne, S.; Dam, J. H.; Azami, F.; Tolmachev, V.; Orlova, A.; Rosenström, U. Selection of an Optimal Macrocyclic Chelator Improves the Imaging of Prostate Cancer Using Cobalt-Labeled GRPR Antagonist RM26. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 17086. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52914-y>.
- (56) Mitran, B.; Varasteh, Z.; Selvaraju, R. K.; Lindeberg, G.; Sörensen, J.; Larhed, M.; Tolmachev, V.; Rosenström, U.; Orlova, A. Selection of Optimal Chelator Improves the Contrast of GRPR Imaging Using Bombesin Analogue RM26. *Int. J. Oncol.* **2016**, *48* (5), 2124–2134. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3429>.
- (57) Altai, M.; Strand, J.; Rosik, D.; Selvaraju, R. K.; Eriksson Karlström, A.; Orlova, A.; Tolmachev, V. Influence of Nuclides and Chelators on Imaging Using Affibody Molecules: Comparative Evaluation of Recombinant Affibody Molecules Site-Specifically Labeled with <sup>68</sup>Ga and <sup>111</sup>In via Maleimido Derivatives of DOTA and NODAGA. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24* (6), 1102–1109. <https://doi.org/10.1021/bc300678y>.
- (58) Dahlsson Leitao, C.; Rinne, S. S.; Mitran, B.; Vorobyeva, A.; Andersson, K. G.; Tolmachev, V.; Ståhl, S.; Löfblom, J.; Orlova, A. Molecular Design of HER3-Targeting Affibody Molecules: Influence of Chelator and Presence of HEHEHE-Tag on Biodistribution of <sup>68</sup>Ga-Labeled Tracers. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (5). <https://doi.org/10.3390/ijms20051080>.
- (59) Malmberg, J.; Perols, A.; Varasteh, Z.; Altai, M.; Braun, A.; Sandström, M.; Garske, U.; Tolmachev, V.; Orlova, A.; Karlström, A. E. Comparative Evaluation of Synthetic Anti-HER2 Affibody Molecules Site-Specifically Labelled with <sup>111</sup>In Using N-Terminal DOTA, NOTA and NODAGA Chelators in Mice Bearing Prostate Cancer Xenografts. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39* (3), 481–492. <https://doi.org/10.1007/s00259-011-1992-9>.
- (60) Rinne, S. S.; Leitao, C. D.; Mitran, B.; Bass, T. Z.; Andersson, K. G.; Tolmachev, V.; Ståhl, S.; Löfblom, J.; Orlova, A. Optimization of HER3 Expression Imaging Using Affibody Molecules: Influence of Chelator for Labeling

with Indium-111. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 655. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36827-w>.

(61) Rinne, S. S.; Dahlsson Leitao, C.; Gentry, J.; Mitran, B.; Abouzayed, A.; Tolmachev, V.; Ståhl, S.; Löfblom, J.; Orlova, A. Increase in Negative Charge of 68Ga/Chelator Complex Reduces Unspecific Hepatic Uptake but Does Not Improve Imaging Properties of HER3-Targeting Affibody Molecules. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 17710. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54149-3>.

(62) Strand, J.; Honarvar, H.; Perols, A.; Orlova, A.; Selvaraju, R. K.; Karlström, A. E.; Tolmachev, V. Influence of Macrocyclic Chelators on the Targeting Properties of 68Ga-Labeled Synthetic Affibody Molecules: Comparison with 111In-Labeled Counterparts. *PLoS ONE* **2013**, *8* (8), e70028. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070028>.

(63) von Witting, E.; Garousi, J.; Lindbo, S.; Vorobyeva, A.; Altai, M.; Oroujeni, M.; Mitran, B.; Orlova, A.; Hober, S.; Tolmachev, V. Selection of the Optimal Macrocyclic Chelators for Labeling with 111In and 68Ga Improves Contrast of HER2 Imaging Using Engineered Scaffold Protein ADAPT6. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, *140*, 109–120. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.05.008>.

(64) Raavé, R.; Sandker, G.; Adumeau, P.; Jacobsen, C. B.; Mangin, F.; Meyer, M.; Moreau, M.; Bernhard, C.; Da Costa, L.; Dubois, A.; Goncalves, V.; Gustafsson, M.; Rijpkema, M.; Boerman, O.; Chambron, J.-C.; Heskamp, S.; Denat, F. Direct Comparison of the in Vitro and in Vivo Stability of DFO, DFO\* and DFOcyclo\* for 89Zr-ImmunoPET. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2019**, *46* (9), 1966–1977. <https://doi.org/10.1007/s00259-019-04343-2>.

(65) Moreau, M.; Poty, S.; Vrigneaud, J.-M.; Walker, P.; Guillemain, M.; Raguin, O.; Oudot, A.; Bernhard, C.; Goze, C.; Boschetti, F.; Collin, B.; Brunotte, F.; Denat, F. MANOTA: A Promising Bifunctional Chelating Agent for Copper-64 ImmunoPET. *Dalton Trans.* **2017**, *46* (42), 14659–14668. <https://doi.org/10.1039/C7DT01772C>.

(66) Price, T. W.; Greenman, J.; Stasiuk, G. J. Current Advances in Ligand Design for Inorganic Positron Emission Tomography Tracers 68Ga, 64Cu, 89Zr and 44Sc. *Dalton Trans.* **2016**, *45* (40), 15702–15724. <https://doi.org/10.1039/C5DT04706D>.

(67) Price, E. W.; Orvig, C. Matching Chelators to Radiometals for Radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (1), 260–290. <https://doi.org/10.1039/C3CS60304K>.

(68) Spang, P.; Herrmann, C.; Roesch, F. Bifunctional Gallium-68 Chelators: Past, Present, and Future. *Semin. Nucl. Med.* **2016**, *46* (5), 373–394. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2016.04.003>.

(69) Tsionou, M. I.; Knapp, C. E.; Foley, C. A.; Munteanu, C. R.; Cakebread, A.; Imberti, C.; Eykyn, T. R.; Young, J. D.; Paterson, B. M.; Blower, P. J.; Ma, M. T. Comparison of Macrocyclic and Acyclic Chelators for Gallium-68 Radiolabelling. *RSC Adv.* **2017**, *7* (78), 49586–49599. <https://doi.org/10.1039/C7RA09076E>.

(70) Cusnir, R.; Imberti, C.; Hider, R. C.; Blower, P. J.; Ma, M. T. Hydroxypyridinone Chelators: From Iron Scavenging to Radiopharmaceuticals for PET Imaging with Gallium-68. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (1), 116. <https://doi.org/10.3390/ijms18010116>.

(71) Hancock, R. D.; McDougall, G. J. The Macrocyclic Effect in Tetraaza-Macrocyclic Ligands. *Adv. Mol. Relax. Interact. Processes* **1980**, *18* (2), 99–108. [https://doi.org/10.1016/0378-4487\(80\)80030-6](https://doi.org/10.1016/0378-4487(80)80030-6).

(72) Clarke, E. T.; Martell, A. E. Stabilities of Trivalent Metal Ion Complexes of the Tetraacetate Derivatives of 12-, 13- and 14-Membered Tetraazamacrocycles. *Inorg. Chim. Acta* **1991**, *190* (1), 37–46. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)80229-7](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)80229-7).

(73) Kubiček, V.; Havlíčková, J.; Kotek, J.; Tircsó, G.; Hermann, P.; Tóth, É.; Lukeš, I. Gallium(III) Complexes of DOTA and DOTA-Monoamide: Kinetic and Thermodynamic Studies. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (23), 10960–10969. <https://doi.org/10.1021/ic101378s>.

(74) Velikyan, I.; Beyer, G. J.; Långström, B. Microwave-Supported Preparation of (68)Ga Bioconjugates with High Specific Radioactivity. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15* (3), 554–560. <https://doi.org/10.1021/bc030078f>.

(75) Eisenwiener, K. P.; Powell, P.; Mäcke, H. R. A Convenient Synthesis of Novel Bifunctional Prochelators for Coupling to Bioactive Peptides for Radiometal Labelling. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10* (18), 2133–2135. [https://doi.org/10.1016/S0960-894x\(00\)00413-3](https://doi.org/10.1016/S0960-894x(00)00413-3).

(76) Bernhard, C.; Moreau, M.; Lhenry, D.; Goze, C.; Boschetti, F.; Rousselin, Y.; Brunotte, F.; Denat, F. DOTAGA-Anhydride: A Valuable Building Block for the Preparation of DOTA-Like Chelating Agents. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18* (25), 7834–7841. <https://doi.org/10.1002/chem.201200132>.

(77) Velikyan, I.; Maecke, H.; Langstrom, B. Convenient Preparation of 68Ga-Based PET-



- Radiopharmaceuticals at Room Temperature. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (2), 569–573. <https://doi.org/10.1021/bc700341x>.
- (78) Eisenwiener, K.-P.; Prata, M. I. M.; Buschmann, I.; Zhang, H.-W.; Santos, A. C.; Wenger, S.; Reubi, J. C.; Mäcke, H. R. NODAGATOC, a New Chelator-Coupled Somatostatin Analogue Labeled with [67/68Ga] and [111In] for SPECT, PET, and Targeted Therapeutic Applications of Somatostatin Receptor (Hsst2) Expressing Tumors. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13* (3), 530–541. <https://doi.org/10.1021/bc010074f>.
- (79) Bartholomä, M. D. Recent Developments in the Design of Bifunctional Chelators for Metal-Based Radiopharmaceuticals Used in Positron Emission Tomography. *Inorg. Chim. Acta* **2012**, *Complete* (389), 36–51. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2012.01.061>.
- (80) Notni, J.; Hermann, P.; Havlíčková, J.; Kotek, J.; Kubíček, V.; Plutnar, J.; Loktionova, N.; Riss, P. J.; Rösch, F.; Lukes, I. A Triazacyclononane-Based Bifunctional Phosphinate Ligand for the Preparation of Multimeric 68Ga Tracers for Positron Emission Tomography. *Chemistry* **2010**, *16* (24), 7174–7185. <https://doi.org/10.1002/chem.200903281>.
- (81) Poty, S.; Désogère, P.; Šimeček, J.; Bernhard, C.; Goncalves, V.; Goze, C.; Boschetti, F.; Notni, J.; Wester, H. J.; Denat, F. MA-NOTMP: A Triazacyclononane Trimethylphosphinate Based Bifunctional Chelator for Gallium Radiolabelling of Biomolecules. *ChemMedChem* **2015**, *10* (9), 1475–1479. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500198>.
- (82) Viola, N. A.; Rarig, R. S.; Ouellette, W.; Doyle, R. P. Synthesis, Structure and Thermal Analysis of the Gallium Complex of 1,4,7,10-Tetraazacyclo-Dodecane-N,Nprime,NPrime,N-Tetraacetic Acid (DOTA). *Polyhedron* **2006**, *25* (18), 3457–3462.
- (83) Viola-Villegas, N.; Doyle, R. P. The Coordination Chemistry of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-Tetraacetic Acid (H4DOTA): Structural Overview and Analyses on Structure–Stability Relationships. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253* (13), 1906–1925. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.013>.
- (84) Roxin, Á.; Zhang, C.; Huh, S.; Lepage, M.; Zhang, Z.; Lin, K.-S.; Bénard, F.; Perrin, D. M. A Metal-Free DOTA-Conjugated <sup>18</sup>F-Labeled Radiotracer: [<sup>18</sup>F]DOTA-AMBF<sub>3</sub>-LLP2A for Imaging VLA-4 Over-Expression in Murine Melanoma with Improved Tumor Uptake and Greatly Enhanced Renal Clearance. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30* (4), 1210–1219. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00146>.
- (85) Alshoukr, F.; Prignon, A.; Brans, L.; Jallane, A.; Mendes, S.; Talbot, J.-N.; Tourwé, D.; Barbet, J.; Gruaz-Guyon, A. Novel DOTA-Neurotensin Analogues for 111In Scintigraphy and 68Ga PET Imaging of Neurotensin Receptor-Positive Tumors. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (7), 1374–1385. <https://doi.org/10.1021/bc200078p>.
- (86) Marengo, M.; Lodola, L.; Persico, M. G.; Frangipane, V.; Facoetti, A.; Aprile, C.; Hodolič, M. Evidence of 68Ga-DOTA-NT-20.3 Uptake in Pancreatic Adenocarcinoma AsPC-1 Cell Line - in Vitro Study. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2018**, *19* (9), 754–759. <https://doi.org/10.2174/1389201019666180829152314>.
- (87) Labeeuw, B.; Gully, D.; Jeanjean, F.; Molimard, J.-C.; Boigegrain, R. Patent 5,723,483. **1998**, 58.
- (88) Baxendale, I. R.; Cheung, S.; Kitching, M. O.; Ley, S. V.; Shearman, J. W. The Synthesis of Neurotensin Antagonist SR 48692 for Prostate Cancer Research. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (14), 4378–4387. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.04.075>.
- (89) Kurosawa, W.; Kan, T.; Fukuyama, T. Preparation of Secondary Amines from Primary Amines via 2-Nitrobenzenesulfonamides: N-(4-Methoxybenzyl)-3-Phenylpropylamine. *Org. Synth.* **2002**, *79*, 186. <https://doi.org/10.15227/orgsyn.079.0186>.
- (90) Battilocchio, C.; Deadman, B. J.; Nikbin, N.; Kitching, M. O.; Baxendale, I. R.; Ley, S. V. A Machine-Assisted Flow Synthesis of SR48692: A Probe for the Investigation of Neurotensin Receptor-1. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19* (24), 7917–7930. <https://doi.org/10.1002/chem.201300696>.
- (91) Battilocchio, C.; Baxendale, I. R.; Biava, M.; Kitching, M. O.; Ley, S. V. A Flow-Based Synthesis of 2-Aminoadamantane-2-Carboxylic Acid. *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16* (5), 798–810. <https://doi.org/10.1021/op300084z>.
- (92) Paventi, M.; Chubb, F. L.; Edward, J. T. Assisted Hydrolysis of the Nitrile Group of 2-Aminoadamantane-2-Carbonitrile. *Can. J. Chem.* **1987**, *65* (9), 2114–2117. <https://doi.org/10.1139/v87-351>.
- (93) Lang, C.; Gmeiner, P. Efficient Synthesis of Heterocyclic Neurotensin Receptor Ligands by Microwave-Assisted Aminocarbonylation. *Synthesis* **2013**, *45*, 2474–2480.

- (94) Vita, N.; Laurent, P.; Lefort, S.; Chalon, P.; Dumont, X.; Kaghad, M.; Gully, D.; Le Fur, G.; Ferrara, P.; Caput, D. Cloning and Expression of a Complementary DNA Encoding a High Affinity Human Neurotensin Receptor. *FEBS Lett.* **1993**, *317* (1–2), 139–142. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81509-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81509-x).
- (95) Velikyan, I. 68Ga-Based Radiopharmaceuticals: Production and Application Relationship. *Molecules* **2015**, *20* (7), 12913–12943. <https://doi.org/10.3390/molecules200712913>.
- (96) Meyer, G.-J.; Mäcke, H.; Schuhmacher, J.; Knapp, W. H.; Hofmann, M. 68Ga-Labelled DOTA-Derivatised Peptide Ligands. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2004**, *31* (8), 1097–1104. <https://doi.org/10.1007/s00259-004-1486-0>.
- (97) Rösch, F. (68)Ge/ (68)Ga Generators: Past, Present, and Future. *Recent Results Cancer Res.* **2013**, *194*, 3–16. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-27994-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-27994-2_1).
- (98) Mueller, D.; Klette, I.; Baum, R. P. Purification and Labeling Strategies for (68)Ga from (68)Ge/ (68)Ga Generator Eluate. *Recent Results Cancer Res.* **2013**, *194*, 77–87. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-27994-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-27994-2_5).
- (99) Breeman, W. A. P.; de Jong, M.; de Blois, E.; Bernard, B. F.; Konijnenberg, M.; Krenning, E. P. Radiolabelling DOTA-Peptides with 68Ga. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2005**, *32* (4), 478–485. <https://doi.org/10.1007/s00259-004-1702-y>.
- (100) Zhernosekov, K. P.; Filosofov, D. V.; Baum, R. P.; Aschoff, P.; Bihl, H.; Razbash, A. A.; Jahn, M.; Jennewein, M.; Rösch, F. Processing of Generator-Produced 68Ga for Medical Application. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48* (10), 1741–1748. <https://doi.org/10.2967/jnumed.107.040378>.
- (101) Meisenheimer, M.; Kürpig, S.; Essler, M.; Eppard, E. Ethanol Effects on 68Ga-Radiolabelling Efficacy and Radiolysis in Automated Synthesis Utilizing NaCl Post-Processing. *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2019**, *4* (1), 26. <https://doi.org/10.1186/s41181-019-0076-1>.
- (102) Hacht, B. Gallium(III) Ion Hydrolysis under Physiological Conditions. *B. Korean Chem. Soc.* **2008**, *29* (2), 372–376. <https://doi.org/10.5012/BKCS.2008.29.2.372>.
- (103) Andrés, A.; Rosés, M.; Ràfols, C.; Bosch, E.; Espinosa, S.; Segarra, V.; Huerta, J. M. Setup and Validation of Shake-Flask Procedures for the Determination of Partition Coefficients (LogD) from Low Drug Amounts. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *76*, 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.05.008>.
- (104) Young, J. D.; Abbate, V.; Imberti, C.; Meszaros, L. K.; Ma, M. T.; Terry, S. Y. A.; Hider, R. C.; Mullen, G. E.; Blower, P. J. 68Ga-THP-PSMA: A PET Imaging Agent for Prostate Cancer Offering Rapid, Room-Temperature, 1-Step Kit-Based Radiolabeling. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (8), 1270–1277. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.191882>.



---

# CHAPITRE 3

Modification site-spécifique d'un fragment d'anticorps pour le diagnostic et la thérapie de cancers exprimant le récepteur à l'EGF

---





<b>CHAPITRE 3 - Modification site-spécifique d'un fragment d'anticorps pour le diagnostic et la thérapie de cancers exprimant le récepteur à l'EGF .....</b>	<b>- 193 -</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>- 197 -</b>
<b>I.1. Récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR).....</b>	<b>- 197 -</b>
I.1.1. Rôle physiologique.....	- 197 -
I.1.2. Rôle dans les cancers .....	- 198 -
I.1.3. Thérapie ciblée des récepteurs EGFR .....	- 198 -
I.1.4. Imagerie nucléaire des récepteurs EGFR .....	- 199 -
<b>I.2. Différentes techniques de bioconjugaison .....</b>	<b>- 202 -</b>
I.2.1. Modifications aléatoires .....	- 203 -
I.2.2. Modifications site-spécifiques.....	- 205 -
I.2.3. Réactions bioorthogonales et de chimie <i>click</i> .....	- 209 -
I.2.4. Double modification des protéines .....	- 213 -
<b>I.3. Présentation du projet.....</b>	<b>- 215 -</b>
<b>II. Résultats et discussion .....</b>	<b>- 216 -</b>
<b>II.1. Design du conjugué.....</b>	<b>- 216 -</b>
II.1.1. Choix de l'agent chélatant et du radionucléide.....	- 216 -
II.1.2. Choix de la sonde pour la thérapie photodynamique .....	- 217 -
II.1.3. Choix du vecteur.....	- 218 -
II.1.4. Stratégie de conjugaison pour la double modification site-spécifique du V <sub>H</sub> H 7D12....	- 220 -
<b>II.2. Synthèse et caractérisation du V<sub>H</sub>H théranostique .....</b>	<b>- 222 -</b>
II.2.1. Production du V <sub>H</sub> H 7D12 .....	- 222 -
II.2.2. Synthèse du V <sub>H</sub> H 7D12-BCN .....	- 223 -
II.2.3. Tests de réactivité.....	- 227 -
II.2.4. Préparation de la sonde bimodale .....	- 230 -
II.2.5. Bioconjugaison .....	- 231 -
II.2.6. Propriétés spectrales .....	- 234 -
<b>II.3. Radiomarquage.....</b>	<b>- 234 -</b>
<b>II.4. Évaluation du conjugué <i>in vitro</i>.....</b>	<b>- 235 -</b>
II.4.1. Affinité et internalisation .....	- 235 -
II.4.2. Évaluation de l'efficacité de la PDT.....	- 236 -
<b>II.5. Évaluation du conjugué <i>in vivo</i> .....</b>	<b>- 238 -</b>
<b>III. Conclusion et perspectives .....</b>	<b>- 239 -</b>
<b>Références.....</b>	<b>- 241 -</b>



## I. Introduction

### I.1. Récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR)

#### I.1.1. Rôle physiologique

La famille des récepteurs au facteur de croissance épidermique humain (*human epidermal growth factor receptor*) comprend quatre récepteurs homologues : HER1 (aussi connu sous le nom de EGFR ou erbB1), HER2 (erbB2 ou HER2/neu), HER3 (erbB3) et HER4 (erbB4). Ces récepteurs font partie de la famille des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase (RTK).<sup>1</sup> Ces récepteurs sont des glycoprotéines transmembranaires à une seule sous-unité, constituées d'un domaine N-terminal extracellulaire portant le site de liaison au ligand, un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal intracellulaire portant l'activité catalytique tyrosine kinase. En réponse à des signaux extracellulaires, ces récepteurs activent de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. Ces protéines sont largement exprimées et jouent un rôle important dans le développement de tissus épithéliaux, mésenchymateux ou encore nerveux tels que le cerveau, la peau, les poumons et le tractus gastro-intestinal.<sup>1</sup> Lors de la fixation du ligand au domaine extracellulaire des récepteurs, ils subissent un changement de conformation qui favorise leur dimérisation en formant des homodimères ou des hétérodimères (Figure 114). L'activation des récepteurs est suivie d'une transphosphorylation des résidus tyrosines de leur domaine intracellulaire, devenant reconnaissable par de nombreuses molécules de signalisation. Plusieurs voies de signalisation intracellulaire vont être activées dont la voie Ras/MAPK, la voie PI3K/Akt, la voie JAK/STAT, et la voie phospholipase C (PLC/PKC), qui affectent *in fine* la prolifération, la croissance, la survie, la motilité et l'adhésion des cellules.<sup>1-3</sup>

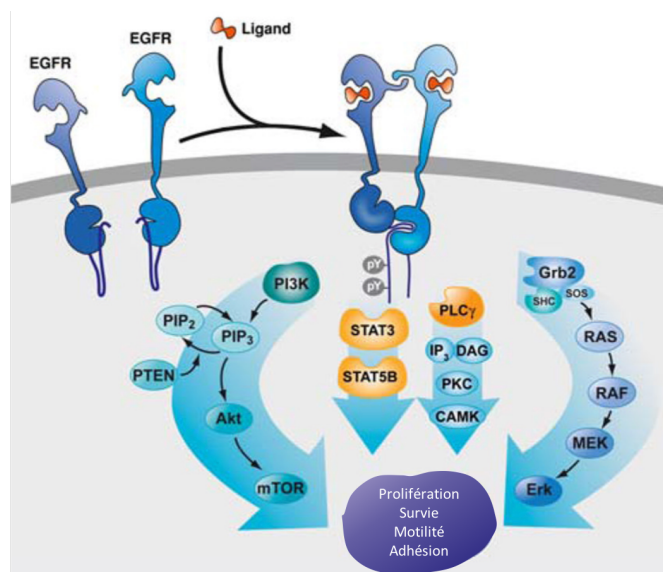


Figure 114. Représentation des voies de signalisation activées par les récepteurs HER ; figure adaptée d'article.<sup>4</sup>

### I.1.2. Rôle dans les cancers

De par leur implication dans de nombreux processus cellulaires, la dérégulation des voies de signalisation des HER conduit à de nombreuses maladies, et notamment les cancers.<sup>1,5-7</sup> Les récepteurs EGFR sont impliqués principalement dans les glioblastomes (EGFR est surexprimé dans près de la moitié des glioblastomes),<sup>8</sup> les cancers du poumon non à petites cellules<sup>9</sup> et le cancer du côlon, mais concernent aussi de nombreux autres organes tels que le sein, la prostate, l'œsophage, le pancréas, l'utérus et les ovaires, les reins, la vessie et les cancers gastriques.<sup>4,10-15</sup>

EGFR a été le premier récepteur à activité tyrosine kinase caractérisé ainsi que l'un des premiers proto-oncogènes identifiés.<sup>16</sup> Différents modes d'activation du récepteur EGFR ont été décrits :<sup>1-4,17</sup>

- surexpression du récepteur par amplification des gènes codant pour EGFR, augmentation de la transcription, ou stabilisation de la protéine par inhibition de son internalisation ou de sa dégradation ;
- mutations entraînant l'activation constitutive du récepteur (par mutation/délétion du domaine extracellulaire ou kinase). Ces mutations sont présentes dans 10 à 15% des cancers du poumon non à petites cellules aux États-Unis et 30 à 50% en Asie ;
- augmentation de l'expression des ligands ;
- auto-activation par une boucle autocrine (certaines lignées de cellules cancéreuses exprimant EGFR sécrètent elles-mêmes l'EGF).<sup>18</sup>

Toutes ces modifications sont responsables de la suractivation des voies de signalisation impliquées dans le développement de cancers et favorisent donc la tumorigenèse. L'activation d'EGFR conduit à une augmentation de la prolifération et de la mobilité cellulaire, une diminution de l'apoptose, et potentiellement le développement de l'angiogenèse.<sup>4</sup>

La surexpression d'EGFR et sa suractivation sont corrélées à un mauvais pronostic, une résistance aux traitements et au développement de métastases.<sup>10</sup>

Tous ces paramètres font des récepteurs EGFR de bonnes cibles pour la détection et la thérapie de tumeurs les surexprimant.

### I.1.3. Thérapie ciblée des récepteurs EGFR

Les thérapies visant EGFR ont pour but soit de bloquer ces récepteurs, en bloquant la liaison du ligand au récepteur ou la dimérisation, favorisant ainsi l'internalisation du récepteur et sa dégradation, soit de bloquer l'activité tyrosine kinase.

Deux classes de médicaments ont montré une bonne efficacité clinique. L'une est constituée d'anticorps monoclonaux qui ciblent le domaine de fixation du ligand. Le cétuximab (Erbix<sup>®</sup>) et le panitumumab (Vectibix<sup>®</sup>) sont pour le moment les seuls anticorps anti-EGFR approuvés par la FDA et sont utilisés pour le traitement des cancers du côlon et les glioblastomes.<sup>19</sup> Ces

thérapies, à base d'anticorps monoclonaux, sont hautement sélectives car les anticorps sont capables de se lier à un membre de la famille des HER, mais pas aux autres. Ces deux anticorps se fixent sur deux épitopes différents. Ils empêchent la liaison du ligand et la dimérisation, et engendrent l'internalisation et la dégradation du récepteur. Le cétuximab a été le premier anticorps anti-EGFR mis au point pour un usage clinique. Il est maintenant couramment utilisé en association avec la chimiothérapie et la radiothérapie.

L'autre classe de traitements est constituée de petites molécules. Ces médicaments sont appelés inhibiteurs de tyrosine kinase car ils bloquent la fonction catalytique du domaine kinase intracellulaire. Le gefitinib (Iressa®), l'erlotinib (Tarceva®) et le lapatinib (Tyverb®) sont approuvés par la FDA pour le cancer du poumon, le cancer pancréatique et le cancer du sein.<sup>1,4</sup> Ces inhibiteurs sont moins spécifiques que les anticorps et peuvent donc agir sur différents récepteurs HER. Le gefitinib et l'erlotinib sont les plus sélectifs pour EGFR, tandis que le lapatinib cible à la fois EGFR et le HER2.

Bien que les thérapies ciblées du récepteur à l'EGF montrent de bons résultats pour le traitement de différents cancers, des mécanismes de résistances peuvent apparaître au cours du traitement.<sup>20</sup> La plupart sont des mutations dans le domaine kinase qui bloquent la liaison des inhibiteurs.<sup>21,22</sup> Des mutations peuvent aussi avoir lieu dans le domaine extracellulaire empêchant la liaison de l'anticorps au récepteur.<sup>23</sup> Enfin, les cellules tumorales peuvent développer la capacité de réactiver des voies de signalisation, telles que la voie PI3K, par divers mécanismes malgré le blocage du récepteur par des anticorps.<sup>24</sup>

Une grande partie des recherches porte sur ces deux classes de médicaments et a pour objectif d'inhiber plus efficacement les voies de signalisation en développant de nouveaux anticorps, des anticorps bispécifiques,<sup>25,26</sup> et de nouveaux inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase capables d'agir sur les lignées résistantes.

#### I.1.4. Imagerie nucléaire des récepteurs EGFR

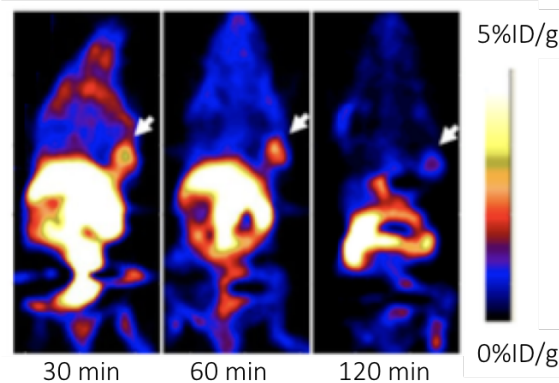
Au vu de la surexpression des récepteurs EGFR dans de nombreux cancers, du mauvais pronostic lié à leur expression et des problèmes de résistance aux différents traitements, il est important d'identifier les patients atteints de tumeurs exprimant EGFR afin de les faire bénéficier d'une thérapie dirigée contre EGFR et de proposer des traitements alternatifs à ceux qui ne peuvent pas en bénéficier. À ce jour, les techniques permettant d'identifier la présence des récepteurs EGFR et la résistance aux thérapies reposent sur des biopsies invasives, suivies de l'analyse des échantillons par immunohistochimie. Cependant, l'expression de EGFR est hétérogène (au sein même de la tumeur primaire et dans les métastases) et elle varie au cours du développement de la maladie, ce qui signifie qu'il est nécessaire de réaliser des biopsies à plusieurs reprises pour pouvoir avoir un aperçu relativement correct de l'expression des EGFR. Contrairement à la biopsie, l'imagerie moléculaire, avec des sondes ciblant EGFR, permet une évaluation non invasive, dans tout le

corps et en temps réel, de l'expression des EGFR. Il est donc intéressant d'utiliser cette technique pour la sélection des patients.

L'imagerie nucléaire ciblée des récepteurs EGFR a été réalisée par de nombreuses équipes en marquant l'EGF (ligand protéique naturel de EGFR), des anticorps monoclonaux, des fragments d'anticorps, des Affibodies et des petites molécules avec différents radionucléides permettant l'imagerie TEMP et TEP.<sup>27</sup>

### **EGF (Epidermal growth factor)**

L'EGF est une petite protéine d'environ 6.4 kDa. Des équipes l'ont marquée au gallium-68, au fluor-18 ou à l'indium-111.<sup>28-30</sup> En général, la tumeur est visible en imagerie mais une grande partie du signal est observée dans des organes sains tels que les reins, le foie, les poumons, les intestins ; conduisant à de faibles ratios tumeur/organe (Figure 115).

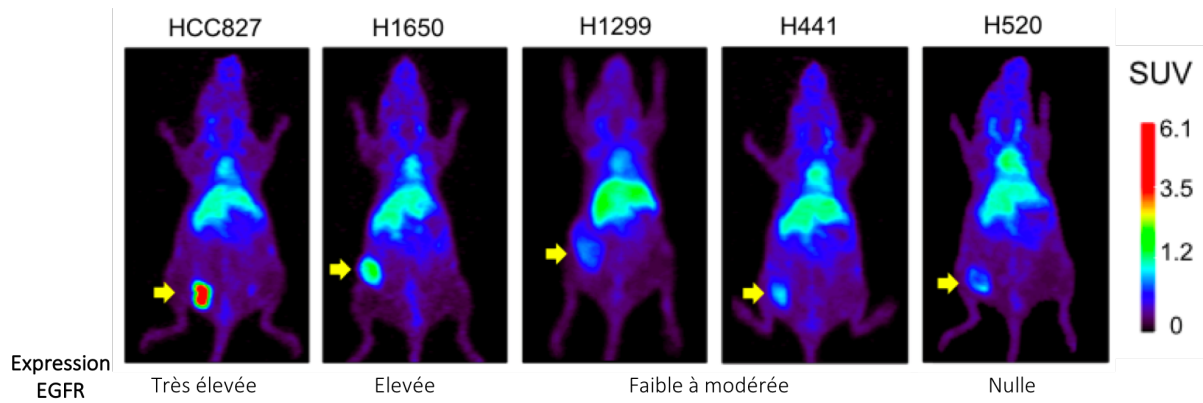


**Figure 115.** Images TEP de souris portant une xénogreffe de carcinome épidermoïde (UM-SCC1) à 30 min, 1 h et 2 h après l'injection d'un composé basé sur la structure de l'EGF et marqué au fluor-18 ; figure extraite d'article.<sup>29</sup>

La comparaison du comportement de deux composés (EGF et anticorps) marqués à l'indium-111 grâce à un DTPA, a montré une bien meilleure accumulation tumorale avec l'anticorps (21.6%ID/g vs 2.2%ID/g) conduisant à des contrastes et ratios tumeur/organe nettement supérieurs.<sup>30</sup>

### **Anticorps entiers**

La majorité des études utilisant les anticorps monoclonaux est basée sur le cetuximab<sup>31-36</sup> ou le panitumumab,<sup>37-40</sup> marqués au zirconium-89, à l'indium-111, à l'iode-125 ou au cuivre-64. De façon générale, l'accumulation dans les tumeurs est élevée mais la clairance sanguine est lente, conduisant à un bruit-de-fond important aux temps précoces. Une forte accumulation du radiotraceur est observée dans le foie et de bons contrastes ne peuvent être obtenus qu'à de longs temps après l'injection (quelques jours) (Figure 116).

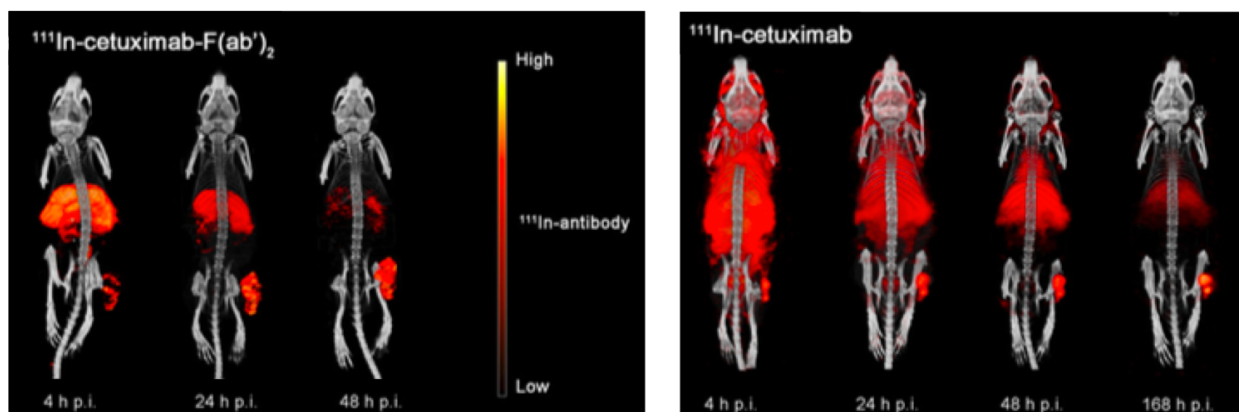


**Figure 116.** Images TEP de souris portant des xénogreffes de cancer du poumon non à petites cellules exprimant des taux variables d'EGFR, 48 h après l'injection de  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTA-cétuximab}$  ; figure adaptée d'article.<sup>31</sup>

L'intensité du signal observée dans la tumeur est assez peu représentative du taux d'EGFR exprimé par les cellules. En effet, plusieurs études ont montré qu'une accumulation du radiotracer peut être meilleure dans des cellules exprimant peu EGFR.<sup>41,42</sup> Cependant, pour les composés à base de cétuximab, une forte corrélation entre l'accumulation tumorale et la réponse au traitement est observée, suggérant l'imagerie TEP au  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-cétuximab}$  comme une méthode permettant la sélection des patients pour le traitement au cetuximab.<sup>33,43</sup>

### Fragments d'anticorps

De nombreuses études se sont portées sur l'utilisation de fragments d'anticorps de types  $\text{F(ab')}_2$ ,<sup>44-46</sup> Fab<sup>47,48</sup> et nanobody<sup>49-51</sup> afin de conserver la bonne affinité pour EGFR, accélérer la clairance du sang et des tissus sains et favoriser l'excrétion rénale. Ces études montrent de bons résultats avec de bonnes accumulations tumorales et une clairance plus rapide, permettant d'obtenir de meilleurs contrastes à des temps courts après l'injection du radiotracer (Figure 117). Le signal est tout de même retrouvé en partie dans le foie et dans les reins.

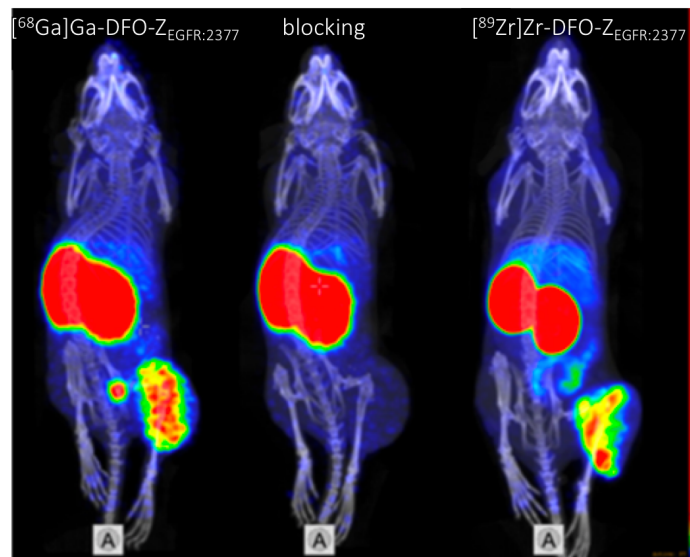


**Figure 117.** Images TEMP/CT de souris portant des xénogreffes FaDu à 4 h, 24 h, 48 h et 168 h après l'injection de  $[^{111}\text{In}]\text{In-cétuximab-F(ab')}_2$  (fragment d'anticorps, gauche) ou  $[^{111}\text{In}]\text{In-cétuximab}$  (anticorps entier, droite) ; figure adaptée d'article.<sup>45</sup>



### **Affibody**

Des molécules de type Affibodies ont été marquées avec des radionucléides possédant des périodes radioactives relativement courtes ( $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ )<sup>52-55</sup> ou plus longues ( $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{111}\text{In}$ ).<sup>56,57</sup> Ces études ont permis la bonne visualisation des tumeurs avec de bons contrastes à des temps courts après l'injection malgré un signal important observé au niveau des reins et parfois du foie (Figure 118).



**Figure 118.** Images TEP/CT de souris portant des xénogreffes A431 à 3 h après l'injection de  $^{68}\text{Ga}$ ]-DFO-ZEGFR:2377 (gauche),  $^{68}\text{Ga}$ ]-DFO-ZEGFR:2377, 24 h après l'injection de 10 mg de cetuximab (milieu) et  $^{89}\text{Zr}$ ]-DFO-ZEGFR:2377 (droite) ; figure extraite d'article.<sup>55</sup>

### **Petites molécules**

Enfin, des petites molécules marquées au fluor-18, carbone-11 ou technétium-99m ont permis la bonne visualisation de tumeurs en préclinique et en étude clinique malgré un signal important dans de nombreux tissus sains.<sup>58-61</sup>

Toutes ces études indiquent que l'imagerie ciblant EGFR pourrait permettre la détermination de l'expression de ces récepteurs afin de sélectionner les patients éligibles pour la thérapie mais aussi de stadifier la maladie et évaluer la réponse thérapeutique.

Pour ce projet, nous avons choisi de travailler avec un fragment d'anticorps.

## I.2. Différentes techniques de bioconjugaison

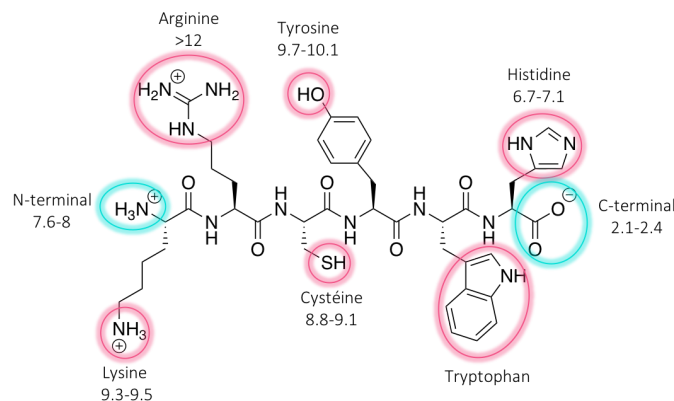
La formation d'une liaison covalente entre une biomolécule (protéines, acides nucléiques, lipides, glucides, ...) et une autre molécule est appelée bioconjugaison. Le couplage de molécules d'intérêt (sondes imageantes, molécules thérapeutiques, groupements

solubilisants, ...) sur une protéine est une étape assez complexe. En effet, les protéines sont des molécules sensibles et il est donc nécessaire que les réactions soient réalisées dans des conditions douces, c'est-à-dire à des températures aux alentours de 37 °C, à des pH proches de la neutralité, et dans des solutions aqueuses afin de préserver la structure de la protéine et ses propriétés. De plus, la technique utilisée pour l'étape de bioconjugaison va déterminer les propriétés pharmacocinétiques finales du conjugué. Ces dernières années, de nombreuses études ont permis le développement d'un grand nombre de techniques de bioconjugaison que nous allons décrire brièvement.

### I.2.1. Modifications aléatoires

On parle de modification aléatoire (ou modification non spécifique) lorsque la conjugaison de la molécule d'intérêt à la protéine se fait par réaction avec les acides aminés naturellement présents en différentes positions de la protéine.

Les protéines contiennent de nombreux sites potentiellement réactifs pour la conjugaison de la molécule d'intérêt. Une revue de Koniev et Wagner recense la majorité des réactions de bioconjugaison ciblant les acides aminés protéinogéniques.<sup>62</sup> Les acides aminés les plus utilisés sont ceux contenant des fonctions nucléophiles, principalement les lysines et les cystéines. (Figure 119).



**Figure 119.** Représentation d'un peptide rassemblant tous les acides aminés présentant des fonctions nucléophiles susceptibles de réagir avec des fonctions de bioconjugaison électrophiles. Les pKa des groupements fonctionnels sont indiqués.

Les amines peuvent être modifiées, entre autres, par réaction avec des isocyanates ou des isothiocyanates (NCS), des esters activés (NHS, fluorophényle), des carbonates de succinimidyle ou de *p*-nitrophénol, des chlorures de sulfonyle ou des anhydrides cycliques (Figure 120). De façon plus rare, les amines peuvent aussi réagir avec des azotures d'acyles, des aldéhydes, des époxydes, des imidoesters, etc.<sup>62</sup>

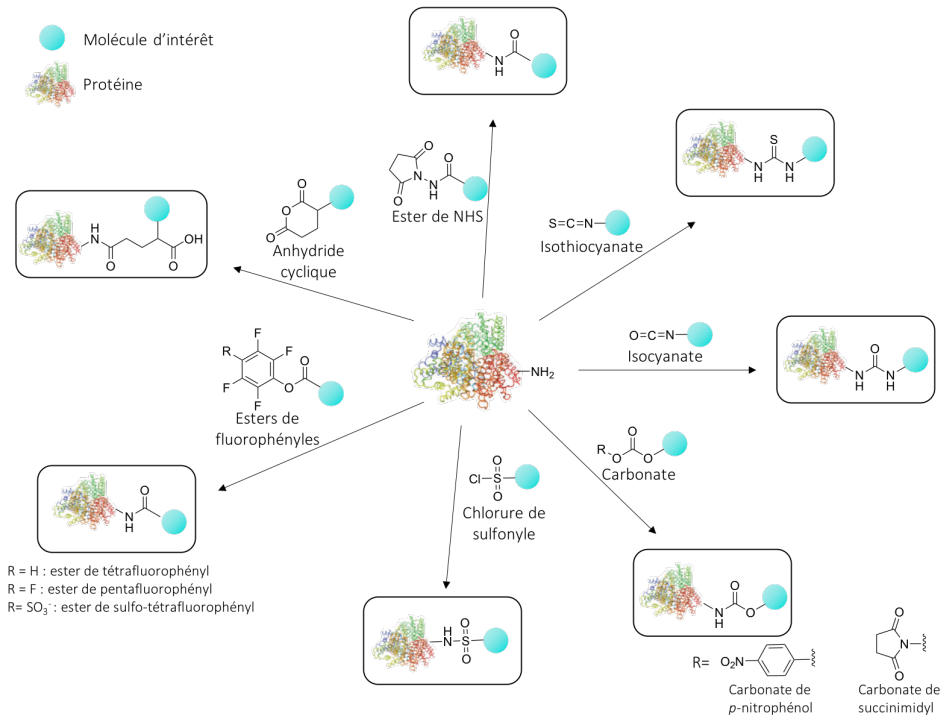


Figure 120. Principales réactions ciblant les amines pour introduire une molécule d'intérêt.

À ce jour, du fait de sa simplicité de mise en œuvre, le marquage aléatoire des fonctions amines est la méthode la plus couramment utilisée, bien que son utilisation tende à diminuer en raison de ses nombreux inconvénients.

En effet, les protéines sont constituées d'un grand nombre de lysines réactives, qui peuvent conduire, lors de la bioconjugaison, à la formation d'un mélange très hétérogène de conjugués, de par le nombre de molécules d'intérêt introduites et leur localisation sur la protéine. Par exemple, une étude a montré que lors de la conjugaison aléatoire d'une molécule d'intérêt, sous forme d'ester de NHS, à un anticorps, les conjugués obtenus peuvent présenter de 0 à 6 molécules d'intérêt, et près de 40 lysines différentes (sur les 86 lysines présentes) peuvent être modifiées, conduisant à la formation de plus de 4.5 millions de molécules différentes.<sup>63</sup> Ce manque de contrôle peut entraîner une diminution de l'affinité pour la cible, voire une perte complète de reconnaissance, si la conjugaison a lieu au niveau du paratope. De plus, des différences de propriétés pharmacocinétiques et des problèmes d'agrégation peuvent être observés si le nombre de molécules d'intérêt greffées est trop élevé. Il est possible de contrôler le taux de greffage en jouant sur différents paramètres (nombre d'équivalents de molécule d'intérêt mis en jeu, pH, température, temps de réaction...) mais cela conduit tout de même à des mélanges hétérogènes, peu reproductibles et difficilement prédictibles quant aux propriétés pharmacocinétiques.

Ces dernières années, de nombreuses équipes se sont donc intéressées au développement d'approches permettant de mieux contrôler le nombre et la position des molécules introduites. On parle alors de marquage site-spécifique.

## I.2.2. Modifications site-spécifiques

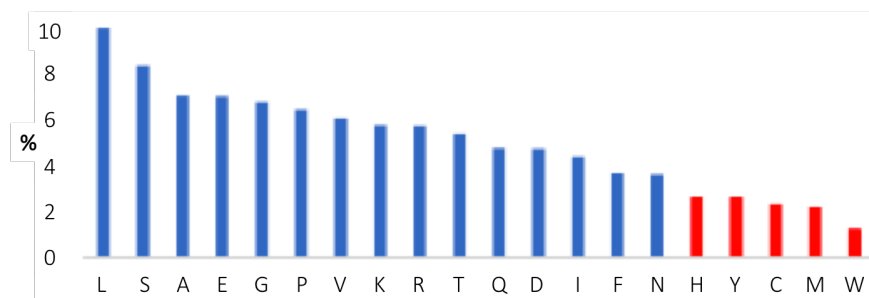
Les stratégies de modifications site-spécifiques offrent un certain nombre d'avantages par rapport aux méthodes de modifications aléatoires. Tout d'abord, elles permettent de produire, de manière reproductible, des conjugués mieux définis et plus homogènes. De plus, ces procédures spécifiques permettent de contrôler avec précision la localisation des molécules d'intérêt sur la protéine, ce qui empêche la modification accidentelle du paratope.<sup>64</sup>

Un certain nombre d'études a révélé que les conjugués modifiés de manière site-spécifique présentent un meilleur comportement *in vivo*, avec une pharmacocinétique plus favorable, une plus grande accumulation dans les tissus cibles et une absorption plus faible dans les tissus sains.<sup>65,66</sup>

De nombreuses techniques sont désormais disponibles pour réaliser une modification site-spécifique.<sup>67-69</sup> Nous ne présenterons brièvement que les approches les plus communément utilisées.

### **Modification des acides aminés rares**

Tout d'abord, il est possible de cibler les acides aminés rares. En effet, tous les acides aminés ne sont pas présents en même proportion dans les protéines (Figure 121). Le marquage sélectif de ces résidus (histidines, tyrosines, cystéines, méthionines et tryptophanes) permet de mieux contrôler le nombre de molécules d'intérêt introduites sur la protéine.



**Figure 121.** Proportion des acides aminés présents dans le protéome humain.

Les cystéines sont les résidus les plus utilisés. En effet, elles ne comptent que pour 2.3% des acides aminés et une grande partie est engagée dans la formation de ponts disulfures, contribuant à la structuration de la protéine.

La modification des cystéines est très utilisée car les thiols présentent une forte nucléophilie, surtout sous forme thiolate, dépassant la réactivité de toute autre fonction nucléophile des protéines. Les groupements thiols peuvent être directement disponibles, sous forme réduite, ou présents sous une forme oxydée (ponts disulfures). Dans ce cas, l'ajout d'un agent réducteur permet de libérer les thiols. De nombreuses réactions sont utilisées pour modifier

les cystéines, les principales étant les réactions avec des maléimides ou bromomaléimides, des  $\alpha$ -halo-carbonyles électrophiles de type iodoacétamide, des vinyl sulfones, la réaction avec des disulfures, ou encore les couplage thiol-ène ou thiol-yne. (Figure 122).<sup>62</sup>

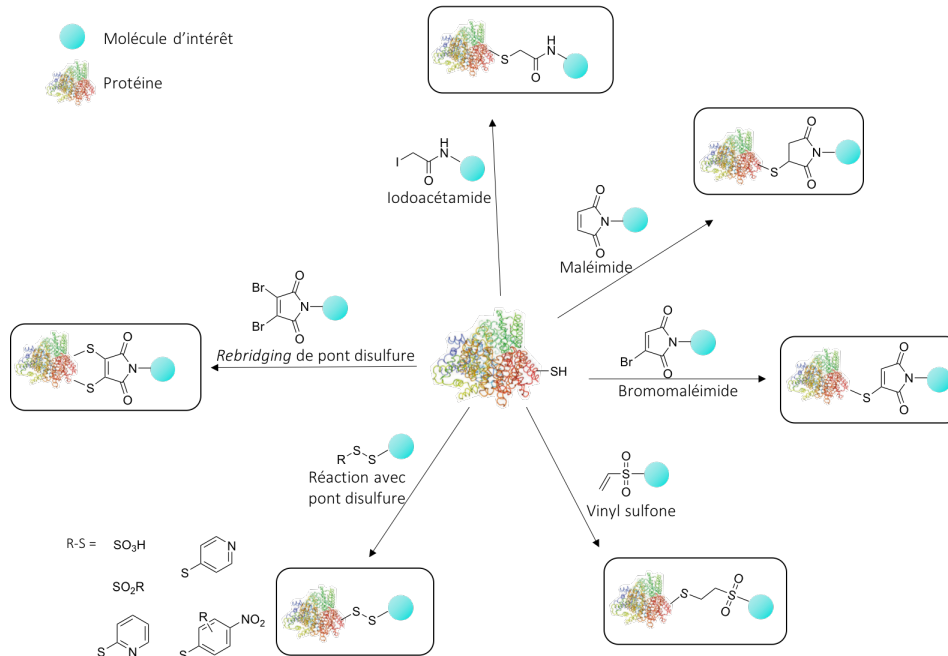


Figure 122. Principales réactions ciblant les thiols pour introduire une molécule d'intérêt.

Pour la modification des acides aminés rares, deux approches sont envisageables :

- l'utilisation des acides aminés présents dans la protéine native. Il faut dans ce cas qu'ils soient présents en faible quantité et que leur position soit accessible et hors du site de reconnaissance de l'antigène d'intérêt ;
- l'introduction d'acides aminés souhaités par bioingénierie, permettant de parfaitement contrôler le nombre de sondes introduites et leur localisation.<sup>67</sup> Cette approche concerne surtout les petites protéines recombinantes (Affibodies, nanobodies).

Enfin, une autre technique utilisée est la modification de l'amine N-terminale. En effet, son pKa est différent des autres amines, il est donc possible de la faire réagir sélectivement à des pH autour de 7, sans modifier les amines  $\epsilon$  des résidus lysine.<sup>70</sup>

### Introduction d'acides aminés non naturels

Une autre approche consiste à introduire des acides aminés portant des groupements fonctionnels non présents dans les protéines natives (cétones, azotures, alcènes ou alcynes par exemple).<sup>71,72</sup> Les acides aminés les plus couramment utilisés sont la *p*-acéto-L-phénylalanine et la *p*-azido-L-phénylalanine (Figure 123). Ces acides aminés peuvent être

introduits par bioingénierie dans des cellules modifiées (nécessité d'introduire une machinerie biosynthétique complexe pour que les cellules puissent être en mesure d'incorporer ces acides aminés artificiels lors de la traduction) ou dans des systèmes d'expression de protéines sans cellules, ce qui limite un peu la complexité de mise en œuvre.<sup>68,69</sup>

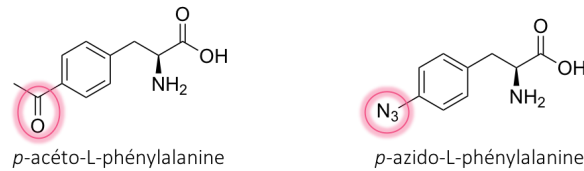


Figure 123. Structure des acides aminés non naturels les plus utilisés.

### Modification des sites de glycosylation

Les anticorps IgG contiennent deux sites de glycosylation sur leur domaine C<sub>H2</sub>. Après la traduction de la protéine, des enzymes (glycotransférases) vont greffer différents monosaccharides sur ces sites de glycosylation (Figure 124A). La modification de cette chaîne de glycanes est intéressante car la réactivité des sucres diffère de celle des acides aminés. De plus, leur localisation loin du paratope, permet une modification n'impactant pas le domaine de reconnaissance de l'anticorps.

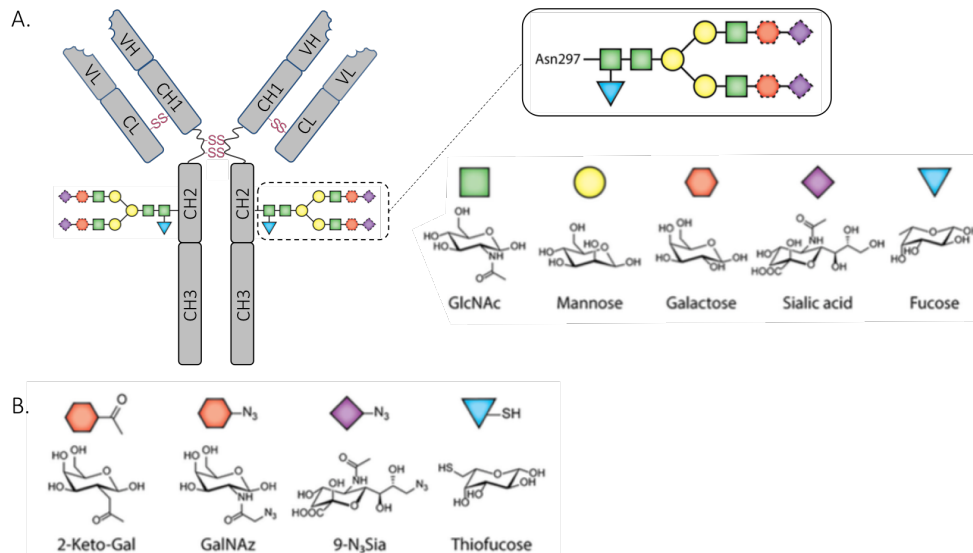


Figure 124. A. Structure d'un anticorps glycosylé et structure des monosaccharides naturels. Les pointillés autour de certains résidus indiquent que ces sucres ne sont pas toujours présents ; B. Structure des monosaccharides non naturels ; figure adaptée de revue.<sup>67</sup>

Deux techniques sont classiquement utilisées pour modifier cette chaîne de saccharides. La première est de les oxyder pour former des fonctions aldéhydes qui peuvent ensuite réagir sélectivement avec des fonctions hydroxylamines ou hydrazines portées par la molécule d'intérêt. Sinon, il est désormais possible de modifier la chaîne de glycanes, par voie

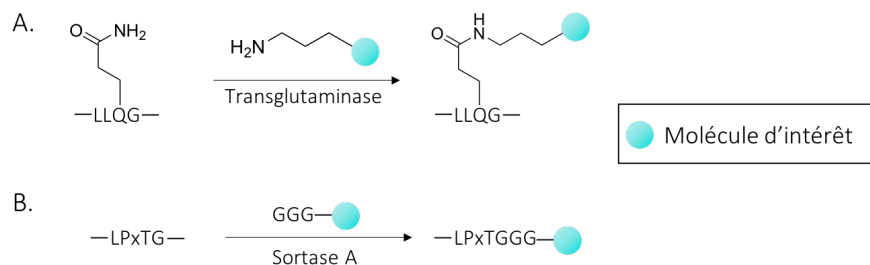
enzymatique, pour y introduire des monosaccharides non naturels porteurs de groupements réactifs bioorthogonaux (Figure 124B).<sup>67,69</sup>

### Introduction de tags peptidiques

Depuis le développement de la bioconjugaison, de nombreuses enzymes mutées ont été développées dans le but de modifier les protéines. En effet, il est possible d'introduire, par ingénierie génétique, de petites séquences d'acides aminés, aussi appelées *tags* peptidiques, au sein d'une protéine. Ce *tag* peut ensuite être reconnu par une enzyme qui va spécifiquement introduire une molécule d'intérêt au niveau de celui-ci. Plusieurs enzymes sont utilisées, les principales étant les transglutaminases et la sortase A.<sup>68,69</sup>

Les transglutaminases reconnaissent une séquence d'acides aminés LLQG et catalysent la création d'une liaison isopeptidique entre le groupement carboxamide des résidus glutamines et une amine primaire portée par la molécule d'intérêt (Figure 125A).

Sur le même principe, la sortase A (SrtA) reconnaît une séquence LPxTG (x = D, E, A, N, Q, R), hydrolyse la liaison amide entre la thréonine et la glycine, puis catalyse la formation d'une liaison peptidique entre l'acide carboxylique de la thréonine et l'amine d'une glycine portée par la molécule d'intérêt (Figure 125B). L'une des limitations ici est la réversibilité de la réaction car le produit formé contient également la séquence LPxTG.



**Figure 125.** A. Représentation du fonctionnement de la transglutaminase ; B. Représentation du fonctionnement de la sortase A.

Cette méthode de conjugaison, basée sur des *tags* peptidiques, fait appel à des réactions de modification enzymatique et nécessitent, par conséquent, des étapes de purification après le traitement enzymatique. Une façon de contourner ces étapes de purification est de créer génétiquement des protéines de fusion dans lesquelles la protéine d'intérêt et l'enzyme de modification sont combinées (SNAP tag, intéines).<sup>68</sup>

Pour résumer, chacune de ces techniques présentent des avantages et des limitations concernant la localisation des sites de modifications, la modularité de l'approche (nécessité de bioingénierie ou non), le type de protéine concerné (anticorps, fragments d'anticorps), etc. La Figure 126 vise à résumer ces caractéristiques.

Avantages		Limitations
Pas de bioingénierie, modulable, utilisable sur tous types de protéines	Modifications d'acides aminés rares natifs	Difficile de contrôler la localisation, formation de liaison pas toujours stables (maléimide)
Contrôle de la position de la modification, utilisable sur tous types de protéines	Modifications d'acides aminés rares introduits	Nécessite de la bioingénierie, peu modulable, formation de liaisons pas toujours stables (maléimide)
Contrôle de la position et du nombre de modifications, utilisable sur tous types de protéines	Introduction d'acides aminés non naturels	Nécessite de la bioingénierie avancée
Pas de bioingénierie, modulable, contrôle de la position de la modification	Modifications des sites de glycosylation par oxydation	Risque d'oxydation des méthionines, utilisable que sur les protéines possédant les glycanes
Réactions très sélectives, contrôle de la position de la modification	Modifications des sites de glycosylation par insertion de monosaccharides non naturels	Nécessite de la bioingénierie, peu modulable, utilisable que sur les protéines possédant les glycanes
Contrôle de la position, utilisable sur tous types de protéines, réactions sélectives	Utilisation de <i>tags</i> peptidiques	Nécessite de la bioingénierie, peu modulable

Figure 126. Résumé des avantages et limitations de chaque technique ; figure adaptée de revue.<sup>68</sup>

### 1.2.3. Réactions bioorthogonales et de chimie *click*

Lors de la modification site-spécifique des protéines, des fonctions de type alcène, alcyne, azoture ou tétrazine peuvent être introduites afin d'être engagées dans des réactions dites « bioorthogonales », ou de « chimie *click* ».

On appelle réactions bioorthogonales des réactions qui peuvent se produire à l'intérieur des systèmes vivants sans interférer avec les processus biochimiques natifs.<sup>73</sup> C'est-à-dire qu'elles doivent être réalisables en conditions aqueuses, tolérantes aux variations de pH ou du potentiel redox pouvant avoir lieu au sein des cellules et sans interférences avec les différentes fonctions biologiques.

Le terme chimie *click* définit des réactions réalisables dans des conditions simples (idéalement le procédé doit être insensible à l'oxydation), utilisant des réactifs facilement disponibles, ne nécessitant pas de solvant, ou bien des solvants aqueux ou facilement éliminables, et permettant un isolement simple du produit final.<sup>74</sup> La purification, si elle est nécessaire, ne doit pas utiliser de méthodes chromatographiques, et le produit doit être stable dans des conditions physiologiques. Enfin, la réaction doit être facilement modulable, réalisable en petites ou grandes quantités avec d'excellents rendements, stéréospécifique, et ne générer que des sous-produits inoffensifs.



Ces deux types de réactions sont de plus en plus utilisés pour la bioconjugaison du fait de leurs nombreux avantages : réalisables dans des conditions douces et diluées, compatibles avec les milieux biologiques, rapides, efficaces et sélectives. De nombreuses réactions ont déjà été développées et continuent de l'être. Elles diffèrent de par leur cinétique de réaction, les fonctions chimiques mises en jeu, la présence ou non de catalyseur, etc. Seules les plus utilisées seront présentées ci-après (Figure 127).<sup>75</sup>

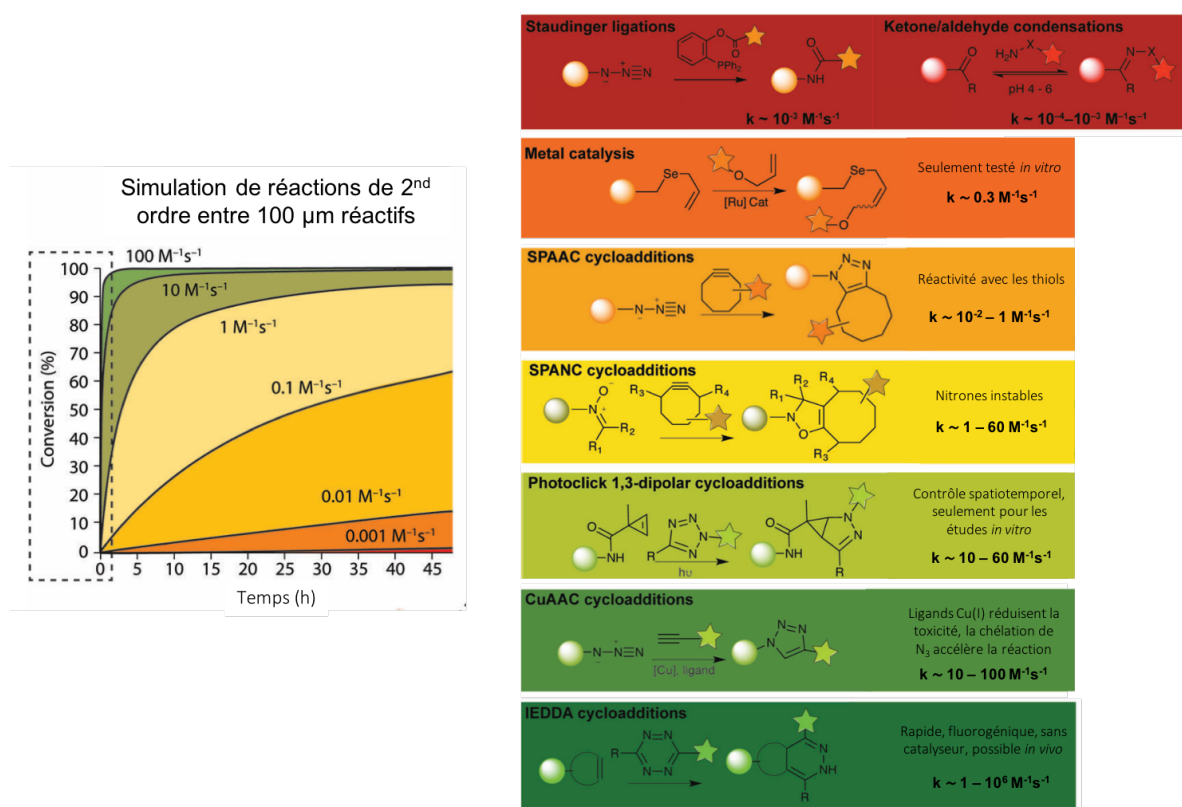


Figure 127. Exemples de réactions bioorthogonales et leur cinétique ; figure adaptée de revue.<sup>76</sup>

### Ligation de Staudinger

La ligation de Staudinger consiste à faire réagir une molécule d'intérêt portant un ester d'aryle fonctionnalisé en ortho avec une phosphine, avec un azoture porté par la protéine, afin de former une liaison amide en milieu aqueux (Figure 127). Cette réaction, développée notamment par Carolyn Bertozzi à Berkeley, est très utilisée car elle ne nécessite pas de catalyseur et est chimiosélective. Cependant la cinétique est lente et les phosphines sont sensibles à l'oxydation.<sup>75,77</sup>

### Condensation de cétones et aldéhydes

Les carbonyles peuvent être condensés avec des nucléophiles, tels que les hydroxylamines ou hydrazines, afin de former des liaisons oximes ou hydrazones (Figure 127). À pH physiologique

cette réaction est très lente. Elle peut être accélérée dans des conditions légèrement acides, par l'utilisation de catalyseurs comme l'aniline par exemple, ou par l'emploi de carbonyles plus réactifs.<sup>78</sup>

### **Cycloadditions azoture - alcyne**

Les réactions de cycloaddition 1,3-dipolaires entre un azoture et un alcyne sont les plus utilisées pour la bioconjugaison. On retrouve parmi celles-ci la réaction de chimie *click* CuAAC (cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre, *copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*) qui consiste à faire réagir un alcyne et un azoture en présence de cuivre (I) (Figure 127). La cinétique de réaction est très rapide. Cependant, l'inconvénient principal est l'utilisation du cuivre comme catalyseur, qui peut engendrer la formation d'espèces réactives de l'oxygène toxiques.<sup>79,80</sup>

Afin de réduire la toxicité, Bertozzi et ses collaborateurs ont développé la SPAAC (pour *strained-promoted azide-alkyne cycloaddition*) mettant en jeu un alcyne cyclique contraint afin de le rendre plus réactif vis-à-vis de l'azoture (Figure 127). De nombreux alcynes cycliques ont été développés. Cette réaction ne réclame pas de catalyseur, mais elle reste moins rapide que la CuAAC.<sup>79,81</sup>

La SPANC (*strained-promoted alkyne-nitrone cycloaddition*) est basée sur le même principe que la SPAAC mais en remplaçant l'azoture par une nitronne (Figure 127). Les nitrones sont plus réactives, mais par conséquent moins stables et doivent donc être préparées juste avant la réaction.<sup>79,82</sup>

### **Ligations métalo-catalysées**

En plus de la CuAAC, d'autres métaux de transition tels que le palladium, le ruthénium et l'or, peuvent être utilisés comme catalyseurs (Figure 127). Ces réactions ne montrent pas une cinétique très élevée et n'ont, à ce jour, été utilisées qu'*in vitro*.<sup>75,83</sup>

### **Cycloaddition photoinduite**

La cycloaddition photoinduite consiste à activer un tétrazole par des photons afin de générer un dipôle nitrile-imine qui va ensuite rapidement réagir avec un alcène pour former un cycle pyrazoline stable, avec pour seul sous-produit du diazote (Figure 127). Les cinétiques sont plutôt élevées mais les photons peuvent causer des problèmes de destruction des réactifs.<sup>75,84</sup>

### **Cycloaddition IEDDA**

La réaction IEDDA (*inverse electron demand Diels-Alder reaction*) met en jeu un diène pauvre en électrons et un diénophile riche en électrons afin de former un cycle dihydropyridazine, ou

pyridazine après oxydation (Figure 128). Les diènes les plus utilisés en bioconjugaison sont des tétrazines, tandis que les diénophiles sont des alcènes ou alcynes contraints. Les cinétiques de réactions sont très rapides et la réaction est très propre, générant seulement le composé souhaité et du diazote.<sup>85,76,86,87</sup>

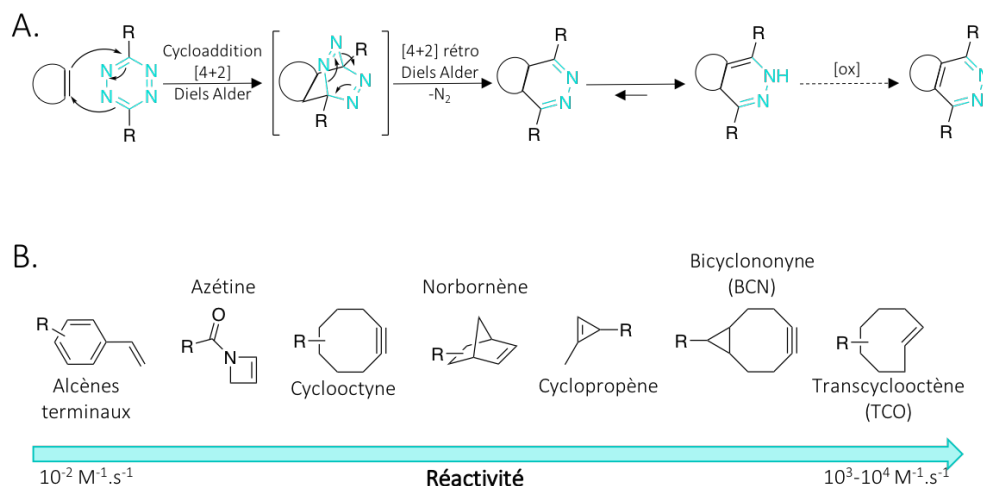


Figure 128. A. Mécanisme de la réaction IEDDA ; B. Exemples de diénophiles utilisés pour la réaction IEDDA.

### « Pretargeting »

Le « pretargeting » est une technique développée afin de pallier un des problèmes lié à l'utilisation d'anticorps pour l'imagerie nucléaire ou la radiothérapie vectorisée, à savoir la circulation prolongée des radio-immunoconjugés causant l'irradiation de tissus sains et la nécessité d'utiliser des radionucléides à longue demi-vie.<sup>88</sup> Le principe est basé sur l'administration séparée et séquentielle d'un anticorps non radioactif et d'un radioligand, qui se combinent dans le corps, au niveau de la tumeur, par réaction de chimie *click*.

Les stratégies de « pretargeting » comportent quatre étapes (Figure 129). Tout d'abord, l'anticorps est injecté. Après avoir attendu le temps nécessaire pour que l'anticorps s'accumule au niveau de la tumeur et qu'il soit éliminé des tissus sains, le radioligand, un complexe de faible poids moléculaire, est ensuite injecté. Après une distribution rapide dans l'organisme, il va se lier à l'anticorps déjà présent au niveau de la tumeur par chimie *click*, et l'excès de ligand sera rapidement éliminé de l'organisme.

Cette technique permet donc de réduire le temps de circulation de la radioactivité, de minimiser l'absorption dans les tissus sains, et d'utiliser des radionucléides de courte durée de vie. De très bons résultats ont pu être obtenus grâce à cette technique, avec des ratios activité tumorale/bruit-de-fond nettement améliorés et des débits de doses largement réduits.<sup>89</sup>

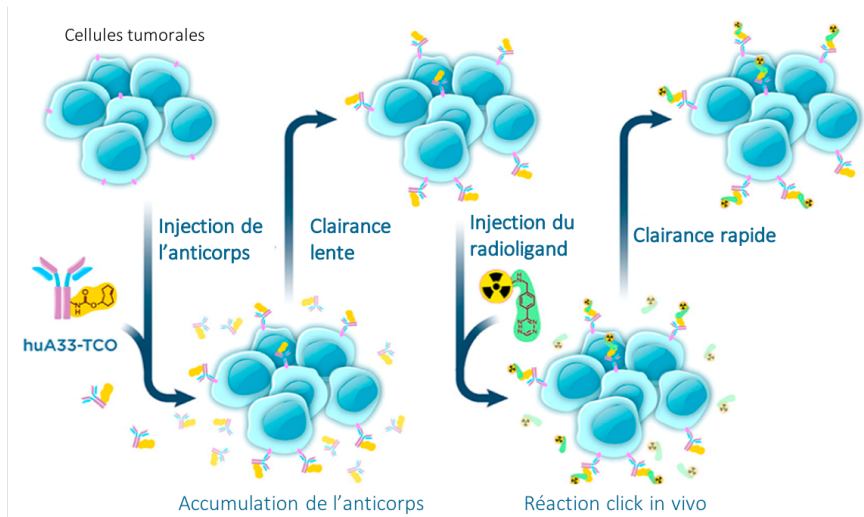


Figure 129. Schéma explicatif du principe du « pretargeting » ; figure adaptée de revue.<sup>90</sup>

#### I.2.4. Double modification des protéines

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, l'utilisation de deux modalités d'imagerie et/ou thérapie peut être intéressante. Afin d'obtenir un composé présentant des propriétés pharmacocinétiques adéquates, il est préférable d'introduire les deux modalités sur une même molécule plutôt que d'utiliser un mélange de deux composés portant chacun une seule modalité. Plusieurs méthodes sont envisageables pour réaliser la double modification de protéines.<sup>91</sup>

##### **Modification sur plusieurs positions**

Les deux molécules d'intérêt peuvent être introduites à des endroits différents de la protéine.<sup>91</sup> Pour cela il est possible de modifier :

- des acides aminés identiques ayant des réactivités différentes selon leur environnement, simultanément ou de façon séquentielle ;
- des acides aminés différents (naturels ou non naturels), simultanément ou de façon séquentielle.

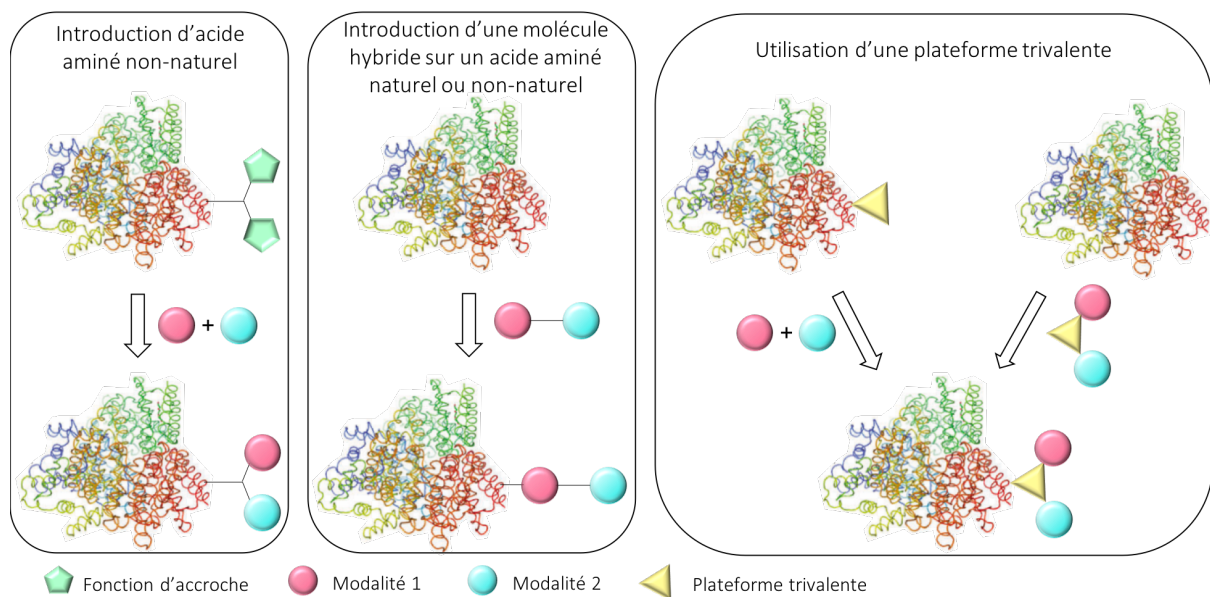
Ces approches sont assez simples à mettre en œuvre mais nécessitent plusieurs étapes. De plus, il est difficile de contrôler le ratio d'une modalité par rapport à l'autre et le mélange obtenu peut être hétérogène (molécule avec une seule modalité, avec deux modalités...).

##### **Modification sur une seule position**

L'introduction des deux modalités sur un seul site permet de simplifier les étapes de bioconjugaison et maîtriser le ratio entre les deux modalités. Cela peut nettement améliorer les profils de biodistribution et les résultats obtenus.

Pour cela il est possible de :

- introduire par bioingénierie un acide aminé non naturel contenant deux fonctions d'accroche dans la protéine puis la modifier avec les deux modalités ;<sup>92</sup>
- synthétiser des molécules hybrides en liant les deux modalités entre elles puis les faire réagir avec la protéine ;<sup>93-96</sup>
- utiliser des plateformes trifonctionnelles qui peuvent soit être conjuguées à la protéine puis ensuite couplées aux molécules d'intérêt, soit être fonctionnalisées avec les molécules d'intérêt puis introduites sur la protéine (Figure 130).<sup>97</sup>



**Figure 130.** Représentation des approches utilisables pour la double modification de protéines sur une seule position.

Le développement de nouvelles plateformes a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années. Il est intéressant d'utiliser des plateformes possédant des sites orthogonaux afin de permettre des réactions simples, ne nécessitant pas d'étapes de protection/déprotection de fonctions.

Les principales plateformes (Figure 131) utilisées sont :

- des acides aminés (principalement la lysine) ;<sup>98-100</sup>
- des petits peptides ;<sup>101-103</sup>
- des benzènes trisubstitués ;<sup>104,105</sup>
- des bromomaléimides ou dibromopyradizinediones ;<sup>106-110</sup>
- des tétrazines.<sup>111-115</sup>

D'autres plateformes difficilement classables ont également été développées.<sup>116-119</sup>

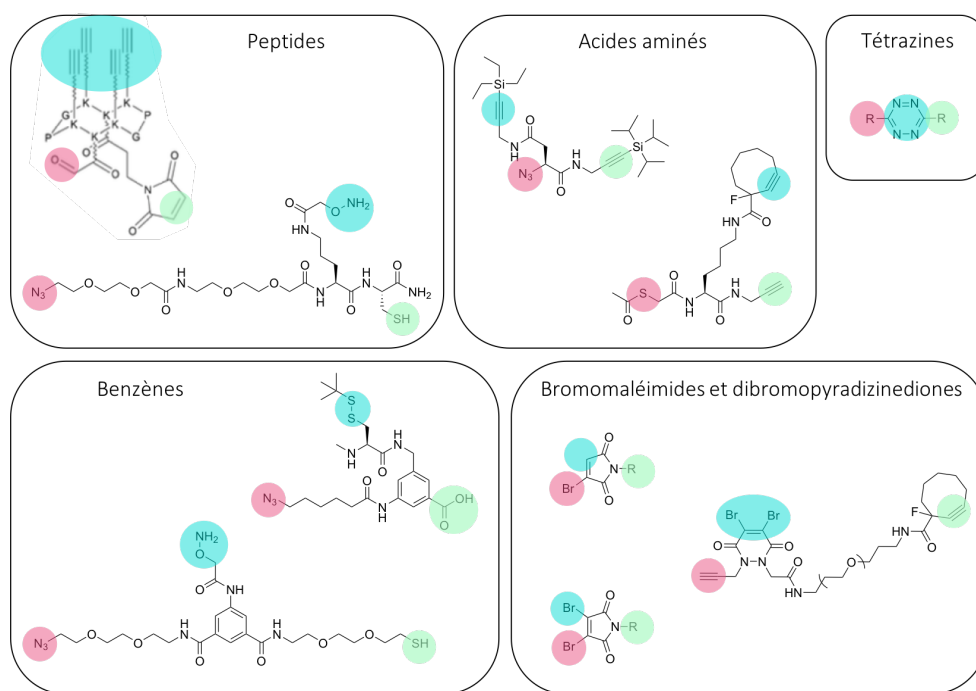


Figure 131. Exemples de plateformes utilisées.

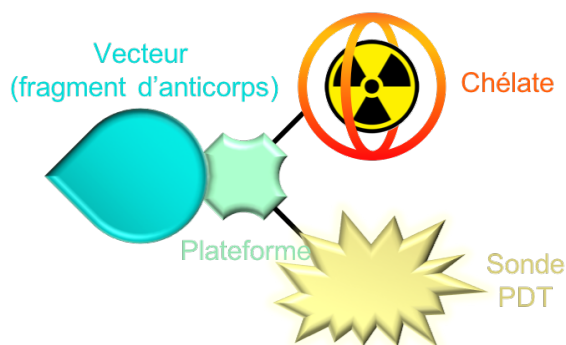
### I.3. Présentation du projet

Comme nous venons de le voir, les récepteurs EGFR sont surexprimés dans de nombreux cancers et sont associés à un mauvais pronostic, lié à un développement rapide et important de métastases. Nous avons ici souhaité développer un agent théranostique ciblant EGFR, qui puisse permettre la détection de tumeurs surexprimant EGFR, et le traitement de ces tumeurs *via* un mécanisme d'action susceptible de prévenir le développement de résistances aux traitements.

Pour cela, la combinaison d'une sonde d'imagerie nucléaire et d'une sonde fluorescente pour la thérapie photodynamique et la chirurgie assistée par fluorescence nous a semblé pertinente. L'imagerie nucléaire renseignerait sur l'expression des récepteurs EGFR et pourrait être utilisée pour déterminer la localisation de la tumeur en pré-opératoire tandis que la fluorescence et la PDT permettraient de faciliter la résection tumorale, de confirmer la résection complète lors de la chirurgie et d'assurer l'éradication de toutes les cellules tumorales.

Compte-tenu des résultats décrits dans la littérature sur l'imagerie nucléaire de tumeurs surexprimant EGFR, il nous a semblé préférable d'utiliser un fragment d'anticorps comme vecteur. En effet, cela permet de conserver les avantages des anticorps sans leurs limitations, c'est-à-dire une bonne affinité pour EGFR tout en ayant une clairance plus rapide et donc de meilleurs contrastes à des temps plus courts après l'injection. Les deux sondes (agent

chélatant et sonde PDT/fluorescence) ont été introduites de façon site-spécifique sur le fragment d'anticorps grâce à l'utilisation d'une plateforme (Figure 132).



---

**Figure 132.** Représentation schématique de la structure du composé développé.

Tout d'abord, la sonde d'imagerie bimodale a été synthétisée puis conjuguée au fragment d'anticorps. Le conjugué bimodal a ensuite été radiomarqué, évalué *in vitro* (affinité et internalisation, quantification de la production d'oxygène singulet et de l'efficacité de la thérapie photodynamique), puis testé *in vivo* sur des souris xénogreffées avec un modèle de tumeur exprimant EGFR afin de déterminer la capacité à imager les tumeurs ainsi que l'efficacité de la thérapie photodynamique.

Ce projet a été réalisé en partenariat avec le Dr. Sanne van Lith de l'institut « Radboud Institute for Molecular Life Sciences » à Nijmegen aux Pays-Bas.

## II. Résultats et discussion

### II.1. Design du conjugué

Dans ce projet, nous souhaitons développer un agent théranostique en utilisant un fragment d'anticorps anti-EGFR comme vecteur, sur lequel une sonde bimodale nucléaire/PDT serait introduite. Le choix de chaque constituant ainsi que la technique de bioconjugaison utilisée seront détaillés dans cette première partie.

#### II.1.1. Choix de l'agent chélatant et du radionucléide

Dans le but de faire de l'imagerie TEMP, nous avons choisi de marquer le composé à l'indium-111. C'est le deuxième radionucléide TEMP le plus utilisé après le technétium-99m. Il possède une période radioactive de 67.3 h et est produit dans des cyclotrons par bombardement de



protons du cadmium-112. L'indium-111 se désintègre ensuite en cadmium-111 par capture électronique et émissions de rayons gamma (Figure 133).<sup>120,121</sup>

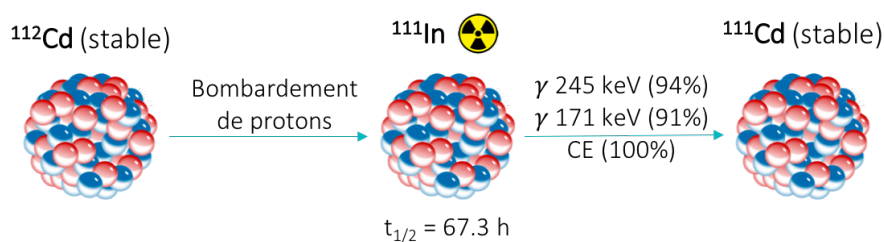


Figure 133. Production et décroissance de l'indium-111.

L'état d'oxydation de l'indium-111 est +3. L'ion  $\text{In}^{3+}$  nécessite une coordination de 7-8 et est un acide dur qui requiert un agent chélatant possédant des atomes donneurs durs. Les chélateurs les plus utilisés pour la formation de complexes stables sont le DTPA, le DOTA et le NOTA. Nous avons choisi d'utiliser le DTPA car il présente les meilleures constantes de complexation (29.0) et le radiomarquage se fait avec de très bons rendements radiochimiques dans des conditions douces (température ambiante, 5 à 30 min, pH 4.5-5.5).<sup>122</sup>

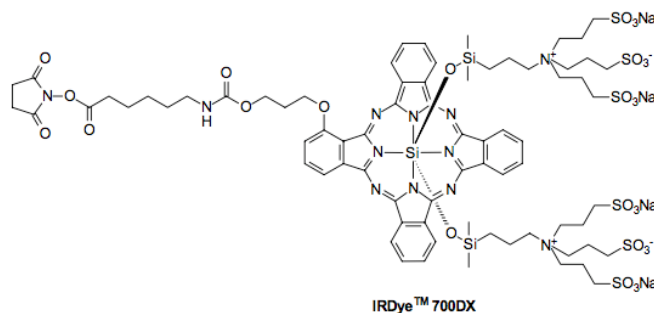
### II.1.2. Choix de la sonde pour la thérapie photodynamique

La thérapie photodynamique présente de nombreux intérêts par rapport aux traitements classiquement utilisés (radiothérapie, chimiothérapie, ...). Elle est plus sélective, ce qui limite les effets indésirables et entraîne la mort immédiate des cellules, évitant donc les processus de résistance. En plus de cela, une émission fluorescente accompagne souvent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ce qui permet de faire de l'imagerie de fluorescence.<sup>123</sup> De nombreux essais cliniques sont en cours pour le traitement de différents cancers tels que les cancers de la peau, de l'œsophage, du poumon, de la vessie, les glioblastomes, ... grâce à des photosensibilisateurs non vectorisés.<sup>124</sup> Cependant, malgré une bonne efficacité permettant l'amélioration de la survie et de la qualité de vie, quelques effets indésirables sont observés tels qu'une photosensibilité de la peau, des douleurs importantes, et une diminution de l'efficacité dans le cas de tumeurs volumineuses de par la pénétration insuffisante du photosensibilisateur ou de la lumière.

De nombreuses études précliniques sont en cours pour essayer de résoudre ces problèmes. Pour réduire les problèmes de toxicité et améliorer l'efficacité, il est intéressant d'utiliser des vecteurs pour cibler les tumeurs. Lorsqu'un photosensibilisateur est lié à un anticorps ou fragment d'anticorps, on parle alors de photoimmunothérapie (PIT). De nombreuses études de photothérapie utilisant des nanoobjets,<sup>125-127</sup> des anticorps,<sup>128-130</sup> ou des fragments d'anticorps<sup>131</sup> ont été réalisées. L'utilisation de petits vecteurs par rapport aux anticorps entiers semble plus adaptée pour avoir une meilleure pénétration des tumeurs, une accumulation rapide intratumorale et une clairance rapide des tissus sains.<sup>132</sup>



La phthalocyanine de silicium hexasulfonagée, IRDye700DX, présente d'excellentes propriétés pour la PIT.<sup>123,133</sup> Elle absorbe et émet à des longueurs d'onde supérieures à celles des photosensibilisateurs approuvés par la FDA ( $\lambda_{\max} = 689 \text{ nm}$ ) ce qui permet une meilleure pénétration de la lumière dans les tissus, et elle possède un coefficient d'extinction et un rendement quantique de fluorescence élevés ( $\epsilon = 165\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  et  $\phi = 0.14$  dans le PBS). Elle est résistante au photoblanchiment, soluble dans l'eau et possède une fonction acide carboxylique permettant la conjugaison (Figure 134).<sup>134</sup>



**Figure 134.** Structure de la phthalocyanine de silicium hexasulfonagée IRDye700DX-NHS.

Le conjugué IRDye700DX-cétuximab fait actuellement l'objet d'une étude clinique pour le traitement du cancer épidermoïde de la tête et du cou.<sup>135-137</sup>

Nous avons donc choisi d'utiliser cette sonde pour la PDT et la fluorescence.

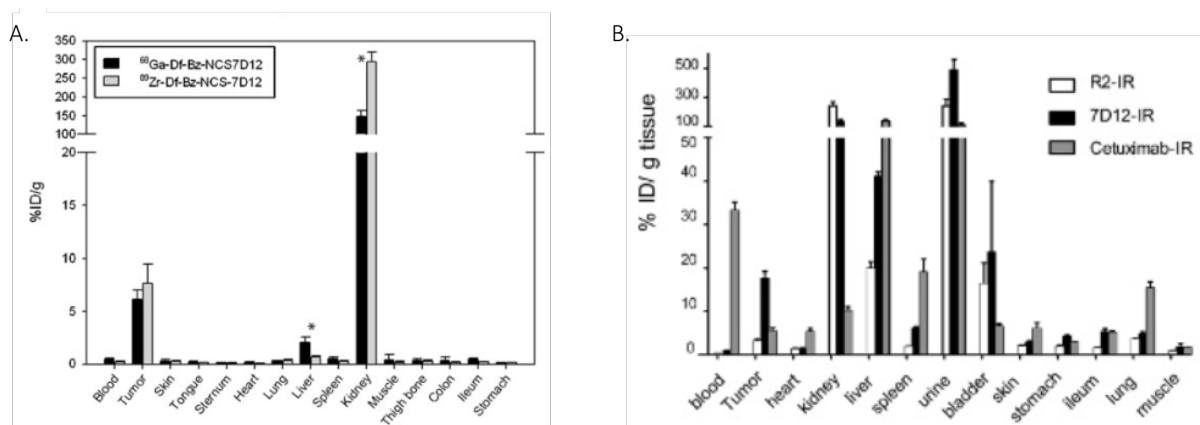
### II.1.3. Choix du vecteur

Les V<sub>H</sub>Hs, ou nanobodies, sont constitués du domaine variable des chaînes lourdes d'anticorps de lama. Ils présentent de nombreux avantages par rapport aux anticorps entiers : facilité de manipulation, bonne solubilité dans l'eau, petite taille (environ 15 kDa), faible immunogénicité et bonne stabilité thermique sur une large gamme de pH.<sup>138</sup> Cette classe de molécules présente un intérêt particulier en tant que vecteur pour le ciblage de tumeurs car leur affinité pour leur antigène est très bonne, allant jusqu'au picomolaire, et leur petite taille leur confère une bonne pénétration dans les tumeurs, une clairance du sang et des tissus sains rapide, conduisant à de bons ratios tumeur/bruit-de-fond à des temps courts après l'injection.<sup>139</sup> C'est pourquoi de nombreux V<sub>H</sub>H ont été développés pour le diagnostic ou la thérapie de différentes pathologies.<sup>140-146</sup>

Le V<sub>H</sub>H 7D12 (18 kDa) est une protéine recombinante anti-EGFR se liant au domaine III des récepteurs EGFR avec des affinités de l'ordre du nanomolaire et entrant en compétition avec l'EGF et le cétuximab.<sup>147</sup> Une étude de Vosjan *et al.* décrit l'utilisation du V<sub>H</sub>H 7D12 pour la détection par imagerie TEP de tumeurs A431.<sup>148</sup> Dès 1 h après l'injection du 7D12 marqué par du gallium-68 ou du zirconium-89, le signal est principalement retrouvé dans la tumeur

(~7%ID/g), dans les reins (~250%ID/g) et dans le foie (~2.5%ID/g) (Figure 135A). Des profils de biodistribution similaires ont été observés par Gainkam *et al.* après marquage au technétium-99m.<sup>51</sup>

Ce V<sub>H</sub>H a aussi été conjugué à une sonde fluorescente (IRDye800CW) pour la visualisation de tumeurs exprimant EGFR.<sup>149</sup> Dès 30 min après l'injection, la tumeur était visible. Une grande partie du signal a été observée dans les reins et le foie mais très peu dans les autres organes sains, conduisant à de très bons ratios après 2 h ou 24 h, contrairement au conjugué cétuximab-IRDye800CW (Figure 135B).



**Figure 135.** A. Biodistribution *ex vivo* 2 h après l'injection du V<sub>H</sub>H 7D12 marqué au gallium-68 ou au zirconium-89 à des souris portant une xénogreffe A431 ;<sup>148</sup> B. Biodistribution *ex vivo* 2 h après l'injection d'un nanobody contrôlé R2, du V<sub>H</sub>H 7D12 ou du cétuximab conjugués à l'IRDye800CW à des souris portant une xénogreffe A431. Les organes ont été lysés puis le %ID/g a été déterminé en mesurant la fluorescence et en l'extrapolant à des gammes d'étalonnage.<sup>149</sup>

Enfin, l'introduction de l'IRDye700DX sur le V<sub>H</sub>H 7D12 a été étudiée par plusieurs équipes et a montré des résultats très prometteurs *in vitro* et *in vivo*.<sup>131,150-152</sup>

En 2016, l'équipe de Van Driel a évalué l'efficacité de la PDT sur des souris portant des greffes orthotopiques de tumeurs de la langue.<sup>150</sup> L'imagerie par fluorescence a mis en évidence une accumulation du conjugué dans la tumeur et dans les ganglions lymphatiques. L'irradiation lumineuse 1 h après l'injection du conjugué a conduit à environ 80% de nécrose et peu de toxicité dans les tissus sains, 24 h après l'injection. Dans cette étude, l'efficacité de la PDT a été corrélée à l'internalisation du conjugué. Plus le composé était internalisé, meilleur était le taux de mort cellulaire.

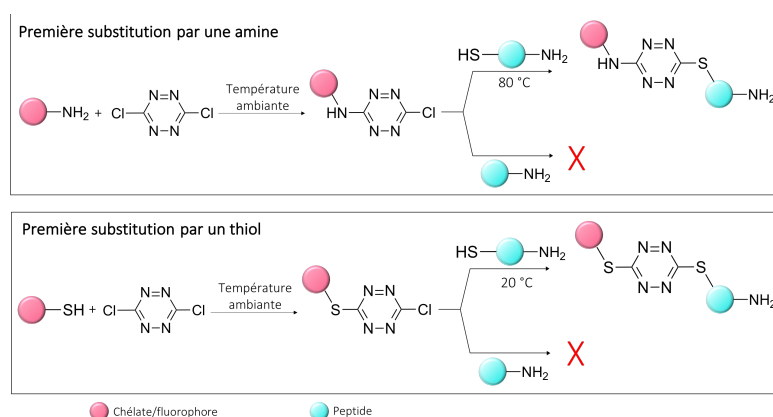
En 2018, afin de déterminer l'impact de l'internalisation cellulaire sur l'efficacité de la PDT, l'équipe de S. Van Lith a évalué les conjugués 7D12-IRDye700DX et CPP-7D12-IRDye700DX (CPP étant un peptide de pénétration cellulaire) *in vitro*, sur une lignée tumorale exprimant EGFR (A431) et sur des cellules provenant de patientes atteintes de cancer des ovaires exprimant EGFR.<sup>152,153</sup> Les deux conjugués ont permis la mort cellulaire, cependant, 7D12-IRDye700DX a montré une meilleure efficacité, suggérant que l'association à la surface cellulaire est nécessaire pour une activité thérapeutique optimale.

## II.1.4. Stratégie de conjugaison pour la double modification site-spécifique du V<sub>H</sub>H 7D12

### Plateforme dichlorotétrazine

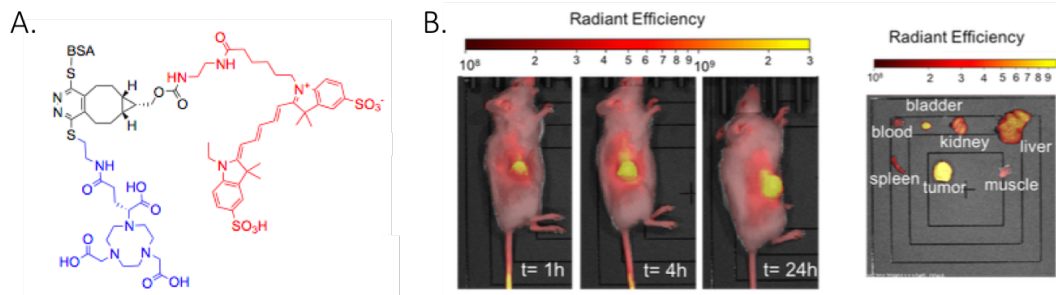
Notre équipe s'est intéressée à la 3,6-dichloro-1,2,4,5-tétrazine (TzCl<sub>2</sub>) comme plateforme pour la double modification site-spécifique de protéines.<sup>111,112</sup>

Une première étude a montré qu'il est possible de substituer de façon sélective les deux atomes de chlore de la dichlorotétrazine *via* des réactions de substitution nucléophile aromatique (S<sub>N</sub>Ar). Une fois la tétrazine disubstituée, celle-ci peut être engagée dans une réaction de chimie *click* avec un alcyne contraint, *via* la réaction IEDDA.<sup>111</sup> Dans cette étude, les auteurs ont tout d'abord introduit des sondes imageantes porteuses de fonctions amine ou thiol, à température ambiante, sur la dichlorotétrazine. Ils ont ensuite montré que le deuxième atome de chlore pouvait être substitué sélectivement par un thiol, par rapport à une amine, au moyen d'un peptide modèle. Les tétrazines monosubstituées par un thiol se sont avérées beaucoup plus réactives que celles monosubstituées par une amine (réaction à 20 °C vs 80 °C) (Figure 136).



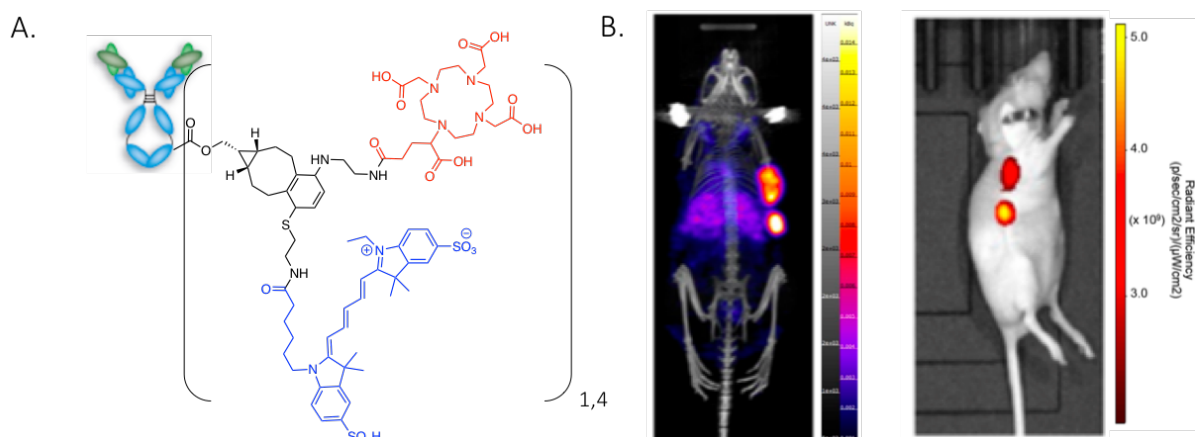
**Figure 136.** Représentation des différences de réactivité de la dichlorotétrazine avec des thiols ou des amines.

Cette approche a permis de synthétiser un conjugué bimodal en introduisant tout d'abord un dérivé NODAGA-SH sur la dichlorotétrazine, puis la BSA-SH (albumine de sérum bovin) avant de terminer par une réaction *click* avec une sonde BCN-sulfoCy5 (Figure 137A). Ces différentes étapes ont pu être réalisées dans des conditions douces. Le conjugué a montré une bonne stabilité dans le plasma humain et une accumulation dans les tumeurs a pu être observée en imagerie de fluorescence sur des souris portant des xénogreffes de tumeurs mammaires (Figure 137B).



**Figure 137.** A. Structure du conjugué bimodal obtenu ; B. Images par fluorescence obtenues après l'injection du conjugué doublement marqué à des souris portant une xénogreffe de tumeurs HER2-positives ; figures extraites d'article.<sup>111</sup>

La deuxième étude a consisté à modifier un anticorps monoclonal (trastuzumab) par réaction de chimie *click* avec une sonde bimodale TEMP/fluorescence *via* la plateforme dichlorotétrazine. Pour cela, les auteurs ont tout d'abord préparé une sonde bimodale en introduisant, dans une première étape, différents chélateurs (fonctionnalisés avec des amines) sur la dichlorotétrazine puis, dans une deuxième étape, différentes sondes fluorescentes (fonctionnalisées par des thiols) par  $S_NAr$  en 3 h à 75 °C. Ensuite, le trastuzumab a été modifié de manière aléatoire en faisant réagir les lysines avec le BCN-NHS. Enfin, la dernière étape a consisté en une réaction *click* entre la tétrazine disubstituée et le trastuzumab-BCN en une nuit (pH 7.4, 37 °C) (Figure 138A). Le conjugué a montré une stabilité élevée dans le plasma humain puis il a été évalué sur des souris portant une xénogreffe de tumeur mammaire. La TEMP et l'imagerie par fluorescence ont toutes deux montré de bons ratios tumeur/bruit-de-fond (Figure 138B).



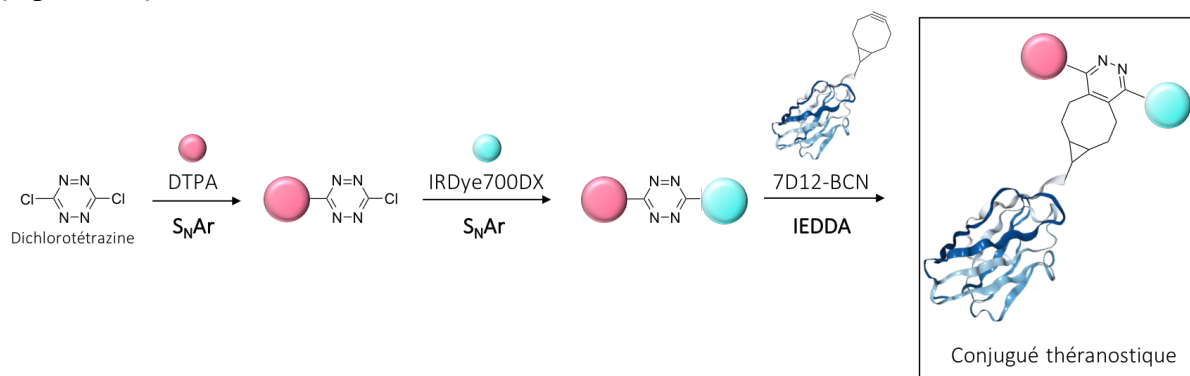
**Figure 138.** A. Structure du conjugué bimodal obtenu ; B. Images TEMP/CT (gauche) et par fluorescence (droite) obtenues 24 h après l'injection du conjugué bimodal à des souris portant une xénogreffe de tumeurs mammaires ; figures extraites d'article.<sup>112</sup>

Au vu du potentiel de cette technique, nous avons choisi d'utiliser cette approche pour la double modification du V<sub>H</sub>H 7D12.

### Stratégie de conjugaison utilisée dans ce projet

L'utilisation de la sortase A pour l'introduction de sondes ou groupements *clickables* est de plus en plus employée pour la modification de V<sub>H</sub>H. Cependant, elle nécessite l'utilisation d'enzymes et de nombreuses étapes de purification. Nous avons ici choisi d'insérer une cystéine en position C-terminale du V<sub>H</sub>H 7D12. Cette étape peut se faire lors de la production de la protéine sous forme recombinante, avec de bons rendements et assez simplement. Le thiol de la cystéine pourra ensuite réagir avec un BCN-maléimide.

Dans ce projet, nous avons donc choisi de préparer une sonde bimodale en introduisant tout d'abord le chélateur DTPA par une première S<sub>N</sub>Ar sur la dichlorotétrazine, suivi d'une deuxième S<sub>N</sub>Ar pour introduire l'IRDye700DX. Ensuite, une étape de chimie *click* est réalisée entre la tétrazine bimodale et le V<sub>H</sub>H 7D12-BCN pour obtenir le conjugué théranostique (Figure 139).



**Figure 139.** Méthode de synthèse envisagée pour la synthèse du conjugué théranostique.

## II.2. Synthèse et caractérisation du V<sub>H</sub>H théranostique

### II.2.1. Production du V<sub>H</sub>H 7D12

Le V<sub>H</sub>H 7D12 a été produit par Sanne van Lith à Nijmegen (Pays-Bas) (Figure 140A). Pour cela, l'ADNc codant la séquence du V<sub>H</sub>H 7D12 a été introduit dans un plasmide, aussi appelé vecteur, de type pHENIX-C-LPETG-His<sub>8</sub>-Vsv (1). Ce vecteur permet l'introduction, en position C-terminale du V<sub>H</sub>H 7D12, d'une cystéine pour la bioconjugaison, d'un *tag* LPETG de reconnaissance par la sortase A, d'un *tag* Vsv de reconnaissance par un anticorps et d'une séquence de huit histidines (aussi appelé *His tag*) permettant la purification. Le plasmide recombinant a ensuite été introduit dans des cellules *Escherichia Coli* ER2566 (2). L'expression du V<sub>H</sub>H 7D12 recombinant a été induite en ajoutant une solution d'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) pendant 4 h à 30 °C (3). Enfin, le V<sub>H</sub>H 7D12 a été récupéré puis purifié (4) afin d'obtenir le V<sub>H</sub>H 7D12-C-LPETG-His<sub>8</sub>-Vsv (Figure 140B).

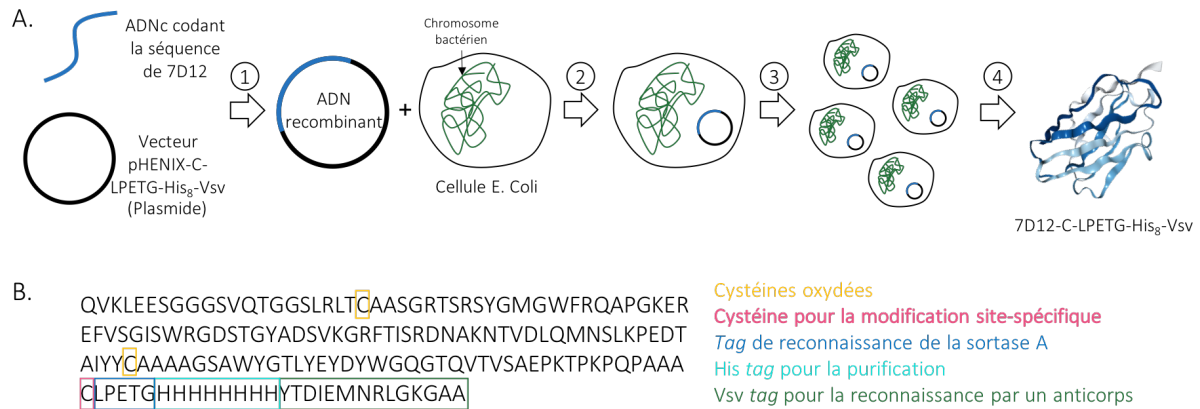


Figure 140. A. Processus de production du V<sub>H</sub>H 7D12. B. Séquence du V<sub>H</sub>H 7D12 recombinant.

La purification de protéines contenant un His tag est basée sur l'affinité des histidines pour les ions nickel (Ni<sup>2+</sup>) ou cuivre (Cu<sup>2+</sup>).<sup>154</sup> Pour cela, les ions sont immobilisés par un ligand sur une matrice. Dans notre cas, ce sont des billes de sépharose contenant un ligand acide nitrilotriacétique (NTA), capable d'immobiliser les ions Ni<sup>2+</sup>, qui ont été utilisées. La solution contenant la protéine d'intérêt, ici le 7D12 recombinant, est ensuite incubée avec ces billes puis la résine est lavée et enfin la colonne est éluée avec une solution d'imidazole. L'imidazole entre en compétition avec les histidines pour complexer les ions Ni<sup>2+</sup> ce qui conduit au décrochage de la protéine.

Le V<sub>H</sub>H 7D12 obtenu a ensuite été caractérisé sur un gel SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) (Figure 141).

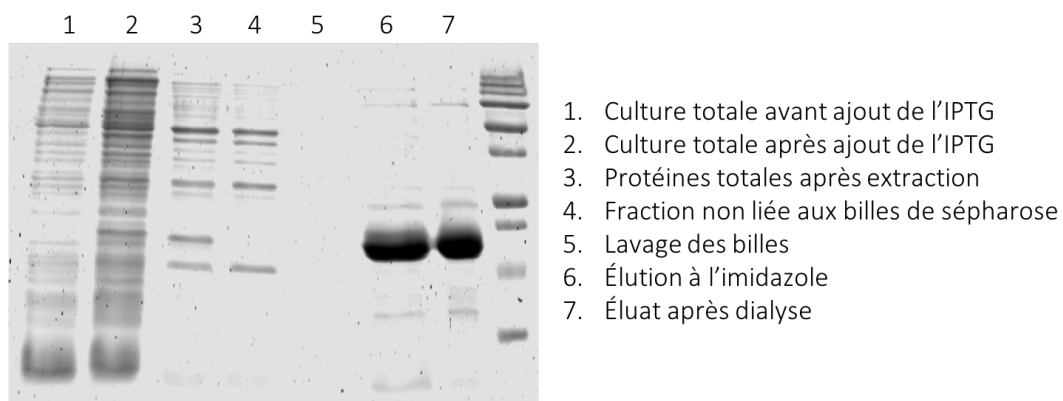


Figure 141. Analyse par SDS-PAGE du V<sub>H</sub>H 7D12 natif, révélation au bleu de Coomassie.

## II.2.2. Synthèse du V<sub>H</sub>H 7D12-BCN

Pour pouvoir introduire le motif bicyclo[6.1.0]nonyne (BCN) sur le résidu cystéinyl en région C-terminale, il faut tout d'abord commencer par une étape de réduction pour libérer les groupements thiols. En effet, dans les protéines, les résidus cystéinyls ont tendance à former

spontanément des ponts disulfures, intramoléculaires ou intermoléculaires, ou avec des thiols issus du système d'expression tels qu'un acide aminé cystéine ou le glutathion. Plusieurs réactifs permettent de réduire sélectivement ces ponts disulfures : le dithiothréitol (DTT), le 2-mercaptoéthanol, ou encore la tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP).<sup>155,156</sup> En général, il est nécessaire d'éliminer ces réactifs avant de procéder à la conjugaison thiol-sélective pour éviter qu'ils n'entrent en compétition avec les thiols des cystéines que l'on cible.<sup>157</sup> Pour cette étude nous avons choisi d'utiliser le TCEP comme réducteur.

Nous avons choisi d'introduire, sur les cystéines, un groupement BCN porteur d'une courte chaîne polyéthylène glycol, BCN-PEG<sub>2</sub>-maléimide, afin de s'assurer de l'accessibilité des BCN pour la réaction de *click* vis-à-vis de la tétrazine.

Il s'est avéré que dans plusieurs lots de BCN-PEG<sub>2</sub>-maléimide commercialement disponibles, des polymères insolubles se formaient. Des tentatives de purification de ces lots par HPLC semi-préparative n'ont pas permis d'obtenir un produit suffisamment pur. Nous avons donc choisi de le synthétiser. Pour cela, nous avons fait réagir le BCN-PEG<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> avec un maléimide-NHS dans le DMF, en présence de DIPEA, à température ambiante (Figure 142). Le produit désiré a été isolé du produit hydrolysé par une purification semi-préparative conduisant au composé **34** pur avec 41% de rendement. Des solutions stocks ont été immédiatement préparées dans du DMSO, aliquotées, et conservées à -20 °C pour éviter la polymérisation ou l'hydratation du BCN.

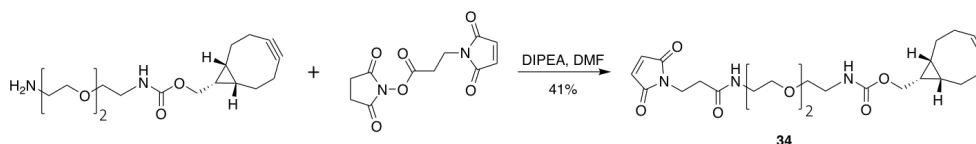


Figure 142. Synthèse du BCN-PEG<sub>2</sub>-maléimide.

Nous avons ensuite procédé aux étapes de bioconjugaison (Figure 143). Un travail important d'optimisation a été réalisé afin d'obtenir les meilleurs rendements possibles.

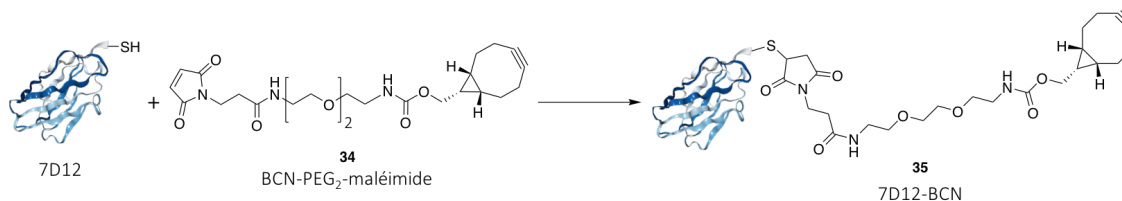


Figure 143. Modification site-spécifique du V<sub>H</sub>H 7D12 par un BCN-PEG<sub>2</sub>-maléimide.

Nous avons tout d'abord effectué les étapes de réduction et de bioconjugaison successivement. Pour cela, 100 équivalents de TCEP ont été ajoutés au V<sub>H</sub>H 7D12 dans un tampon PBS (pH 7.4, 0.01 M) pendant une nuit à 37 °C. L'excès de TCEP et l'oxyde de phosphine formé ont été éliminés par ultrafiltration sur des filtres de 10 kDa. Le tampon PBS

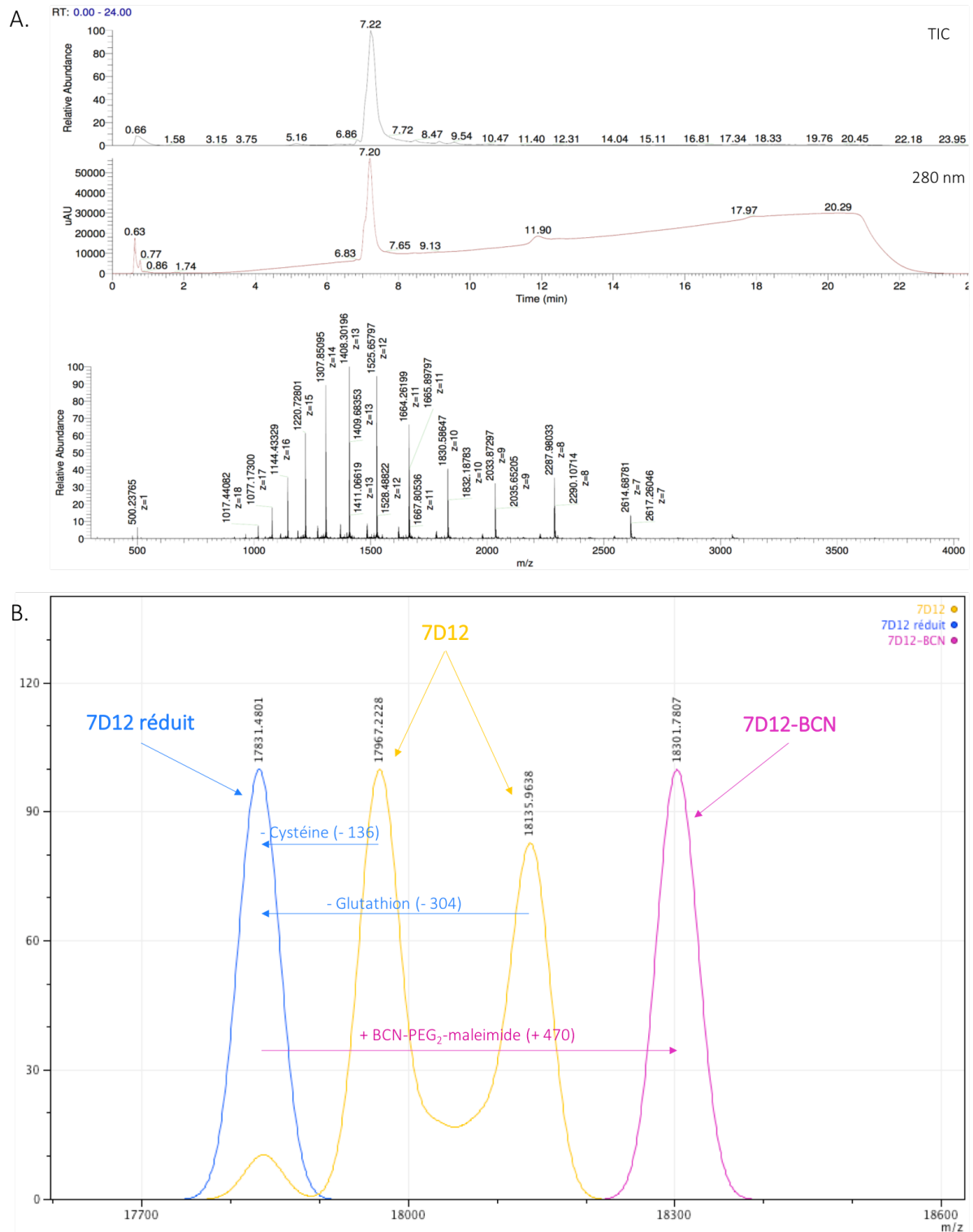


a ensuite été échangé par un tampon phosphate à pH 6.3 puis 10 équivalents de BCN-PEG<sub>2</sub>-maléimide ont été ajoutés au V<sub>H</sub>H 7D12 réduit. La solution a été incubée pendant une nuit à 37 °C. Un pH très légèrement inférieur à 7 a été choisi pour éviter la réaction du maléimide avec les amines et pour limiter l'hydrolyse du maléimide pouvant se produire à des pH aux alentours de 8.<sup>62</sup> Une purification par ultrafiltration pour éliminer l'excès de BCN-PEG<sub>2</sub>-maléimide et un changement de tampon pour un tampon PBS (pH 7.4) ont été réalisés. Le V<sub>H</sub>H 7D12-BCN a été obtenu avec un rendement, relativement faible, de 22%. Nous avons émis l'hypothèse qu'une grande partie du produit était perdue sur les filtres lors des étapes d'ultrafiltration. Nous avons donc essayé de simplifier le protocole en limitant les ultrafiltrations et échanges de tampon.

Une réaction *one-pot* a donc été privilégiée. Pour ce faire, le TCEP et le BCN-PEG<sub>2</sub>-maléimide ont été ajoutés au V<sub>H</sub>H 7D12 dans un tampon PBS (pH 7.4) puis la solution a été chauffée à 37 °C pendant une nuit. Enfin, le milieu réactionnel a été purifié par ultrafiltration puis analysé. Plusieurs paramètres ont été évalués pour optimiser la réaction : les quantités de TCEP et de BCN utilisées, la concentration de la solution, le pourcentage de DMSO introduit (provenant de la solution de BCN-PEG<sub>2</sub>-maléimide) et les filtres d'ultrafiltration utilisés. Les meilleurs rendements ont été obtenus lors de l'ajout de 20 équivalents de TCEP et de BCN-PEG<sub>2</sub>-maléimide au V<sub>H</sub>H 7D12 (PBS, pH 7.4, 37 °C) pendant 6 h puis un ajout supplémentaire de 10 équivalents de TCEP et 15 équivalents de BCN-PEG<sub>2</sub>-maléimide pendant une nuit. Des concentrations de 0.5, 1 et 2 mg/mL en V<sub>H</sub>H 7D12 ont été évaluées. La concentration de 0.5 mg/mL a montré de meilleurs résultats car dans ce cas, le pourcentage de DMSO était inférieur à 5%, limitant la dénaturation de la protéine. En effet, à des concentrations supérieures, le 7D12 précipitait. Enfin, l'utilisation de filtres de 3 kDa a permis d'améliorer les rendements. La masse du V<sub>H</sub>H 7D12 étant d'environ 18 kDa, il est possible qu'une partie restait accrochée dans les pores des filtres de 10 kDa. De cette façon, le composé **35** (7D12-BCN) a pu être isolé avec des rendements compris entre 60 et 90%.

L'analyse par spectrométrie de masse (Orbitrap ou MALDI-TOF) a permis de confirmer la formation du composé **35**, pur (Figure 144A). Nous pouvons voir que le V<sub>H</sub>H 7D12 fourni par S. van Lith apparaît sous la forme de deux pics (~17970 Da et ~18130 Da) sur le spectre de masse déconvolué (Figure 144B). Nous supposons que cela correspond au 7D12 sous forme d'adduits à la cystéine et au glutathion. En effet, une fois la réduction effectuée, on n'observe plus qu'un pic (~17830 Da) correspondant à des pertes de masse d'environ 150 et 300 Da, masses de la cystéine et du glutathion. Enfin, pour le composé 7D12-BCN, on observe un pic (~18300 Da) correspondant au greffage du BCN-PEG<sub>2</sub>-maléimide. D'après les analyses, le V<sub>H</sub>H 7D12 a été transformé quantitativement en 7D12-BCN. Le DOL (*degree of labeling*) est donc de 1.





**Figure 144.** A. Chromatogrammes RP-HPLC (TIC et à 280 nm) du composé **35** (haut) et spectre de masse associé (bas) ; B. Spectres de masse déconvolués (Orbitrap) des V<sub>H</sub>H 7D12 natif, 7D12 réduit et 7D12-BCN **35**.

### II.2.3. Tests de réactivité

En dépit du travail effectué précédemment au sein du laboratoire par le Dr. Coline Canovas, notre connaissance de la réactivité des tétrazines disubstituées vis-à-vis de diénophiles portés par des protéines était limitée.

Nous disposions au laboratoire d'une tétrazine disubstituée par un DOTAGA-NH<sub>2</sub> et une cyanine 5 sulfonagée-SH (DOTAGA-NH-Tz-S-SulfoCy5). Nous avons donc choisi de synthétiser une tétrazine disubstituée par deux groupements amines pour comparer leur réactivité. En effet, les sondes fonctionnalisées avec des amines sont plus facilement accessibles que les dérivés thiolés (certaines sont disponibles commercialement), ce qui simplifierait la préparation de tétrazines bimodales.

#### Préparation d'une tétrazine de type R-NH-Tz-NH-R'

Quelques milligrammes de DOTAGA-NH-Tz-Cl, préalablement synthétisés par le Dr. Coline Canovas, ont pu être mis en réaction avec un large excès d'éthylènediamine dans un tampon borate légèrement basique (pH 8.6) afin d'obtenir, après purification par HPLC semi-préparative, le composé **36** pur avec 65% de rendement. Ensuite, le DOTA-NHS a été mis à réagir avec l'amine primaire de **36**, en présence de DIPEA dans le DMF, pour obtenir le composé **37**, avec 55% de rendement après purification (Figure 145).

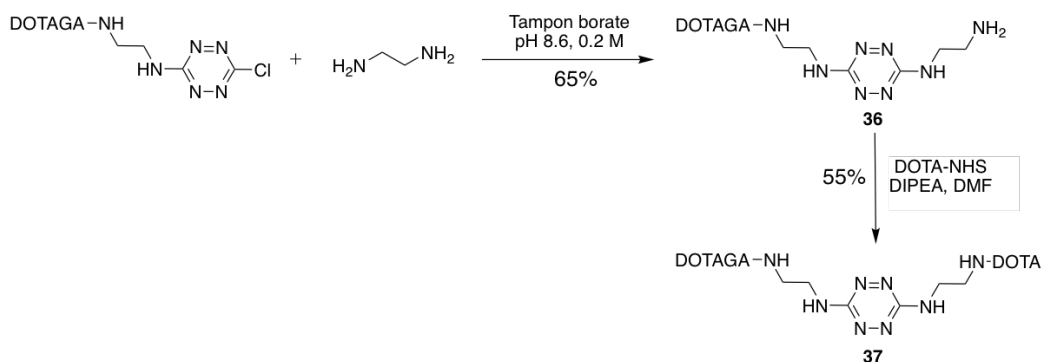
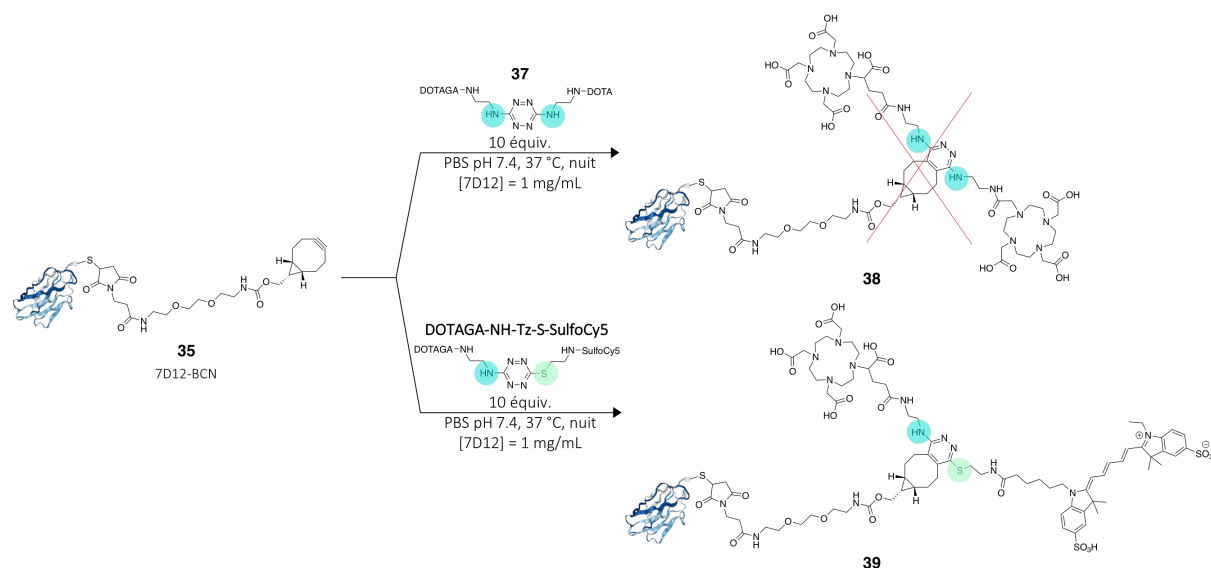


Figure 145. Synthèse d'une tétrazine disubstituée par des groupements amines.

#### Test de la réactivité des tétrazines disubstituées vis-à-vis du V<sub>H</sub>H 7D12-BCN

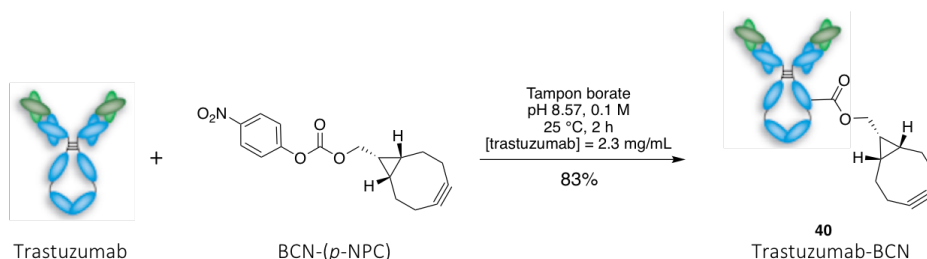
Nous avons tout d'abord évalué la réactivité des deux tétrazines avec le V<sub>H</sub>H 7D12-BCN (Figure 146). Pour cela, deux réactions ont été réalisées dans le PBS (pH 7.4) à 37 °C avec 10 équivalents de tétrazine disubstituée **37** ou de tétrazine disubstituée DOTAGA-NH-Tz-S-SulfoCy5. Dans ces conditions, la formation du composé **38**, issu de la réaction de chimie *click* avec la tétrazine disubstituée **37**, n'a pas été détectée par spectrométrie de masse Orbitrap, tandis que le produit **39** a pu être obtenu.



**Figure 146.** Évaluation de la réactivité du 7D12-BCN vis-à-vis de tétrazines disubstituées par deux groupements amines ou par un groupement thiol et un groupement amine.

### Test de la réactivité des tétrazines disubstituées vis-à-vis du trastuzumab-BCN

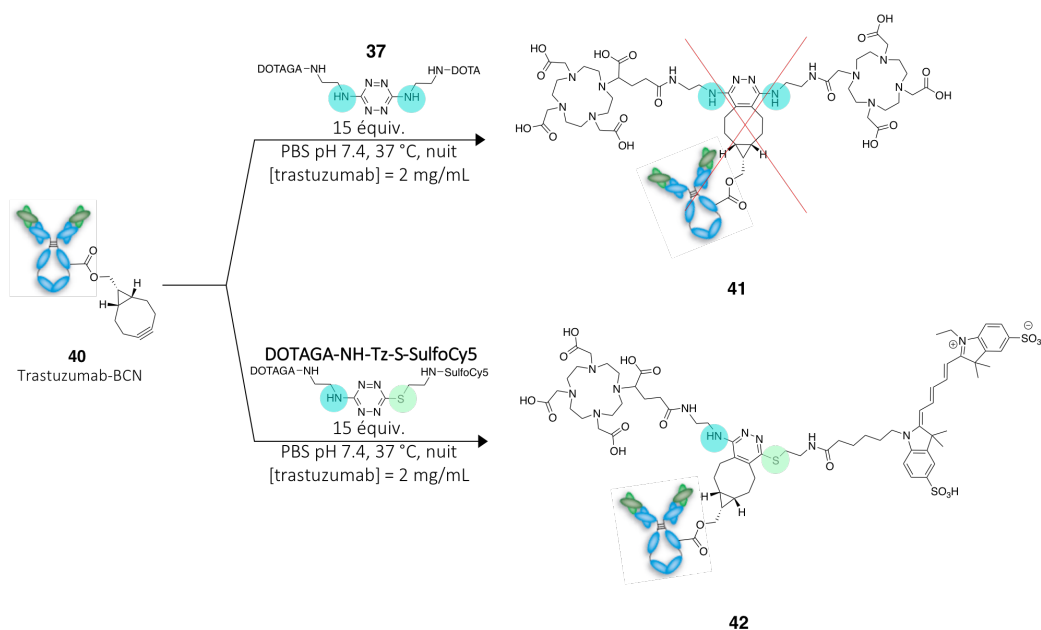
Afin de pouvoir travailler à des concentrations plus élevées en protéine, et au vu des faibles quantités de V<sub>H</sub> 7D12 que nous possédions, nous avons synthétisé un conjugué trastuzumab-BCN (Figure 147). Pour cela, le trastuzumab a été mis en présence de BCN sous forme de carbonate activé commercialement disponible (BCN-(*p*-NPC), 6 équivalents), dans un tampon borate (pH 8.57) à 25 °C pendant 2 h afin de réaliser la modification aléatoire des amines. Le composé **40** a pu être isolé après ultrafiltration (*cut-off* de 30 kDa) avec un rendement de 83%. Pour faciliter les analyses, une étape de déglycosylation a été réalisée grâce à l'enzyme PNGase pendant 24 h à 25 °C. L'analyse par spectrométrie de masse Orbitrap a mis en évidence l'introduction de un à cinq BCN par trastuzumab.



**Figure 147.** Modification aléatoire du trastuzumab par un BCN.

Nous avons ensuite évalué la réactivité des deux tétrazines disubstituées (**37** et DOTAGA-NH-Tz-S-SulfoCy5) avec le composé **40** (Figure 148). Deux réactions ont été réalisées dans les mêmes conditions que précédemment, mais à des concentrations plus élevées, et en ajoutant 15 équivalents de tétrazine disubstituée. À nouveau, la tétrazine **37** n'a pas réagi tandis que le composé **42**, issu de la réaction avec la tétrazine DOTAGA-NH-Tz-S-SulfoCy5, a pu être formé.

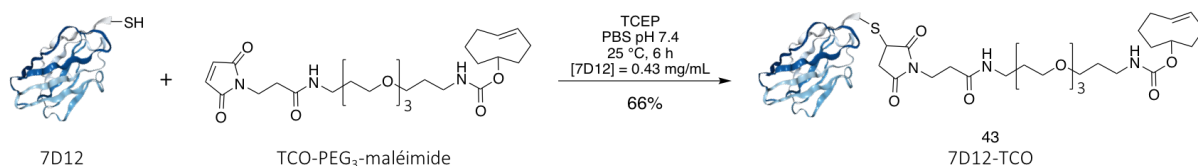
Malgré l'étape de déglycosylation, les spectres de masse Orbitrap contiennent de nombreux pics mais il semblerait que une voire deux sondes aient été introduites.



**Figure 148.** Évaluation de la réactivité du trastuzumab-BCN vis-à-vis de tétrazines disubstituées par deux groupements amines ou par un groupement thiol et un groupement amine.

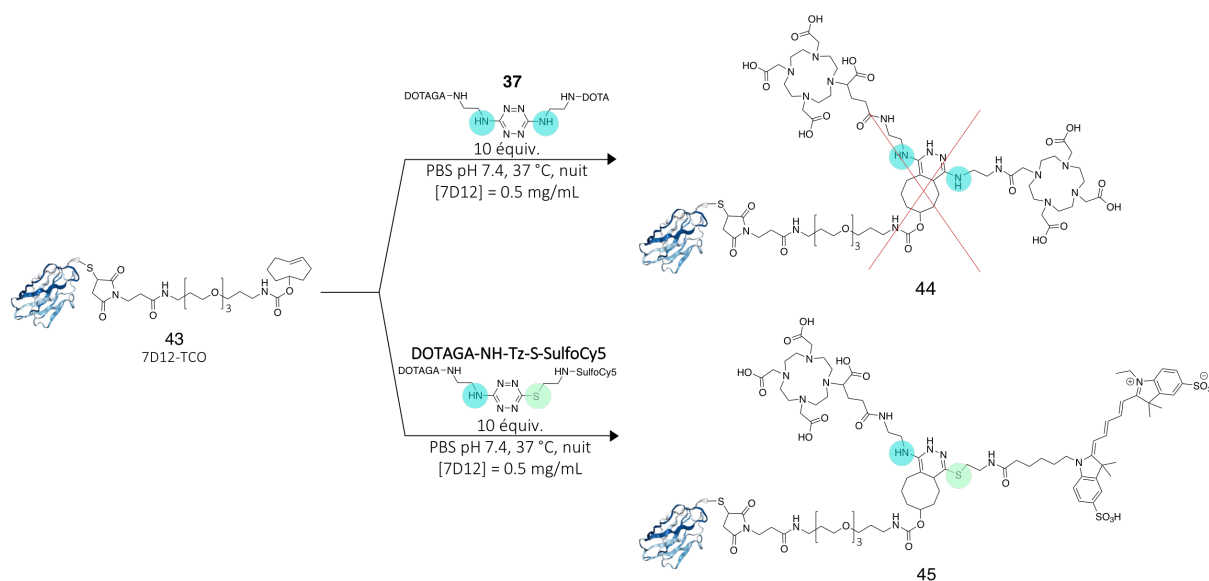
### Test de la réactivité des tétrazines disubstituées vis-à-vis du V<sub>H</sub>H 7D12-TCO

Le transcyclooctène (TCO) est un alcène cyclique contraint, de configuration E, présentant une réactivité supérieure à celle du BCN, c'est pourquoi nous avons souhaité l'évaluer. Nous avons donc synthétisé le composé **43** (V<sub>H</sub>H 7D12-TCO) (Figure 149). Pour cela, 20 équivalents de TCEP et 30 équivalents de TCO-PEG<sub>3</sub>-maléimide (disponible commercialement) ont été ajoutés au V<sub>H</sub>H 7D12 dans un tampon PBS (pH 7.4) à 25 °C pendant 6 h. Le V<sub>H</sub>H 7D12 modifié **43** a été obtenu avec un rendement de 66% après ultrafiltration.



**Figure 149.** Modification site-spécifique du V<sub>H</sub>H 7D12 par un TCO-PEG<sub>3</sub>-maléimide.

Les deux tétrazines disubstituées (**37** et DOTAGA-NH-Tz-S-SulfoCy5) ont ensuite été mises en réaction avec le composé **43** dans les mêmes conditions qu'avec le composé V<sub>H</sub>H 7D12-BCN (Figure 150). Malgré la réactivité supérieure du TCO, le produit **44** n'a pas pu être observé. En revanche, comme précédemment, la formation du composé **45** a pu être détectée.

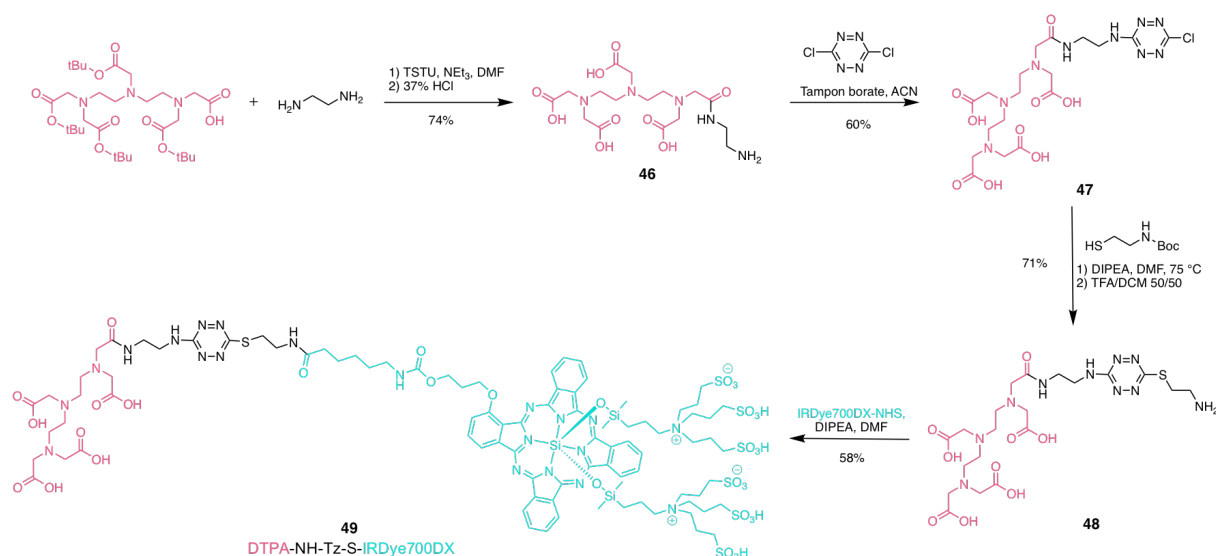


**Figure 150.** Évaluation de la réactivité du V<sub>H</sub>H 7D12-TCO vis-à-vis de tétrazines disubstituées par deux groupements amines ou par un groupement thiol et un groupement amine.

Pour conclure, d'après ces différents essais, il semblerait que les amines enrichissent trop électriquement le cycle tétrazine, comparé au thiol, ce qui diminue sa réactivité. Nous avons donc opté pour la synthèse d'une tétrazine disubstituée par un groupement amine et un groupement thiol. De plus, au vu des résultats similaires obtenus pour le 7D12-BCN et le 7D12-TCO, nous avons choisi d'utiliser le BCN comme diénophile car il présente une stabilité supérieure au TCO, notamment vis-à-vis de l'isomérisation.

#### II.2.4. Préparation de la sonde bimodale

La sonde bimodale DTPA-NH-Tz-S-IRDye700DX a été synthétisée en quatre étapes avec un rendement global de 18% (Figure 151).



**Figure 151.** Schéma de synthèse de la sonde bimodale DTPA-NH-Tz-S-IRDye700DX, 49.

Tout d'abord, l'acide carboxylique libre du DTPA(tBu)<sub>4</sub>, activé avec le TSTU, a été mis à réagir avec l'éthylène diamine en milieu basique. L'hydrolyse des groupements *tert*-butyles en milieu acide a conduit au produit **46**. Celui-ci a ensuite réagi avec la dichlorotétrazine pour donner la tétrazine monosubstituée **47**. La *N*-Boc-cystéamine carbamate a ensuite été introduite sur la tétrazine, en milieu basique à 75 °C, pour conduire au composé **48** après déprotection de l'amine en milieu acide. Enfin, la dernière étape a consisté à faire réagir l'amine libre du composé **48** avec l'IRDye700DX, sous forme d'ester activé de NHS (disponible commercialement). Chaque intermédiaire a été purifié par RP-HPLC semi-préparative en utilisant des éluants acides (0.1% TFA), excepté pour le composé **49**, hexasulfonaté, qui a été purifié en utilisant un tampon bicarbonate de triéthylammonium (TEAB, pH 7.5-8.0) et l'acétonitrile comme éluants.

### II.2.5. Bioconjugaison

Le travail d'optimisation des conditions expérimentales a permis de synthétiser le conjugué bimodal en deux étapes (Figure 152).

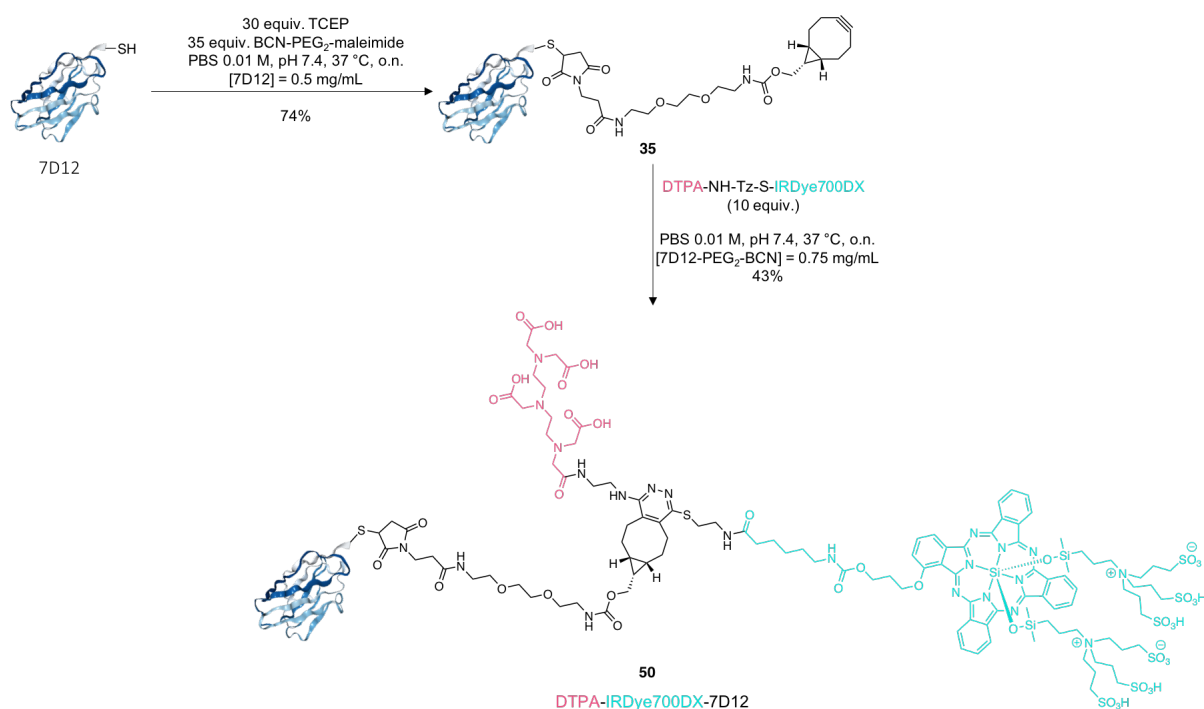
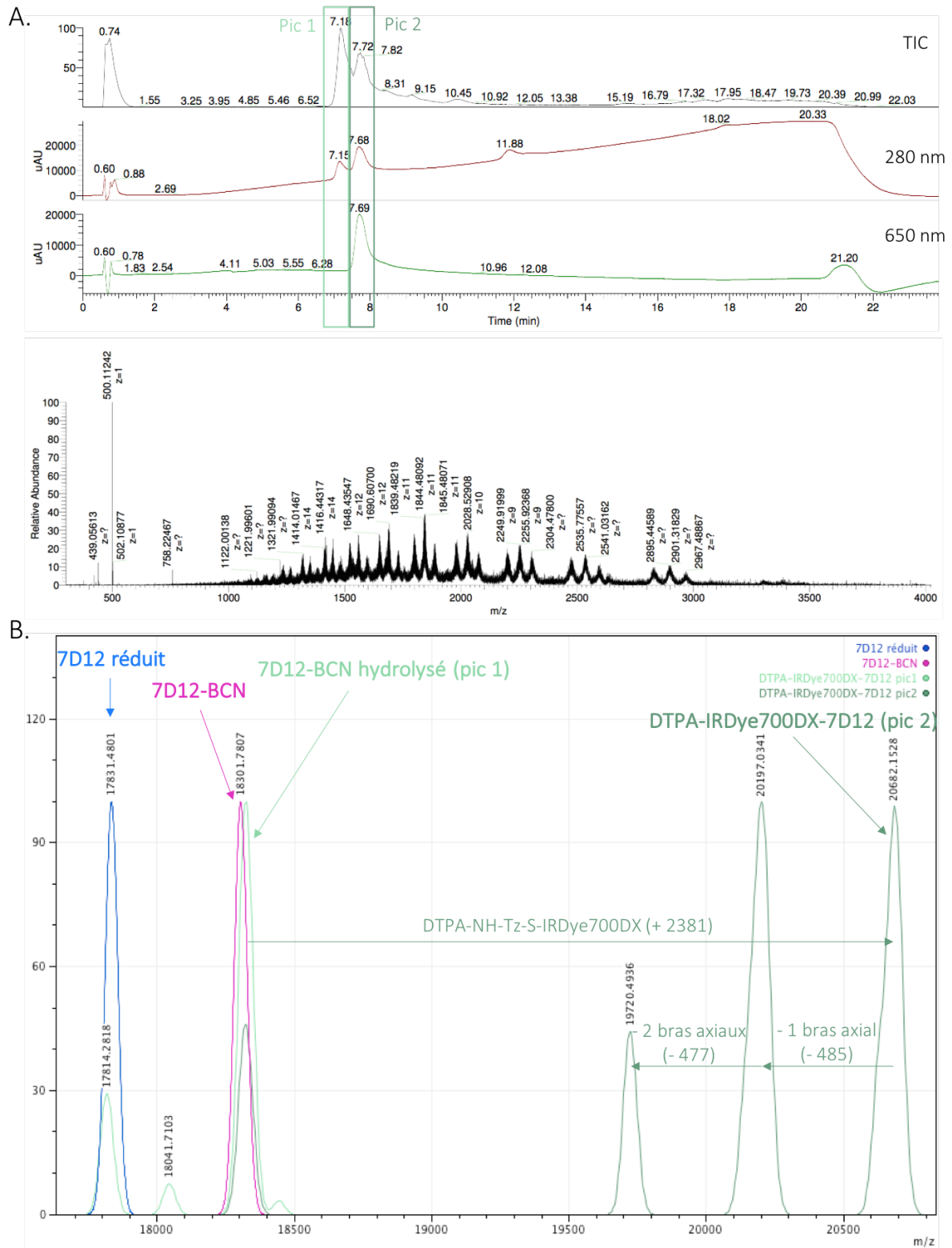


Figure 152. Schéma de synthèse du conjugué DTPA-IRDye700DX-7D12, **50**.

Pour rappel, la première étape a consisté en l'introduction du BCN-PEG<sub>2</sub>-maléimide, sur la cystéine en position C-terminale, en ajoutant 30 équivalents de TCEP et 35 équivalents de BCN-PEG<sub>2</sub>-maléimide à une solution de V<sub>H</sub>H 7D12 dans le PBS (pH 7.4, 0.5 mg/mL) à 37 °C pendant une nuit. L'ultrafiltration, sur des filtres de 3 kDa, a permis d'éliminer l'excès de réactifs et de concentrer le milieu réactionnel. Un degré de marquage de 1 a été déterminé

par spectrométrie de masse Orbitrap et MALDI-TOF. Ensuite, la deuxième étape est l'étape de chimie *click*, réalisée en ajoutant 10 équivalents de sonde bimodale **49** au V<sub>H</sub>H 7D12-BCN dans un tampon PBS (pH 7.4, 0.75 mg/mL), pendant une nuit à 37 °C. Enfin, une purification par FPLC (*fast protein liquid chromatography*) sur une colonne d'exclusion stérique a permis d'éliminer l'excès de sonde bimodale. L'ultrafiltration n'a pas été utilisée pour cette étape car le conjugué portant la sonde bimodale s'adsorbe fortement aux filtres des dispositifs d'ultrafiltration. Cette étape a permis d'obtenir le composé **50** avec des rendements compris entre 34 et 57%. Un total de 2.28 mg de composé bimodal **50** a pu être isolé.

L'analyse RP-HPLC-MS (Orbitrap) du composé **50** a permis d'identifier la présence de deux composés (Figure 153). Nous supposons que le premier correspond au V<sub>H</sub>H 7D12-BCN hydraté (pic 1,  $t_R = 7.2$  min). En effet, il présente une différence de masse de +18 Da (18320 Da) par rapport au 7D12-BCN **35**. Le maléimide aurait aussi pu subir une hydrolyse mais celle-ci nécessite généralement des pH plus élevés, et nous aurions également dû observer le produit hydrolysé lors de la synthèse du V<sub>H</sub>H 7D12-BCN **35**. De plus, nous avons, dans notre équipe, déjà pu observer l'addition d'eau ou de TFA sur le BCN, ce qui confirme cette hypothèse. Le deuxième composé correspond au conjugué souhaité, DTPA-IRDye700DX-7D12 **50** (pic 2,  $t_R = 7.7$  min). On peut observer plusieurs pics sur le spectre de masse déconvolué : celui à 20682 Da correspondant au conjugué, et deux autres pics (20197 Da et 19720 Da) correspondant à la perte des groupements axiaux de la phtalocyanine, issus de la fragmentation lors de l'étape d'ionisation dans le spectromètre de masse. La purification n'a pas permis d'éliminer le 7D12-BCN hydrolysé, conduisant à une solution finale composée de 68% du conjugué **50**. La concentration du conjugué a été mesurée par spectrophotométrie UV-visible en utilisant le coefficient d'extinction molaire de l'IRDye700DX à 689 nm dans le PBS ( $165000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). Un degré de marquage de 0.56 a été déterminé par spectroscopie UV-visible. Pour cela, un facteur de correction (0.1) a été utilisé pour tenir compte de la contribution de l'absorbance de la phtalocyanine à 280 nm. Il serait probablement possible d'améliorer ces rendements de conjugaison en augmentant le nombre d'équivalents de sonde bimodale utilisée ou en utilisant un diénophile plus réactif tel que le TCO par exemple. Cependant, par manque de temps et de réactifs, nous n'avons pas pu évaluer ces conditions.

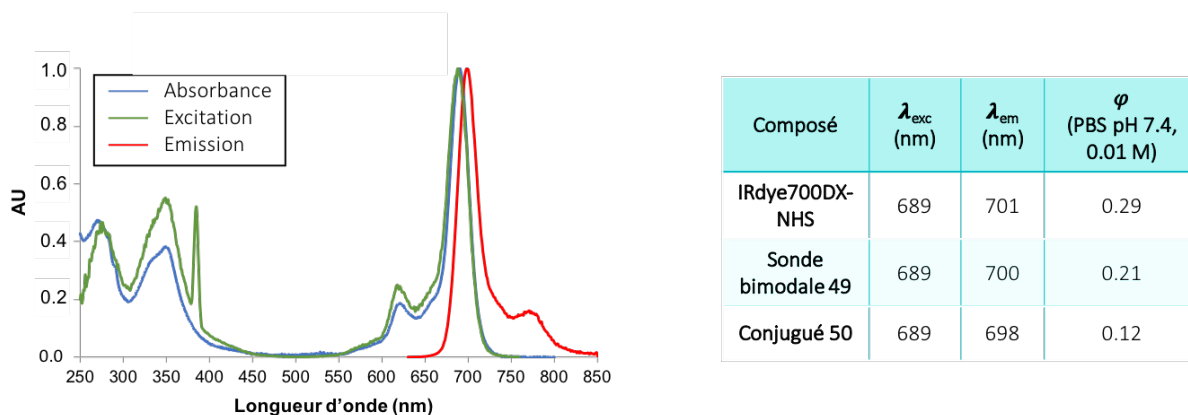




## II.2.6. Propriétés spectrales

Les propriétés photophysiques de l'IRDye700DX, de la sonde bimodale **49** et du conjugué **50** ont ensuite été évaluées. Les spectres d'absorbance UV-visible et de fluorescence ont été enregistrés à 25 °C dans un tampon phosphate 0.01 M à pH 7.4 (Figure 154). Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission, aux alentours de 690 nm, ne sont pas impactées par la conjugaison au 7D12. D'autre part, aucune agrégation n'a été observée dans la solution tampon utilisée.

Les rendements quantiques de fluorescence ont été mesurés dans le même tampon, à 25 °C, en utilisant comme référence un membre de la famille des azaBODIPY possédant un rendement quantique de 0.36.<sup>158</sup> Une légère diminution du rendement quantique pour la sonde bimodale (0.21) et pour le conjugué **50** (0.12) a été observée par rapport à l'IRDye700DX-NHS (0.29). Ce rendement quantique de 12% est conforme à ce qui a déjà été décrit dans la littérature.<sup>150</sup>



**Figure 154.** Spectres photophysiques normalisés (absorbance, excitation et émission) du conjugué **50** et tableau résumant les  $\lambda_{Exc,max}$ ,  $\lambda_{Em,max}$  et rendements quantiques de l'IRDye700DX-NHS, de la sonde bimodale **49** et du conjugué **50**.

Toutes les expériences qui suivent ont été réalisées par Sanne van Lith, à Nijmegen (Radboud University Medical Center, Pays-Bas).

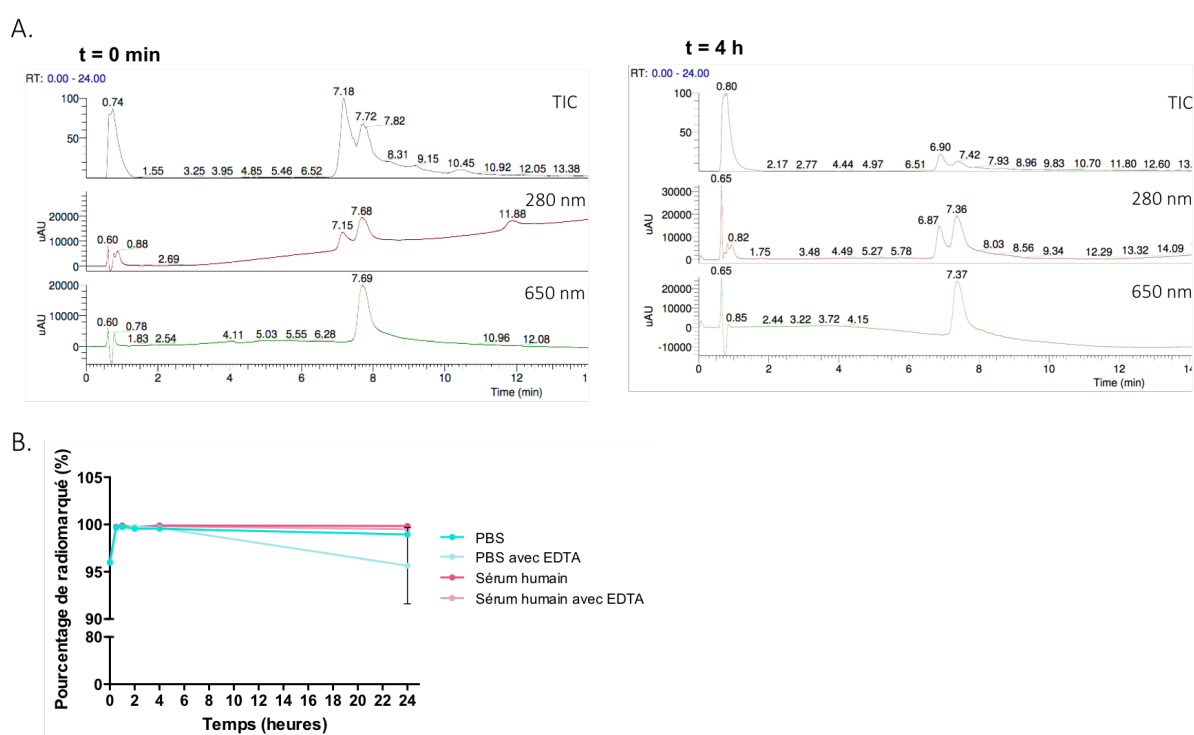
## II.3. Radiomarquage

Le conjugué **50** a ensuite été radiomarqué à l'indium-111. Pour cela, il a été ajouté à une solution tampon MES (acide 2-(*N*-morpholino)éthanesulfonique) (pH 5.5, 0.5 M) contenant le chlorure d'indium ( $[^{111}\text{In}]\text{InCl}_3$ ). La solution a ensuite été incubée à température ambiante pendant 30 min. L'efficacité de marquage et la pureté radiochimique ont été déterminées par iTLC. Le composé  $[^{111}\text{In}]\text{In-DTPA-IRDye700DX-7D12}$  a pu être obtenu avec des rendements de ~98%, des activités spécifiques allant jusqu'à 2 MBq/ $\mu\text{g}$  et des puretés supérieures à 95%.

La stabilité du conjugué **50** dans les conditions de radiomarquage a été évaluée. Pour cela le conjugué DTPA-IRDye700DX-7D12 a été introduit dans une solution à pH 5.0 contenant du HCl

0.05 M et du tampon MES 0.5 M puis incubé à 25 °C. Des prélèvements ont été effectués à 0 min, 1 h, 2 h et 4 h et analysés par RP-HPLC-MS (Orbitrap). Aucune dégradation n'a été observée après 4 h d'incubation (Figure 155A).

La stabilité du conjugué radiomarqué a aussi été évaluée en incubant [<sup>111</sup>In]In-**50** dans du tampon PBS ou du sérum humain avec excès (1000 équivalents) ou sans excès d'EDTA pendant 24 h à 37 °C. L'EDTA présente une forte affinité pour de nombreux métaux et est donc souvent utilisé comme agent compétiteur pour déterminer la stabilité d'un composé radiométallé. Après 24 h, aucune perte significative d'indium-111 n'a été observée malgré l'excès d'EDTA (Figure 155B).



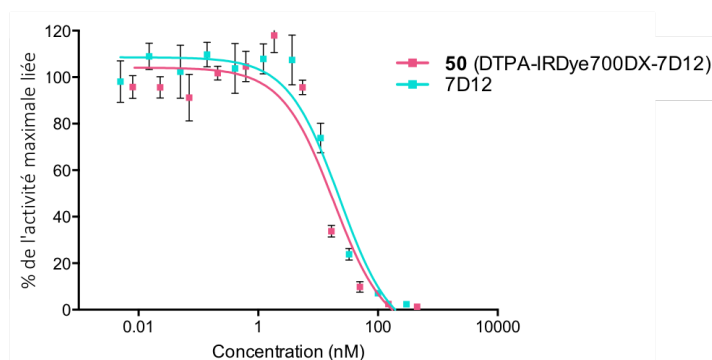
**Figure 155.** A. Chromatogrammes RP-HPLC (TIC, 280 nm et 650 nm) du composé **50** à 0 min et après 4 h d'incubation dans les conditions de radiomarquage ; B. Stabilité du conjugué [<sup>111</sup>In]In-**50** dans le PBS ou le sérum humain, avec ou sans excès d'EDTA.

## II.4. Évaluation du conjugué *in vitro*

### II.4.1. Affinité et internalisation

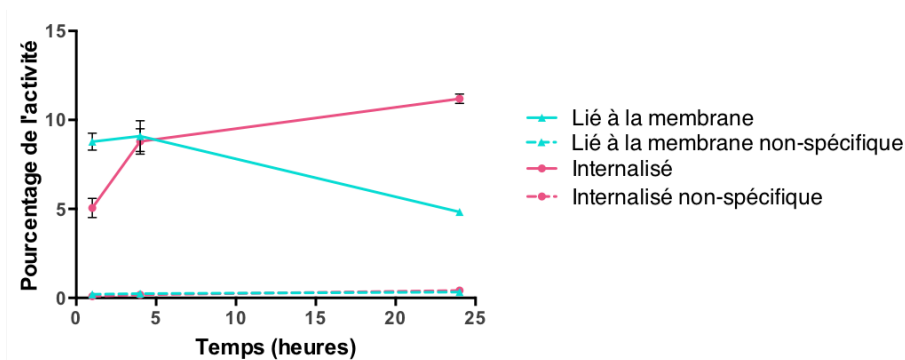
L'affinité du V<sub>H</sub>H 7D12 natif et du conjugué **50** pour les récepteurs EGFR a ensuite été évaluée par un test de déplacement sur des cellules A431. Pour cela, les cellules A431 ont été incubées avec une quantité fixe du conjugué [<sup>111</sup>In]In-**50** (310 pM) et des concentrations croissantes de DTPA-IRDye700DX-7D12 non radioactif et de V<sub>H</sub>H 7D12 natif (0.005 à 450 nM). Des IC<sub>50</sub> assez similaires (22.76 nM pour le V<sub>H</sub>H 7D12 contre 18.11 nM pour le conjugué **50**) ont été obtenues.

Ces résultats montrent que l'ajout de la sonde bimodale sur le 7D12 n'interfère que très peu avec la liaison du vecteur 7D12 au récepteur à l'EGF (Figure 156).



**Figure 156.** Détermination des  $IC_{50}$  du  $V_H$  7D12 et du conjugué **50** par un test de compétition (régression non linéaire), en présence de 310 pM de  $[^{111}In]In-50$ .

La spécificité de la liaison au récepteur EGFR ainsi que l'internalisation du conjugué ont aussi été mesurées. Pour cela, des cellules A431 ont été incubées avec le conjugué  $[^{111}In]In-50$ , en présence ou non d'un excès de  $V_H$  7D12 natif, pendant 1 h, 4 h et 24 h. Les différentes fractions (fraction non liée, fraction liée à la membrane, fraction internalisée) ont pu être isolées et leur activité mesurée. La liaison spécifique et l'internalisation ont été calculées en soustrayant le signal non spécifique du signal total. Cette expérience a montré une liaison spécifique du conjugué  $[^{111}In]In-50$  à l'EGFR et une bonne internalisation du composé avec  $8.79 \pm 0.72\%$  de l'activité internalisée après 4 h et  $11.19 \pm 0.27\%$  après 24 h (Figure 157).



**Figure 157.** Fractions liées à la membrane ou internalisées de façon spécifique ou non-spécifique, exprimées en pourcentage de l'activité, après 1 h, 4 h et 24 h d'incubation du conjugué  $[^{111}In]In-50$  avec des cellules A431.

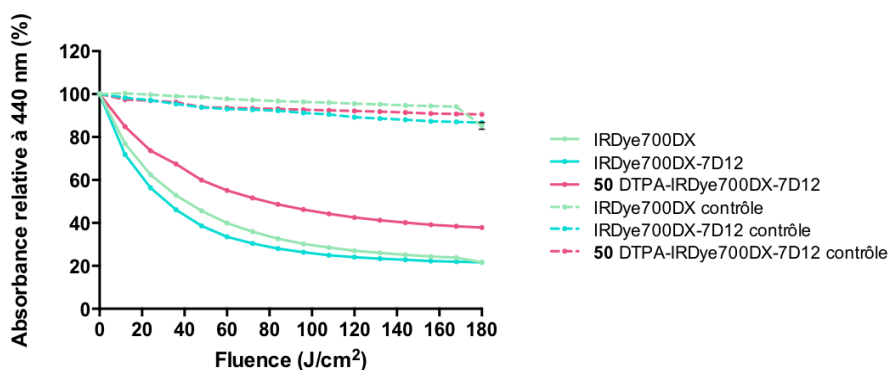
#### II.4.2. Évaluation de l'efficacité de la PDT

L'efficacité de la PDT a été évaluée sur des cellules A431. Pour cela, la quantité d'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) générée sous irradiation lumineuse, par le conjugué DTPA-IRDye700DX-7D12, a été mesurée et comparée à celles obtenues avec la sonde IRDye700DX seule et le conjugué monomodal IRDye700DX-7D12 (Figure 158).<sup>152</sup>

Le couple *N,N*-diméthyl-4-nitrosoaniline (RNO)/imidazole est utilisé pour déterminer la production d'oxygène singulet. En effet, en présence de cette espèce, l'imidazole est oxydé sous la forme d'un peroxyde imidazole-<sup>1</sup>O<sub>2</sub>, qui réagit ensuite avec la molécule de RNO pour former le dérivé oxydé RNO<sub>2</sub>. La bande d'absorption maximale de RNO à 440 nm diminue d'intensité lorsque RNO<sub>2</sub> se forme. On parle de photoblanchiment.

Le conjugué DTPA-IRDye700DX-7D12 **50** ainsi que l'IRDye700DX et IRDye700DX-7D12 ont donc été incubés dans un tampon phosphate (pH 7.4) avec de l'imidazole et la RNO puis excités à 690 nm. L'absorbance à 440 nm a été mesurée toutes les minutes pendant 15 min pour déterminer le blanchiment de RNO induit par l'oxygène singulet. Les contrôles ont été réalisés en l'absence d'imidazole.

On observe sur la Figure 158 une diminution de l'absorbance à 440 nm pour les trois composés excités, traduisant la formation d'oxygène singulet. La diminution d'absorbance liée à l'excitation du conjugué **50** est légèrement inférieure à celle observée pour l'IRDye700DX ce qui montre une légère perte d'efficacité de production d'oxygène singulet pour le conjugué bimodal **50**.

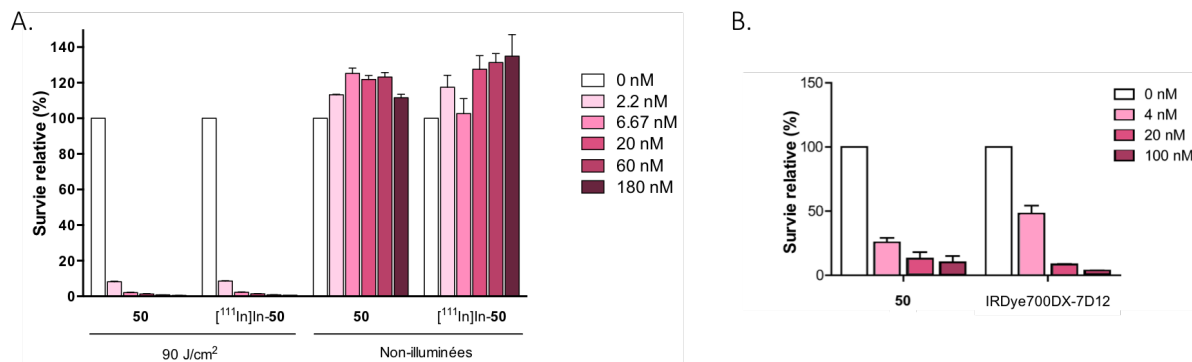


**Figure 158.** Absorbance relative de la molécule RNO traduisant la quantité d'oxygène singulet formée après l'excitation de solutions contenant soit l'IRDye700DX seule, soit le conjugué monomodal IRDye700DX-7D12, soit le conjugué bimodal **50**, en présence ou en l'absence d'imidazole (contrôles).

Ensuite, l'efficacité de la PDT a été mesurée. Des cellules A431 ont été incubées pendant 4 h avec des concentrations croissantes du conjugué **50** ou [<sup>111</sup>In]In-**50**. Elles ont ensuite été excitées par une diode électroluminescente d'une puissance de 200 mW/cm<sup>2</sup> pendant 7.5 min pour atteindre une dose de 90 J/cm<sup>2</sup>, à 690 nm.<sup>159</sup> Afin de montrer que la toxicité provient bien de l'excitation, des cellules ont été incubées dans les mêmes conditions mais n'ont pas été éclairées. La viabilité des cellules a été déterminée le lendemain.

Les cellules ayant été excitées ont montré un fort taux de mortalité (supérieur à 90%), de façon dose-dépendante (Figure 159A). Aucune différence n'a été observée entre le conjugué marqué et le non marqué. Cela indique que l'indium-111 n'altère pas l'activité du photosensibilisateur par blanchiment radiochimique. En revanche, les cellules non excitées, incubées avec le conjugué marqué ou non, n'ont pas montré de mort cellulaire, illustrant que la toxicité provient bien du photosensibilisateur.

Une comparaison a aussi été réalisée entre le conjugué bimodal DTPA-IRDye700DX-7D12 et le conjugué monomodal IRDye700DX-7D12.<sup>152</sup> Des résultats comparables ont été obtenus (Figure 159B).



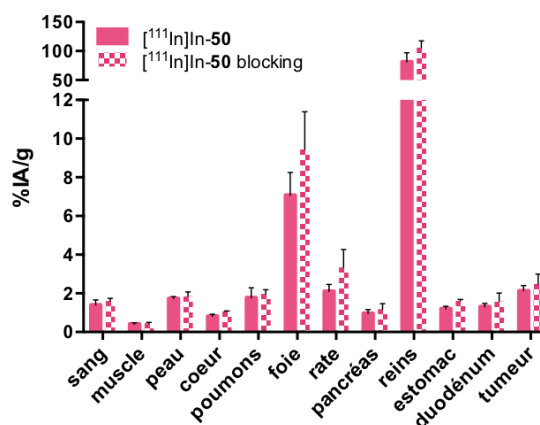
**Figure 159.** A. Efficacité de la PDT avec différentes concentrations du conjugué **50** et du conjugué  $[^{111}\text{In}]\text{In-50}$ , avec ou sans excitation lumineuse ; B. Comparaison de l'efficacité de la PDT entre le conjugué monomodal IRDye700DX-7D12 et le conjugué bimodal **50**.

## II.5. Évaluation du conjugué *in vivo*

Les propriétés pharmacocinétiques du conjugué théranostique ont ensuite été évaluées. Après le radiomarquage, la solution de  $[^{111}\text{In}]\text{In-50}$  a été diluée dans du PBS (contenant 0.5% de BSA). Le profil de biodistribution a été évalué en injectant le conjugué  $[^{111}\text{In}]\text{In-50}$  (7.5  $\mu\text{g}$ , 1 MBq) à des souris portant des xénogreffes de cellules A431 (n = 5) (Figure 160). La spécificité pour EGFR a été déterminée en injectant 300  $\mu\text{g}$  (40 équivalents) de 7D12 non marqué, 30 minutes avant l'injection du conjugué  $[^{111}\text{In}]\text{In-50}$ . Après 4 h, les souris ont été euthanasiées, les organes ont été récoltés, pesés et la radioactivité a été mesurée avec un compteur  $\gamma$ . Nous avons pu observer, dans le cadre de cette expérience préliminaire, une très faible accumulation dans la tumeur (~2.3%ID/g) et du signal principalement dans les reins (~95%ID/g) et dans le foie (~8.2%ID/g). La faible accumulation dans la tumeur peut être due à une clairance rénale trop rapide qui ne laisse pas le temps nécessaire au conjugué pour s'accumuler dans les tissus cibles. Cependant, malgré une clairance rapide, plusieurs études ont tout de même permis d'observer une bonne accumulation tumorale dès 1 h après l'injection et une rétention dans la tumeur même après quelques heures.<sup>148,149</sup> Toutefois, certaines études ont montré que l'accumulation tumorale pouvait être dépendante de la dose injectée<sup>160</sup> mais aussi de la taille des tumeurs.<sup>51</sup> Ces différents paramètres seront évalués dans des expériences futures.

Pour ce qui est du test de spécificité pour EGFR, on remarque que le profil de biodistribution est identique avec ou sans excès du V<sub>H</sub>H 7D12 natif, y compris l'accumulation tumorale. Plusieurs hypothèses peuvent être émises concernant ces résultats. Pour cette étude, nous avons fait le choix d'injecter 40 équivalents de 7D12 natif, 30 min avant l'injection du conjugué marqué. Il est possible que la quantité utilisée ou que ce laps de temps ne soient pas suffisants

pour avoir une compétition efficace. D'autres équipes ont choisi de réaliser ces expériences en utilisant des modèles de tumeurs n'exprimant pas EGFR<sup>51,161</sup> ou en pré-injectant du cétuximab 48 h et 24 h avant l'injection du conjugué radiomarqué.<sup>54</sup> Il pourrait donc être intéressant d'évaluer une de ces méthodes montrant de bons résultats.



**Figure 160.** Biodistribution *ex vivo*, 4 h après l'injection du conjugué [<sup>111</sup>In]In-50, avec ou sans excès de V<sub>H</sub>H 7D12 non marqué, à des souris portant une xélogreffe de cellules A431.

### III. Conclusion et perspectives

Pour conclure, nous avons synthétisé un V<sub>H</sub>H théranostique pour le diagnostic et la thérapie de cancers exprimant le récepteur à l'EGF (EGFR). Dans ce but, une sonde bimodale TEMP/PDT a été préparée en utilisant la plateforme dichlorotétrazine, puis *clickée* de façon site-spécifique sur un V<sub>H</sub>H 7D12 modifié par un groupement BCN-PEG<sub>2</sub>-maléimide porté par une cystéine en position C-terminale. Cette approche a permis de modifier le V<sub>H</sub>H 7D12 avec un degré de marquage de 0.56, dû à la présence d'une certaine proportion de 7D12-BCN hydraté. Ce conjugué a montré de bonnes propriétés spectrales avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission aux alentours de 690 nm et un rendement quantique de fluorescence de 12% (légèrement diminué par rapport à la sonde IRDye700DX non conjuguée). Le radiomarquage à l'indium-111 a pu être effectué dans des conditions douces, avec de bons rendements et puretés radiochimiques, ainsi que de bonnes activités spécifiques. Le conjugué marqué a montré une bonne stabilité dans le tampon PBS et dans le sérum humain après 24 h d'incubation. L'évaluation *in vitro* sur des cellules A431 a permis de montrer une bonne affinité pour EGFR (IC<sub>50</sub> = 18.1 nM) et une internalisation significative du récepteur (11.3% après 24 h). L'efficacité de la production d'oxygène singulet a été légèrement diminuée par rapport à l'IRDye700DX seule. Toutefois, une très bonne activité cytotoxique par effet PDT (> 90% de mort cellulaire) a été observée après l'excitation de cellules A431 incubées avec le conjugué.

Enfin, les propriétés pharmacocinétiques ont été évaluées sur des souris portant des xélogreffes A431. Malheureusement, 4 h après l'injection du composé marqué à l'indium-

111, une très faible accumulation dans la tumeur a été observée (2.3%ID/g), comparable à celle observée dans la plupart des tissus sains, et la majorité du signal a été retrouvée dans les reins (~95%ID/g) et dans le foie (~8.2%ID/g). Ce résultat peut être dû à différents paramètres tels que l'excrétion trop rapide du conjugué, limitant l'accès à la tumeur, la taille trop importante des tumeurs, la dose injectée insuffisante, etc. De nouvelles expériences sont en cours afin d'optimiser les conditions, en évaluant différentes doses, différents temps d'imagerie, et sur deux lignées cellulaires exprimant EGFR (A431 et SKOV). De même, pour l'expérience de compétition, de nouveaux essais seront réalisés en injectant du cétuximab un jour avant l'injection du composé radiomarké.

Nous pensons tout de même que le développement d'un tel composé présente un potentiel pour le diagnostic et la thérapie de cancers exprimant EGFR. En clinique, l'imagerie TEMP permettrait de diagnostiquer les patients, stadifier les pathologies, et orienter la chirurgie en localisant les tumeurs, tandis que la sonde PDT permettrait, grâce à sa fluorescence et à sa capacité à produire des ROS, à la fois l'assistance à la chirurgie mais aussi la destruction des cellules tumorales pouvant rester après la résection de la tumeur.

De futurs travaux pourraient être axés sur l'utilisation de diénophiles plus réactifs que le BCN (tels que le TCO) pour améliorer le pourcentage de protéine marquée avec la sonde bimodale. Il pourrait aussi être intéressant de diminuer la vitesse d'excrétion du conjugué pour obtenir une meilleure accumulation tumorale. En effet, pour la thérapie photodynamique, il est important d'avoir une très bonne accumulation tumorale pour avoir une bonne efficacité et peu d'effets indésirables. Pour cela, il est possible de ralentir l'excrétion rénale de la protéine, en la conjuguant à des groupements PEG, ou d'augmenter la liaison aux protéines plasmatiques en ajoutant, par exemple, des motifs de liaisons à l'albumine. De plus, plusieurs études ont montré que les charges positives du His *tag* sont responsables d'une augmentation de l'accumulation dans les reins.<sup>140,162-164</sup> Il pourrait donc être judicieux de remplacer ce *tag* par un autre *tag* permettant la purification (EPEA par exemple).<sup>165</sup>

Enfin, cette approche synthétique est flexible et peut donc être utilisée pour le marquage site-spécifique d'une variété de petites protéines ciblant d'autres récepteurs impliqués dans d'autres types de cancers. Selon les applications souhaitées, la nature des sondes introduites sur la tétrazine peut être aisément modifiée.



## Références

- (1) Sergina, N. V.; Moasser, M. M. The HER Family and Cancer: Emerging Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. *Trends Mol. Me.d* **2007**, *13* (12), 527–534. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.10.002>.
- (2) Du, Z.; Lovly, C. M. Mechanisms of Receptor Tyrosine Kinase Activation in Cancer. *Mol. Cancer* **2018**, *17* (1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0782-4>.
- (3) Sigismund, S.; Avanzato, D.; Lanzetti, L. Emerging Functions of the EGFR in Cancer. *Mol. Oncol.* **2018**, *12* (1), 3–20. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12155>.
- (4) Pines, G.; Köstler, W. J.; Yarden, Y. Oncogenic Mutant Forms of EGFR: Lessons in Signal Transduction and Targets for Cancer Therapy. *FEBS Lett.* **2010**, *584* (12), 2699–2706. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.019>.
- (5) Gullick, W. J. Prevalence of Aberrant Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor in Human Cancers. *Br. Med. Bull.* **1991**, *47* (1), 87–98. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072464>.
- (6) Salomon, D. S.; Brandt, R.; Ciardiello, F.; Normanno, N. Epidermal Growth Factor-Related Peptides and Their Receptors in Human Malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **1995**, *19* (3), 183–232. [https://doi.org/10.1016/1040-8428\(94\)00144-i](https://doi.org/10.1016/1040-8428(94)00144-i).
- (7) Normanno, N.; De Luca, A.; Bianco, C.; Strizzi, L.; Mancino, M.; Maiello, M. R.; Carotenuto, A.; De Feo, G.; Caponigro, F.; Salomon, D. S. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Signaling in Cancer. *Gene* **2006**, *366* (1), 2–16. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.10.018>.
- (8) Liu, F.; Hon, G. C.; Villa, G. R.; Turner, K. M.; Ikegami, S.; Yang, H.; Ye, Z.; Li, B.; Kuan, S.; Lee, A. Y.; Zanca, C.; Wei, B.; Lucey, G.; Jenkins, D.; Zhang, W.; Barr, C. L.; Furnari, F. B.; Cloughesy, T. F.; Yong, W. H.; Gahman, T. C.; Shiau, A. K.; Cavenee, W. K.; Ren, B.; Mischel, P. S. EGFR Mutation Promotes Glioblastoma Through Epigenome and Transcription Factor Network Remodeling. *Mol. Cell.* **2015**, *60* (2), 307–318. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.09.002>.
- (9) Brabender, J.; Danenberg, K. D.; Metzger, R.; Schneider, P. M.; Park, J.; Salonga, D.; Hölscher, A. H.; Danenberg, P. V. Epidermal Growth Factor Receptor and HER2-Neu mRNA Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Is Correlated with Survival. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7* (7), 1850–1855.
- (10) Nicholson, R. I.; Gee, J. M. W.; Harper, M. E. EGFR and Cancer Prognosis. *Eur. J. Cancer* **2001**, *37*, 9–15. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(01\)00231-3](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(01)00231-3).
- (11) Alanazi, I. O.; Khan, Z. Understanding EGFR Signaling in Breast Cancer and Breast Cancer Stem Cells: Overexpression and Therapeutic Implications. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2016**, *17* (2), 445–453. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2016.17.2.445>.
- (12) Burtness, B. Her Signaling in Pancreatic Cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2007**, *7* (6), 823–829. <https://doi.org/10.1517/14712598.7.6.823>.
- (13) Day, K. C.; Hiles, G. L.; Kozminsky, M.; Dawsey, S. J.; Paul, A.; Brose, L. J.; Shah, R.; Kunja, L. P.; Hall, C.; Palanisamy, N.; Daignault-Newton, S.; El-Sawy, L.; Wilson, S. J.; Chou, A.; Ignatoski, K. W.; Keller, E.; Thomas, D.; Nagrath, S.; Morgan, T.; Day, M. L. HER2 and EGFR Overexpression Support Metastatic Progression of Prostate Cancer to Bone. *Cancer Res.* **2017**, *77* (1), 74–85. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1656>.
- (14) Dassonville, O.; Formento, J. L.; Francoual, M.; Ramaioli, A.; Santini, J.; Schneider, M.; Demard, F.; Milano, G. Expression of Epidermal Growth Factor Receptor and Survival in Upper Aerodigestive Tract Cancer. *JCO* **1993**, *11* (10), 1873–1878. <https://doi.org/10.1200/JCO.1993.11.10.1873>.
- (15) Li, W.; Wang, Y.; Tan, S.; Rao, Q.; Zhu, T.; Huang, G.; Li, Z.; Liu, G. Overexpression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and HER-2 in Bladder Carcinoma and Its Association with Patients' Clinical Features. *Med. Sci. Monit.* **2018**, *24*, 7178–7185. <https://doi.org/10.12659/MSM.911640>.
- (16) Gschwind, A.; Fischer, O. M.; Ullrich, A. The Discovery of Receptor Tyrosine Kinases: Targets for Cancer Therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4* (5), 361–370. <https://doi.org/10.1038/nrc1360>.
- (17) Rude Voldborg, B.; Damstrup, L.; Spang-Thomsen, M.; Skovgaard Poulsen, H. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and EGFR Mutations, Function and Possible Role in Clinical Trials. *Ann. Oncol.* **1997**, *8* (12), 1197–



1206. <https://doi.org/10.1023/A:1008209720526>.

- (18) Vijver, M. J. V. de; Kumar, R.; Mendelsohn, J. Ligand-Induced Activation of A431 Cell Epidermal Growth Factor Receptors Occurs Primarily by an Autocrine Pathway That Acts upon Receptors on the Surface Rather than Intracellularly. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (12), 7503–7508.
- (19) Martinelli, E.; De Palma, R.; Orditura, M.; De Vita, F.; Ciardiello, F. Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Clin. Exp. Immunol.* **2009**, *158* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03992.x>.
- (20) Hrustanovic, G.; Lee, B. J.; Bivona, T. G. Mechanisms of Resistance to EGFR Targeted Therapies. *Cancer Biol. Ther.* **2013**, *14* (4), 304–314. <https://doi.org/10.4161/cbt.23627>.
- (21) Pao, W.; Miller, V. A.; Politi, K. A.; Riely, G. J.; Somwar, R.; Zakowski, M. F.; Kris, M. G.; Varmus, H. Acquired Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib Is Associated with a Second Mutation in the EGFR Kinase Domain. *PLoS Med.* **2005**, *2* (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020073>.
- (22) Kobayashi, S.; Boggon, T. J.; Dayaram, T.; Janne, P. A.; Kocher, O.; Meyerson, M.; Johnson, B. E.; Eck, M. J.; Tenen, D. G.; Halmos, B. EGFR Mutation and Resistance of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib [https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa044238?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub++0www.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa044238?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0www.ncbi.nlm.nih.gov) (accessed May 20, 2020). <https://doi.org/10.1056/NEJMoa044238>.
- (23) Montagut, C.; Dalmases, A.; Bellosillo, B.; Crespo, M.; Pairet, S.; Iglesias, M.; Salido, M.; Gallen, M.; Marsters, S.; Tsai, S. P.; Minoche, A.; Seshagiri, S.; Somasekar, S.; Serrano, S.; Himmelbauer, H.; Bellmunt, J.; Rovira, A.; Settleman, J.; Bosch, F.; Albanell, J. Identification of a Mutation in the Extracellular Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Conferring Cetuximab Resistance in Colorectal Cancer. *Nat. Med.* **2012**, *18* (2), 221–223. <https://doi.org/10.1038/nm.2609>.
- (24) Wheeler, D. L.; Huang, S.; Kruser, T. J.; Nechrebecki, M. M.; Armstrong, E. A.; Benavente, S.; Gondi, V.; Hsu, K.-T.; Harari, P. M. Mechanisms of Acquired Resistance to Cetuximab: Role of HER (ErbB) Family Members. *Oncogene* **2008**, *27* (28), 3944–3956. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.19>.
- (25) Razumienko, E. J.; Chen, J. C.; Cai, Z.; Chan, C.; Reilly, R. M. Dual-Receptor-Targeted Radioimmunotherapy of Human Breast Cancer Xenografts in Athymic Mice Coexpressing HER2 and EGFR Using <sup>177</sup>Lu- or <sup>111</sup>In-Labeled Bispecific Radioimmunoconjugates. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57* (3), 444–452. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.162339>.
- (26) Kwon, L. Y.; Scollard, D. A.; Reilly, R. M. <sup>64</sup>Cu-Labeled Trastuzumab Fab-PEG24-EGF Radioimmunoconjugates Bispecific for HER2 and EGFR: Pharmacokinetics, Biodistribution, and Tumor Imaging by PET in Comparison to Monospecific Agents. *Mol. Pharm.* **2017**, *14* (2), 492–501. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00963>.
- (27) Chen, W.; Shen, B.; Sun, X. Analysis of Progress and Challenges of EGFR-Targeted Molecular Imaging in Cancer With a Focus on Affibody Molecules. *Mol. Imaging* **2019**, *18*. <https://doi.org/10.1177/1536012118823473>.
- (28) Velikyan, I.; Sundberg, Å. L.; Lindhe, Ö.; Höglund, A. U.; Eriksson, O.; Werner, E.; Carlsson, J.; Bergström, M.; Långström, B.; Tolmachev, V. Preparation and Evaluation of <sup>68</sup>Ga-DOTA-HEGF for Visualization of EGFR Expression in Malignant Tumors. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46* (11), 1881–1888.
- (29) Li, W.; Niu, G.; Lang, L.; Guo, N.; Ma, Y.; Kiesewetter, D. O.; Backer, J. M.; Shen, B.; Chen, X. PET Imaging of EGF Receptors Using [<sup>18</sup>F]FBEM-EGF in a Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Model. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39* (2), 300–308. <https://doi.org/10.1007/s00259-011-1969-8>.
- (30) Reilly, R. M.; Kiarash, R.; Sandhu, J.; Lee, Y. W.; Cameron, R. G.; Hendler, A.; Vallis, K.; Gariépy, J. A Comparison of EGF and MAb 528 Labeled with <sup>111</sup>In for Imaging Human Breast Cancer. *J. Nucl. Med.* **2000**, *41* (5), 903–911.
- (31) Yamaguchi, A.; Achmad, A.; Hanaoka, H.; Heryanto, Y. D.; Bhattarai, A.; Ratianto; Khongorzul, E.; Shintawati, R.; Kartamihardja, A. A. P.; Kanai, A.; Sugo, Y.; S. Ishioka, N.; Higuchi, T.; Tsushima, Y. Immuno-PET Imaging for Non-Invasive Assessment of Cetuximab Accumulation in Non-Small Cell Lung Cancer. *BMC Cancer* **2019**, *19*. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6238-4>.

- (32) Even, A. J. G.; Hamming-Vrieze, O.; van Elmpt, W.; Winnepeninckx, V. J. L.; Heukelom, J.; Tesselaar, M. E. T.; Vogel, W. V.; Hoeben, A.; Zegers, C. M. L.; Vugts, D. J.; van Dongen, G. A. M. S.; Bartelink, H.; Mottaghy, F. M.; Hoebbers, F.; Lambin, P. Quantitative Assessment of Zirconium-89 Labeled Cetuximab Using PET/CT Imaging in Patients with Advanced Head and Neck Cancer: A Theragnostic Approach. *Oncotarget* **2016**, *8* (3), 3870–3880. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13910>.
- (33) Menke-van der Houven van Oordt, C. W.; Gootjes, E. C.; Huisman, M. C.; Vugts, D. J.; Roth, C.; Luik, A. M.; Mulder, E. R.; Schuit, R. C.; Boellaard, R.; Hoekstra, O. S.; van Dongen, G. A.; Verheul, H. M. W. 89Zr-Cetuximab PET Imaging in Patients with Advanced Colorectal Cancer. *Oncotarget* **2015**, *6* (30), 30384–30393.
- (34) KIM, E. J.; KIM, B. S.; CHOI, D. B.; CHI, S.-G.; CHOI, T. H. Enhanced Tumor Retention of Radioiodinated Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibody Using Novel Bifunctional Iodination Linker for Radioimmunotherapy. *Oncol. Rep.* **2016**, *35* (6), 3159–3168. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4706>.
- (35) Shih, B.-B.; Chang, Y.-F.; Cheng, C.-C.; Yang, H.-J.; Chang, K.-W.; Ho, A.-S.; Lin, H.-C.; Yeh, C.; Chang, C.-C. SPECT Imaging Evaluation of 111indium-Chelated Cetuximab for Diagnosing EGFR-Positive Tumor in an HCT-15-Induced Colorectal Xenograft. *J. Chin. Med. Assoc.* **2017**, *80* (12), 766–773. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.02.010>.
- (36) Ping Li, W.; Meyer, L. A.; Capretto, D. A.; Sherman, C. D.; Anderson, C. J. Receptor-Binding, Biodistribution, and Metabolism Studies of 64Cu-DOTA-Cetuximab, a PET-Imaging Agent for Epidermal Growth-Factor Receptor-Positive Tumors. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2008**, *23* (2), 158–171. <https://doi.org/10.1089/cbr.2007.0444>.
- (37) Chang, A. J.; De Silva, R. A.; Lapi, S. E. Development and Characterization of 89Zr-Labeled Panitumumab for Immuno-Positron Emission Tomographic Imaging of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Mol. Imaging* **2013**, *12* (1), 17–27.
- (38) Bhattacharyya, S.; Kurdziel, K.; Wei, L.; Riffle, L.; Kaur, G.; Hill, G. C.; Jacobs, P. M.; Tatum, J. L.; Doroshow, J. H.; Kalen, J. D. Zirconium-89 Labeled Panitumumab: A Potential Immuno-PET Probe for HER1-Expressing Carcinomas. *Nucl. Med. Biol.* **2013**, *40* (4), 451–457. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2013.01.007>.
- (39) Niu, G.; Li, Z.; Xie, J.; Le, Q.-T.; Chen, X. PET of EGFR Antibody Distribution in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Models. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50* (7), 1116–1123. <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.061820>.
- (40) Nayak, T. K.; Garmestani, K.; Baidoo, K. E.; Milenic, D. E.; Brechbiel, M. W. Preparation, Biological Evaluation and Pharmacokinetics of Human Anti-HER1 Monoclonal Antibody, Panitumumab, Labeled with 86Y for Quantitative PET Imaging of Carcinoma. *J. Nucl. Med.* **2010**, *51* (6), 942–950. <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.071290>.
- (41) Aerts, H. J. W. L.; Dubois, L.; Perk, L.; Vermaelen, P.; Dongen, G. A. M. S. van; Wouters, B. G.; Lambin, P. Disparity Between In Vivo EGFR Expression and 89Zr-Labeled Cetuximab Uptake Assessed with PET. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50* (1), 123–131. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.054312>.
- (42) Milenic, D. E.; Wong, K. J.; Baidoo, K. E.; Ray, G. L.; Garmestani, K.; Williams, M.; Brechbiel, M. W. Cetuximab: Preclinical Evaluation of a Monoclonal Antibody Targeting EGFR for Radioimmunodiagnostic and Radioimmunotherapeutic Applications. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2008**, *23* (5), 619–632. <https://doi.org/10.1089/cbr.2008.0493>.
- (43) Loon, J. van; Even, A. J. G.; Aerts, H. J. W. L.; Öllers, M.; Hoebbers, F.; Elmpt, W. van; Dubois, L.; Dingemans, A.-M. C.; Lalisang, R. I.; Kempers, P.; Brans, B.; Winnepeninckx, V.; Speel, E.-J.; Thunnissen, E.; Smits, K. M.; Boellaard, R.; Vugts, D. J.; Ruysscher, D. D.; Lambin, P. PET Imaging of Zirconium-89 Labelled Cetuximab: A Phase I Trial in Patients with Head and Neck and Lung Cancer. *Radiother. Oncol.* **2017**, *122* (2), 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2016.11.020>.
- (44) Bellaye, P.-S.; Moreau, M.; Raguin, O.; Oudot, A.; Bernhard, C.; Vrigneaud, J.-M.; Dumont, L.; Vandroux, D.; Denat, F.; Cochet, A.; Brunotte, F.; Collin, B. Radiolabeled F(Ab')<sub>2</sub>-Cetuximab for Theranostic Purposes in Colorectal and Skin Tumor-Bearing Mice Models. *Clin. Transl. Oncol.* **2018**, *20* (12), 1557–1570. <https://doi.org/10.1007/s12094-018-1886-4>.
- (45) Dijk, L. K. van; Hoeben, B. A. W.; Kaanders, J. H. A. M.; Franssen, G. M.; Boerman, O. C.; Bussink, J. Imaging of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Head and Neck Cancer with SPECT/CT and 111In-

- Labeled Cetuximab-F(Ab')<sub>2</sub>. *J Nucl Med* **2013**, *54* (12), 2118–2124. <https://doi.org/10.2967/jnumed.113.123612>.
- (46) Turker, N. S.; Heidari, P.; Kucherlapati, R.; Kucherlapati, M.; Mahmood, U. An EGFR Targeted PET Imaging Probe for the Detection of Colonic Adenocarcinomas in the Setting of Colitis. *Theranostics* **2014**, *4* (9), 893–903. <https://doi.org/10.7150/thno.9425>.
- (47) Chakravarty, R.; Goel, S.; Valdovinos, H. F.; Hernandez, R.; Hong, H.; Nickles, R. J.; Cai, W. Matching the Decay Half-Life with the Biological Half-Life: ImmunoPET Imaging with (44)Sc-Labeled Cetuximab Fab Fragment. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (12), 2197–2204. <https://doi.org/10.1021/bc500415x>.
- (48) Xu, N.; Cai, G.; Ye, W.; Wang, X.; Li, Y.; Zhao, P.; Zhang, A.; Zhang, R.; Cao, B. Molecular Imaging Application of Radioiodinated Anti-EGFR Human Fab to EGFR-Overexpressing Tumor Xenografts. *Anticancer Res.* **2009**, *29* (10), 4005–4011.
- (49) Vosjan, M. J. W. D.; Vercaamen, J.; Kolkman, J. A.; Stigter-van Walsum, M.; Revets, H.; van Dongen, G. A. M. S. Nanobodies Targeting the Hepatocyte Growth Factor: Potential New Drugs for Molecular Cancer Therapy. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11* (4), 1017–1025. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0891>.
- (50) Huang, L.; Gainkam, L. O. T.; Caveliers, V.; Vanhove, C.; Keyaerts, M.; De Baetselier, P.; Bossuyt, A.; Revets, H.; Lahoutte, T. SPECT Imaging with 99mTc-Labeled EGFR-Specific Nanobody for In Vivo Monitoring of EGFR Expression. *Mol. Imaging Biol.* **2008**, *10* (3), 167–175. <https://doi.org/10.1007/s11307-008-0133-8>.
- (51) Gainkam, L. O. T.; Huang, L.; Caveliers, V.; Keyaerts, M.; Hernot, S.; Vaneycken, I.; Vanhove, C.; Revets, H.; De Baetselier, P.; Lahoutte, T. Comparison of the Biodistribution and Tumor Targeting of Two 99mTc-Labeled Anti-EGFR Nanobodies in Mice, Using Pinhole SPECT/Micro-CT. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49* (5), 788–795. <https://doi.org/10.2967/jnumed.107.048538>.
- (52) Miao, Z.; Ren, G.; Liu, H.; Qi, S.; Wu, S.; Cheng, Z. PET of EGFR Expression with an 18F-Labeled Affibody Molecule. *J. Nucl. Med.* **2012**, *53* (7), 1110–1118. <https://doi.org/10.2967/jnumed.111.100842>.
- (53) Miao, Z.; Ren, G.; Liu, H.; Jiang, L.; Cheng, Z. Small-Animal PET Imaging of Human Epidermal Growth Factor Receptor Positive Tumor with a 64Cu Labeled Affibody Protein. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21* (5), 947–954. <https://doi.org/10.1021/bc900515p>.
- (54) Andersson, K. G.; Oroujeni, M.; Garousi, J.; Mitran, B.; Ståhl, S.; Orlova, A.; Löfblom, J.; Tolmachev, V. Feasibility of Imaging of Epidermal Growth Factor Receptor Expression with ZEGFR:2377 Affibody Molecule Labeled with 99mTc Using a Peptide-Based Cysteine-Containing Chelator. *Int. J. Oncol.* **2016**, *49* (6), 2285–2293. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3721>.
- (55) Oroujeni, M.; Garousi, J.; Andersson, K. G.; Löfblom, J.; Mitran, B.; Orlova, A.; Tolmachev, V. Preclinical Evaluation of [68Ga]Ga-DFO-ZEGFR:2377: A Promising Affibody-Based Probe for Noninvasive PET Imaging of EGFR Expression in Tumors. *Cells* **2018**, *7* (9). <https://doi.org/10.3390/cells7090141>.
- (56) Burley, T. A.; Da Pieve, C.; Martins, C. D.; Ciobota, D. M.; Allott, L.; Oyen, W. J. G.; Harrington, K. J.; Smith, G.; Kramer-Marek, G. Affibody-Based PET Imaging to Guide EGFR-Targeted Cancer Therapy in Head and Neck Squamous Cell Cancer Models. *J. Nucl. Med.* **2019**, *60* (3), 353–361. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.216069>.
- (57) Nordberg, E.; Orlova, A.; Friedman, M.; Tolmachev, V.; Ståhl, S.; Nilsson, F. Y.; Glimelius, B.; Carlsson, J. In Vivo and in Vitro Uptake of 111In, Delivered with the Affibody Molecule (ZEGFR:955)<sub>2</sub>, in EGFR Expressing Tumour Cells. *Oncol. Rep.* **2008**, *19* (4), 853–857. <https://doi.org/10.3892/or.19.4.853>.
- (58) Song, Y.; Xiao, Z.; Wang, K.; Wang, X.; Zhang, C.; Fang, F.; Sun, X.; Shen, B. Development and Evaluation of 18F-IRS for Molecular Imaging Mutant EGF Receptors in NSCLC. *Sci. Rep.* **2017**, *7*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01443-7>.
- (59) Dai, D.; Li, X.-F.; Wang, J.; Liu, J.-J.; Zhu, Y.-J.; Zhang, Y.; Wang, Q.; Xu, W.-G. Predictive Efficacy of 11C-PD153035 PET Imaging for EGFR–Tyrosine Kinase Inhibitor Sensitivity in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Int. J. Cancer* **2016**, *138* (4), 1003–1012. <https://doi.org/10.1002/ijc.29832>.
- (60) Xiao, Z.; Song, Y.; Kai, W.; Sun, X.; Shen, B. Evaluation of 99mTc-HYNIC-MPG as a Novel SPECT Radiotracer to Detect EGFR-Activating Mutations in NSCLC. *Oncotarget* **2017**, *8* (25), 40732–40740. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17251>.
- (61) Sun, X.; Xiao, Z.; Chen, G.; Han, Z.; Liu, Y.; Zhang, C.; Sun, Y.; Song, Y.; Wang, K.; Fang, F.; Wang, X.; Lin,

- Y.; Xu, L.; Shao, L.; Li, J.; Cheng, Z.; Gambhir, S. S.; Shen, B. A PET Imaging Approach for Determining EGFR Mutation Status for Improved Lung Cancer Patient Management. *Sci. Transl. Med.* **2018**, *10* (431). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan8840>.
- (62) Koniev, O.; Wagner, A. Developments and Recent Advancements in the Field of Endogenous Amino Acid Selective Bond Forming Reactions for Bioconjugation. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (15), 5495–5551. <https://doi.org/10.1039/C5CS00048C>.
- (63) Agarwal, P.; Bertozzi, C. R. Site-Specific Antibody–Drug Conjugates: The Nexus of Bioorthogonal Chemistry, Protein Engineering, and Drug Development. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26* (2), 176–192. <https://doi.org/10.1021/bc5004982>.
- (64) Strop, P.; Liu, S.-H.; Dorywalska, M.; Delaria, K.; Dushin, R. G.; Tran, T.-T.; Ho, W.-H.; Farias, S.; Casas, M. G.; Abdiche, Y.; Zhou, D.; Chandrasekaran, R.; Samain, C.; Loo, C.; Rossi, A.; Rickert, M.; Krimm, S.; Wong, T.; Chin, S. M.; Yu, J.; Dilley, J.; Chaparro-Riggers, J.; Filzen, G. F.; O'Donnell, C. J.; Wang, F.; Myers, J. S.; Pons, J.; Shelton, D. L.; Rajpal, A. Location Matters: Site of Conjugation Modulates Stability and Pharmacokinetics of Antibody Drug Conjugates. *Chem. Biol.* **2013**, *20* (2), 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.01.010>.
- (65) Pillow, T. H.; Tien, J.; Parsons-Reponte, K. L.; Bhakta, S.; Li, H.; Staben, L. R.; Li, G.; Chuh, J.; Fourie-O'Donohue, A.; Darwish, M.; Yip, V.; Liu, L.; Leipold, D. D.; Su, D.; Wu, E.; Spencer, S. D.; Shen, B.-Q.; Xu, K.; Kozak, K. R.; Raab, H.; Vandlen, R.; Lewis Phillips, G. D.; Scheller, R. H.; Polakis, P.; Sliwkowski, M. X.; Flygare, J. A.; Junutula, J. R. Site-Specific Trastuzumab Maytansinoid Antibody-Drug Conjugates with Improved Therapeutic Activity through Linker and Antibody Engineering. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (19), 7890–7899. <https://doi.org/10.1021/jm500552c>.
- (66) Tavaré, R.; Wu, W. H.; Zettlitz, K. A.; Salazar, F. B.; McCabe, K. E.; Marks, J. D.; Wu, A. M. Enhanced ImmunoPET of ALCAM-Positive Colorectal Carcinoma Using Site-Specific <sup>64</sup>Cu-DOTA Conjugation. *Protein Eng. Des. Sel.* **2014**, *27* (10), 317–324. <https://doi.org/10.1093/protein/gzu030>.
- (67) Adumeau, P.; Sharma, S. K.; Brent, C.; Zeglis, B. M. Site-Specifically Labeled Immunoconjugates for Molecular Imaging--Part 1: Cysteine Residues and Glycans. *Mol. Imaging Biol.* **2016**, *18* (1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s11307-015-0919-4>.
- (68) Adumeau, P.; Sharma, S. K.; Brent, C.; Zeglis, B. M. Site-Specifically Labeled Immunoconjugates for Molecular Imaging--Part 2: Peptide Tags and Unnatural Amino Acids. *Mol. Imaging Biol.* **2016**, *18* (2), 153–165. <https://doi.org/10.1007/s11307-015-0920-y>.
- (69) Hu, Q.-Y.; Berti, F.; Adamo, R. Towards the next Generation of Biomedicines by Site-Selective Conjugation. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (6), 1691–1719. <https://doi.org/10.1039/c4cs00388h>.
- (70) Rosen, C. B.; Francis, M. B. Targeting the N Terminus for Site-Selective Protein Modification. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13* (7), 697–705. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2416>.
- (71) Lang, K.; Chin, J. W. Cellular Incorporation of Unnatural Amino Acids and Bioorthogonal Labeling of Proteins. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (9), 4764–4806. <https://doi.org/10.1021/cr400355w>.
- (72) Wang, L.; Schultz, P. G. Expanding the Genetic Code. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *44* (1), 34–66. <https://doi.org/10.1002/anie.200460627>.
- (73) Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. Chemistry in Living Systems. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1* (1), 13–21. <https://doi.org/10.1038/nchembio0605-13>.
- (74) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40* (11), 2004–2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::aid-anie2004>3.3.co;2-x](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::aid-anie2004>3.3.co;2-x).
- (75) Qin, L.-H.; Hu, W.; Long, Y.-Q. Bioorthogonal Chemistry: Optimization and Application Updates during 2013–2017. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59* (23), 2214–2228. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.04.058>.
- (76) Oliveira, B. L.; Guo, Z.; Bernardes, G. J. L. Inverse Electron Demand Diels–Alder Reactions in Chemical Biology. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (16), 4895–4950. <https://doi.org/10.1039/C7CS00184C>.
- (77) van Berkel, S. S.; van Eldijk, M. B.; van Hest, J. C. M. Staudinger Ligation as a Method for Bioconjugation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (38), 8806–8827. <https://doi.org/10.1002/anie.201008102>.
- (78) Crisalli, P.; Kool, E. T. Water-Soluble Organocatalysts for Hydrazone and Oxime Formation. *J. Org. Chem.*



**2013**, 78 (3), 1184–1189. <https://doi.org/10.1021/jo302746p>.

(79) Pickens, C. J.; Johnson, S. N.; Pressnall, M. M.; Leon, M. A.; Berkland, C. J. Practical Considerations, Challenges, and Limitations of Bioconjugation via Azide–Alkyne Cycloaddition. *Bioconjugate Chem.* **2018**, 29 (3), 686–701. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00633>.

(80) Presolski, S. I.; Hong, V.; Cho, S.-H.; Finn, M. G. Tailored Ligand Acceleration of the Cu-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition Reaction: Practical and Mechanistic Implications. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (41), 14570–14576. <https://doi.org/10.1021/ja105743g>.

(81) Dommerholt, J.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L. Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloaddition of Cycloalkynes and Organic Azides. *Top. Curr. Chem. (Z)* **2016**, 374 (2), 16. <https://doi.org/10.1007/s41061-016-0016-4>.

(82) MacKenzie, D. A.; Sherratt, A. R.; Chigrinova, M.; Cheung, L. L.; Pezacki, J. P. Strain-Promoted Cycloadditions Involving Nitrones and Alkynes—Rapid Tunable Reactions for Bioorthogonal Labeling. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 21, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.05.023>.

(83) Lin, Y. A.; Boutureira, O.; Lercher, L.; Bhushan, B.; Paton, R. S.; Davis, B. G. Rapid Cross-Metathesis for Reversible Protein Modifications via Chemical Access to Se-Allyl-Selenocysteine in Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (33), 12156–12159. <https://doi.org/10.1021/ja403191g>.

(84) Yu, Z.; Pan, Y.; Wang, Z.; Wang, J.; Lin, Q. Genetically Encoded Cyclopropene Directs Rapid, Photoclick-Chemistry-Mediated Protein Labeling in Mammalian Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51 (42), 10600–10604. <https://doi.org/10.1002/anie.201205352>.

(85) Png, Z. M.; Zeng, H.; Ye, Q.; Xu, J. Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reactions: Principles and Applications. *Chem. Asian J.* **2017**, 12 (17), 2142–2159. <https://doi.org/10.1002/asia.201700442>.

(86) Mayer, S.; Lang, K. Tetrazines in Inverse-Electron-Demand Diels–Alder Cycloadditions and Their Use in Biology. *Synthesis* **2017**, 49 (4), 830–848. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1588682>.

(87) Darko, A.; Wallace, S.; Dmitrenko, O.; Machovina, M. M.; Mehl, R. A.; Chin, J. W.; Fox, J. M. Conformationally Strained Trans-Cyclooctene with Improved Stability and Excellent Reactivity in Tetrazine Ligation. *Chem. Sci.* **2014**, 5 (10), 3770–3776. <https://doi.org/10.1039/C4SC01348D>.

(88) Altai, M.; Membreno, R.; Cook, B.; Tolmachev, V.; Zeglis, B. M. Pretargeted Imaging and Therapy. *J. Nucl. Med.* **2017**, 58 (10), 1553–1559. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.189944>.

(89) Keinänen, O.; Brennan, J. M.; Membreno, R.; Fung, K.; Gangangari, K.; Dayts, E. J.; Williams, C. J.; Zeglis, B. M. Dual Radionuclide Theranostic Pretargeting. *Mol. Pharm.* **2019**, 16 (10), 4416–4421. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00746>.

(90) Wei, W.; Rosenkrans, Z. T.; Liu, J.; Huang, G.; Luo, Q.-Y.; Cai, W. ImmunoPET: Concept, Design, and Applications. *Chem. Rev.* **2020**, 120 (8), 3787–3851. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00738>.

(91) Maruani, A.; Richards, D. A.; Chudasama, V. Dual Modification of Biomolecules. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14 (26), 6165–6178. <https://doi.org/10.1039/C6OB01010E>.

(92) Yamaguchi, A.; Matsuda, T.; Ohtake, K.; Yanagisawa, T.; Yokoyama, S.; Fujiwara, Y.; Watanabe, T.; Hohsaka, T.; Sakamoto, K. Incorporation of a Doubly Functionalized Synthetic Amino Acid into Proteins for Creating Chemical and Light-Induced Conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2016**, 27 (1), 198–206. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00602>.

(93) Ahn, S. H.; Thach, D.; Vaughn, B. A.; Alford, V. M.; Preston, A. N.; Laughlin, S. T.; Boros, E. Linear Desferrichrome-Linked Silicon–Rhodamine Antibody Conjugate Enables Targeted Multimodal Imaging of HER2 in Vitro and in Vivo. *Mol. Pharmaceutics* **2019**, 16 (3), 1412–1420. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01278>.

(94) Sun, L.; Ding, J.; Xing, W.; Gai, Y.; Sheng, J.; Zeng, D. Novel Strategy for Preparing Dual-Modality Optical/PET Imaging Probes via Photo-Click Chemistry. *Bioconjugate Chem.* **2016**, 27 (5), 1200–1204. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00115>.

(95) Maindron, N.; Ipuy, M.; Bernhard, C.; Lhenry, D.; Moreau, M.; Carme, S.; Oudot, A.; Collin, B.; Vrigneaud, J.-M.; Provent, P.; Brunotte, F.; Denat, F.; Goze, C. Near-Infrared-Emitting BODIPY-TrisDOTA111In as a Monomolecular Multifunctional Imaging Probe: From Synthesis to In Vivo Investigations. *Chem. Eur. J.* **2016**, 22

- (36), 12670–12674. <https://doi.org/10.1002/chem.201602886>.
- (96) Meimetis, L. G.; Boros, E.; Carlson, J. C.; Ran, C.; Caravan, P.; Weissleder, R. Bioorthogonal Fluorophore Linked DFO—Technology Enabling Facile Chelator Quantification and Multimodal Imaging of Antibodies. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (1), 257–263. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00630>.
- (97) Beal, D. M.; Jones, L. H. Molecular Scaffolds Using Multiple Orthogonal Conjugations: Applications in Chemical Biology and Drug Discovery. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (26), 6320–6326. <https://doi.org/10.1002/anie.201200002>.
- (98) Stewart, J. A.; Pilgian, B. F.; Rundell, S. R.; Swarts, B. M. A Trifunctional Cyclooctyne for Modifying Azide-Labeled Biomolecules with Photocrosslinking and Affinity Tags. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (99), 17600–17603. <https://doi.org/10.1039/C5CC07536J>.
- (99) Beal, D. M.; Albrow, V. E.; Burslem, G.; Hitchen, L.; Fernandes, C.; Laphorn, C.; Roberts, L. R.; Selby, M. D.; Jones, L. H. Click-Enabled Heterotrifunctional Template for Sequential Bioconjugations. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (3), 548–554. <https://doi.org/10.1039/C1OB06398G>.
- (100) Valverde, I. E.; Delmas, A. F.; Aucagne, V. Click à La Carte: Robust Semi-Orthogonal Alkyne Protecting Groups for Multiple Successive Azide/Alkyne Cycloadditions. *Tetrahedron* **2009**, *65* (36), 7597–7602. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.06.093>.
- (101) Levengood, M. R.; Zhang, X.; Hunter, J. H.; Emmerton, K. K.; Miyamoto, J. B.; Lewis, T. S.; Senter, P. D. Orthogonal Cysteine Protection Enables Homogeneous Multi-Drug Antibody–Drug Conjugates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (3), 733–737. <https://doi.org/10.1002/anie.201608292>.
- (102) Galibert, M.; Renaudet, O.; Dumy, P.; Boturyn, D. Access to Biomolecular Assemblies through One-Pot Triple Orthogonal Chemoselective Ligations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (8), 1901–1904. <https://doi.org/10.1002/anie.201006867>.
- (103) Clavé, G.; Volland, H.; Flaender, M.; Gasparutto, D.; Romieu, A.; Renard, P.-Y. A Universal and Ready-to-Use Heterotrifunctional Cross-Linking Reagent for Facile Synthetic Access to Sophisticated Bioconjugates. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (19), 4329–4345. <https://doi.org/10.1039/C0OB00133C>.
- (104) Viault, G.; Dautrey, S.; Maindron, N.; Hardouin, J.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. The First “Ready-to-Use” Benzene-Based Heterotrifunctional Cross-Linker for Multiple Bioconjugation. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (16), 2693–2705. <https://doi.org/10.1039/C3OB40086G>.
- (105) Rashidian, M.; Kumarapperuma, S. C.; Gabrielse, K.; Fegan, A.; Wagner, C. R.; Distefano, M. D. Simultaneous Dual Protein Labeling Using a Triorthogonal Reagent. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (44), 16388–16396. <https://doi.org/10.1021/ja403813b>.
- (106) Smith, M. E. B.; Schumacher, F. F.; Ryan, C. P.; Tedaldi, L. M.; Papaioannou, D.; Waksman, G.; Caddick, S.; Baker, J. R. Protein Modification, Bioconjugation, and Disulfide Bridging Using Bromomaleimides. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (6), 1960–1965. <https://doi.org/10.1021/ja908610s>.
- (107) Schumacher, F. F.; Nobles, M.; Ryan, C. P.; Smith, M. E. B.; Tinker, A.; Caddick, S.; Baker, J. R. In Situ Maleimide Bridging of Disulfides and a New Approach to Protein PEGylation. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (2), 132–136. <https://doi.org/10.1021/bc1004685>.
- (108) Lee, M. T. W.; Maruani, A.; Chudasama, V. The Use of 3,6-Pyridazinediones in Organic Synthesis and Chemical Biology. *J. Chem. Res.* **2016**, *40* (1), 1–9. <https://doi.org/10.3184/174751916X14495034614855>.
- (109) Lee, M. T. W.; Maruani, A.; Richards, D. A.; Baker, J. R.; Caddick, S.; Chudasama, V. Enabling the Controlled Assembly of Antibody Conjugates with a Loading of Two Modules without Antibody Engineering. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (3), 2056–2060. <https://doi.org/10.1039/C6SC03655D>.
- (110) Maruani, A.; Smith, M. E. B.; Miranda, E.; Chester, K. A.; Chudasama, V.; Caddick, S. A Plug-and-Play Approach to Antibody-Based Therapeutics via a Chemoselective Dual Click Strategy. *Nat. Comm.* **2015**, *6*, 6645. <https://doi.org/10.1038/ncomms7645>.
- (111) Canovas, C.; Moreau, M.; Bernhard, C.; Oudot, A.; Guillemin, M.; Denat, F.; Goncalves, V. Site-Specific Dual Labeling of Proteins on Cysteine Residues with Chlorotetrazines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57* (33), 10646–10650. <https://doi.org/10.1002/anie.201806053>.
- (112) Canovas, C.; Moreau, M.; Vrigneaud, J.-M.; Bellaye, P.-S.; Collin, B.; Denat, F.; Goncalves, V. Modular

Assembly of Multimodal Imaging Agents through an Inverse Electron Demand Diels–Alder Reaction. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30* (3), 888–897. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00017>.

(113) Renault, K.; Guillou, C.; Renard, P.-Y.; Sabot, C. Investigation of Tetrazine Reactivity towards C-Nucleophiles: Pyrazolone-Based Modification of Biomolecules. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17* (2), 388–396. <https://doi.org/10.1039/C8OB02108B>.

(114) Gaikwad, H.; Wang, G.; Smith, W. J.; Alexander, K. L.; D'Alessandro, A.; Zhang, W.; Purev, E.; Simberg, D. Clickable Methyltetrazine-Indocarbocyanine Lipids: A Multicolor Tool Kit for Efficient Modifications of Cell Membranes. *Bioconjugate Chem.* **2019**. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00202>.

(115) Wu, M.; Wu, X.; Wang, Y.; Gu, L.; You, J.; Wu, H.; Feng, P. Alkoxy Tetrazine Substitution at a Boron Center: A Strategy for Synthesizing Highly Fluorogenic Hydrophilic Probes. *ChemBioChem* **2018**, *19* (6), 530–534. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700556>.

(116) Sun, Y.; Ma, X.; Cheng, K.; Wu, B.; Duan, J.; Chen, H.; Bu, L.; Zhang, R.; Hu, X.; Deng, Z.; Xing, L.; Hong, X.; Cheng, Z. Strained Cyclooctyne as a Molecular Platform for Construction of Multimodal Imaging Probes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (20), 5981–5984. <https://doi.org/10.1002/anie.201500941>.

(117) Yoshida, S.; Kuribara, T.; Ito, H.; Meguro, T.; Nishiyama, Y.; Karaki, F.; Hatakeyama, Y.; Koike, Y.; Kii, I.; Hosoya, T. A Facile Preparation of Functional Cycloalkynes *via* an Azide-to-Cycloalkyne Switching Approach. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (24), 3556–3559. <https://doi.org/10.1039/C9CC01113G>.

(118) Knall, A.-C.; Hollauf, M.; Saf, R.; Slugovc, C. A Trifunctional Linker Suitable for Conducting Three Orthogonal Click Chemistries in One Pot. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (45), 10576–10580. <https://doi.org/10.1039/C6OB02182D>.

(119) Montes, E. G. de; Jiménez-Moreno, E.; Oliveira, B. L.; Navo, C. D.; Cal, P. M. S. D.; Jiménez-Osés, G.; Robina, I.; Moreno-Vargas, A. J.; Bernardes, G. J. L. Azabicyclic Vinyl Sulfones for Residue-Specific Dual Protein Labelling. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (16), 4515–4522. <https://doi.org/10.1039/C9SC00125E>.

(120) Bhattacharyya, S.; Dixit, M. Metallic Radionuclides in the Development of Diagnostic and Therapeutic Radiopharmaceuticals. *Dalton Trans.* **2011**, *40* (23), 6112–6128. <https://doi.org/10.1039/C1DT10379B>.

(121) Synowiecki, M. A.; Perk, L. R.; Nijssen, J. F. W. Production of Novel Diagnostic Radionuclides in Small Medical Cyclotrons. *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2018**, *3*. <https://doi.org/10.1186/s41181-018-0038-z>.

(122) Price, E. W.; Orvig, C. Matching Chelators to Radiometals for Radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (1), 260–290. <https://doi.org/10.1039/C3CS60304K>.

(123) Kobayashi, H.; Choyke, P. L. Near-Infrared Photoimmunotherapy of Cancer. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52* (8), 2332–2339. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00273>.

(124) van Straten, D.; Mashayekhi, V.; de Bruijn, H. S.; Oliveira, S.; Robinson, D. J. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers* **2017**, *9* (2), 19. <https://doi.org/10.3390/cancers9020019>.

(125) Debele, T. A.; Peng, S.; Tsai, H.-C. Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16* (9), 22094–22136. <https://doi.org/10.3390/ijms160922094>.

(126) Tian, J.; Ding, L.; Ju, H.; Yang, Y.; Li, X.; Shen, Z.; Zhu, Z.; Yu, J.-S.; Yang, C. J. A Multifunctional Nanomicelle for Real-Time Targeted Imaging and Precise near-Infrared Cancer Therapy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53* (36), 9544–9549. <https://doi.org/10.1002/anie.201405490>.

(127) Ding, H.; Sumer, B. D.; Kessinger, C. W.; Dong, Y.; Huang, G.; Boothman, D. A.; Gao, J. Nanoscopic Micelle Delivery Improves the Photophysical Properties and Efficacy of Photodynamic Therapy of Protoporphyrin IX. *J. Control. Release* **2011**, *151* (3), 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.01.004>.

(128) Kameyama, N.; Matsuda, S.; Itano, O.; Ito, A.; Konno, T.; Arai, T.; Ishihara, K.; Ueda, M.; Kitagawa, Y. Photodynamic Therapy Using an Anti-EGF Receptor Antibody Complexed with Verteporfin Nanoparticles: A Proof of Concept Study. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2011**, *26* (6), 697–704. <https://doi.org/10.1089/cbr.2011.1027>.

(129) Mitsunaga, M.; Ogawa, M.; Kosaka, N.; Rosenblum, L. T.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. Cancer Cell-Selective *In Vivo* near Infrared Photoimmunotherapy Targeting Specific Membrane Molecules. *Nat. Med.* **2011**, *17* (12), 1685–1691. <https://doi.org/10.1038/nm.2554>.

(130) Nakajima, T.; Sano, K.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. Improving the Efficacy of Photoimmunotherapy (PIT)

Using a Cocktail of Antibody Conjugates in a Multiple Antigen Tumor Model. *Theranostics* **2013**, 3 (6), 357–365. <https://doi.org/10.7150/thno.5908>.

(131) Heukers, R.; van Bergen en Henegouwen, P. M. P.; Oliveira, S. Nanobody-Photosensitizer Conjugates for Targeted Photodynamic Therapy. *Nanomedicine* **2014**, 10 (7), 1441–1451. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.12.007>.

(132) Mehraban, N.; Freeman, H. S. Developments in PDT Sensitizers for Increased Selectivity and Singlet Oxygen Production. *Materials* **2015**, 8 (7), 4421–4456. <https://doi.org/10.3390/ma8074421>.

(133) Sato, K.; Ando, K.; Okuyama, S.; Moriguchi, S.; Ogura, T.; Totoki, S.; Hanaoka, H.; Nagaya, T.; Kokawa, R.; Takakura, H.; Nishimura, M.; Hasegawa, Y.; Choyke, P. L.; Ogawa, M.; Kobayashi, H. Photoinduced Ligand Release from a Silicon Phthalocyanine Dye Conjugated with Monoclonal Antibodies: A Mechanism of Cancer Cell Cytotoxicity after Near-Infrared Photoimmunotherapy. *ACS Cent. Sci.* **2018**, 4 (11), 1559–1569. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00565>.

(134) Peng, X.; Draney, D. R.; Volcheck, W. M.; Bashford, G. R.; Lamb, D. T.; Grone, D. L.; Zhang, Y.; Johnson, C. M. Phthalocyanine Dye as an Extremely Photostable and Highly Fluorescent Near-Infrared Labeling Reagent. **2006**, 60970E.

(135) de Boer, E.; Samuel, S.; French, D. N.; Warram, J. M.; Schoeb, T. R.; Rosenthal, E. L.; Zinn, K. R. Biodistribution Study of Intravenously Injected Cetuximab-IRDye700DX in Cynomolgus Macaques. *Mol. Imaging Biol.* **2016**, 18 (2), 232–242. <https://doi.org/10.1007/s11307-015-0892-y>.

(136) Rakuten Medical, Inc. *A Phase 1/2a Multicenter, Open-Label, Dose-Escalation, Combination Study of RM-1929 and Photoimmunotherapy in Patients With Recurrent Head and Neck Cancer, Who in the Opinion of Their Physician, Cannot Be Satisfactorily Treated With Surgery, Radiation or Platinum Chemotherapy*; Clinical trial registration NCT02422979; clinicaltrials.gov, 2020.

(137) Rakuten Medical, Inc. *Phase 3 Randomized, Double-Arm, Open-Label, Controlled Trial of ASP-1929 Photoimmunotherapy Versus Standard of Care for Locoregional Recurrent Head/Neck Squamous Cell Carcinoma in Patients Who Have Failed After at Least Two Lines of Therapy*; Clinical trial registration NCT03769506; clinicaltrials.gov, 2020.

(138) Harmsen, M. M.; De Haard, H. J. Properties, Production, and Applications of Camelid Single-Domain Antibody Fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 77 (1), 13–22. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1142-2>.

(139) Debie, P.; Lafont, C.; Defrise, M.; Hansen, I.; van Willigen, D. M.; van Leeuwen, F. W. B.; Gijsbers, R.; D'Huyvetter, M.; Devoogdt, N.; Lahoutte, T.; Mollard, P.; Hernot, S. Size and Affinity Kinetics of Nanobodies Influence Targeting and Penetration of Solid Tumours. *J. Control. Release* **2020**, 317, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.11.014>.

(140) Van Audenhove, I.; Gettemans, J. Nanobodies as Versatile Tools to Understand, Diagnose, Visualize and Treat Cancer. *EBioMedicine* **2016**, 8, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.04.028>.

(141) Kijanka, M. M.; van Brussel, A. S. A.; van der Wall, E.; Mali, W. P. T. M.; van Diest, P. J.; van Bergen En Henegouwen, P. M. P.; Oliveira, S. Optical Imaging of Pre-Invasive Breast Cancer with a Combination of VHHs Targeting CAIX and HER2 Increases Contrast and Facilitates Tumour Characterization. *EJNMMI Res.* **2016**, 6 (1), 14. <https://doi.org/10.1186/s13550-016-0166-y>.

(142) Roovers, R. C.; Laeremans, T.; Huang, L.; De Taeye, S.; Verkleij, A. J.; Revets, H.; de Haard, H. J.; van Bergen en Henegouwen, P. M. P. Efficient Inhibition of EGFR Signaling and of Tumour Growth by Antagonistic Anti-EFGR Nanobodies. *Cancer Immunol. Immunother.* **2007**, 56 (3), 303–317. <https://doi.org/10.1007/s00262-006-0180-4>.

(143) Kazemi-Lomedasht, F.; Behdani, M.; Bagheri, K. P.; Habibi-Anbouhi, M.; Abolhassani, M.; Arezumand, R.; Shahbazzadeh, D.; Mirzahoseini, H. Inhibition of Angiogenesis in Human Endothelial Cell Using VEGF Specific Nanobody. *Mol. Immunol.* **2015**, 65 (1), 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.01.010>.

(144) Ebrahimizadeh, W.; Mousavi Gargari, S. L. M.; Javidan, Z.; Rajabibazl, M. Production of Novel VHH Nanobody Inhibiting Angiogenesis by Targeting Binding Site of VEGF. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2015**, 176 (7), 1985–1995. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1695-y>.



- (145) Xavier, C.; Blykers, A.; Vaneycken, I.; D'Huyvetter, M.; Heemskerk, J.; Lahoutte, T.; Devoogdt, N.; Caveliers, V. (18)F-Nanobody for PET Imaging of HER2 Overexpressing Tumors. *Nucl. Med. Biol.* **2016**, *43* (4), 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2016.01.002>.
- (146) Keyaerts, M.; Xavier, C.; Heemskerk, J.; Devoogdt, N.; Everaert, H.; Ackaert, C.; Vanhoeij, M.; Duhoux, F. P.; Gevaert, T.; Simon, P.; Schallier, D.; Fontaine, C.; Vaneycken, I.; Vanhove, C.; De Greve, J.; Lamote, J.; Caveliers, V.; Lahoutte, T. Phase I Study of 68Ga-HER2-Nanobody for PET/CT Assessment of HER2 Expression in Breast Carcinoma. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57* (1), 27–33. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.162024>.
- (147) Schmitz, K. R.; Bagchi, A.; Roovers, R. C.; van Bergen en Henegouwen, P. M. P.; Ferguson, K. M. Structural Evaluation of EGFR Inhibition Mechanisms for Nanobodies/VHH Domains. *Structure* **2013**, *21* (7), 1214–1224. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.05.008>.
- (148) Vosjan, M. J. W. D.; Perk, L. R.; Roovers, R. C.; Visser, G. W. M.; Stigter-van Walsum, M.; van Bergen en Henegouwen, P. M. P.; van Dongen, G. A. M. S. Facile Labelling of an Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Nanobody with 68Ga via a Novel Bifunctional Desferal Chelate for Immuno-PET. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, *38* (4), 753–763. <https://doi.org/10.1007/s00259-010-1700-1>.
- (149) Oliveira, S.; van Dongen, G. A. M. S.; Walsum, M. S.; Roovers, R. C.; Stam, J. C.; Mali, W.; van Diest, P. J.; van Bergen en Henegouwen, P. M. P. Rapid Visualization of Human Tumor Xenografts through Optical Imaging with a Near-Infrared Fluorescent Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Nanobody. *Mol. Imaging* **2012**, *11* (1), 7290.2011.00025. <https://doi.org/10.2310/7290.2011.00025>.
- (150) van Driel, P. B. A. A.; Boonstra, M. C.; Slooter, M. D.; Heukers, R.; Stammes, M. A.; Snoeks, T. J. A.; de Bruijn, H. S.; van Diest, P. J.; Vahrmeijer, A. L.; van Bergen en Henegouwen, P. M. P.; van de Velde, C. J. H.; Löwik, C. W. G. M.; Robinson, D. J.; Oliveira, S. EGFR Targeted Nanobody-Photosensitizer Conjugates for Photodynamic Therapy in a Pre-Clinical Model of Head and Neck Cancer. *J. Control. Release* **2016**, *229*, 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.03.014>.
- (151) Pille, J.; van Lith, S. A. M.; van Hest, J. C. M.; Leenders, W. P. J. Self-Assembling VHH-Elastin-Like Peptides for Photodynamic Nanomedicine. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (4), 1302–1310. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00064>.
- (152) van Lith, S. A. M.; van den Brand, D.; Wallbrecher, R.; Wübbecke, L.; van Duijnhoven, S. M. J.; Mäkinen, P. I.; Hoogstad-van Evert, J. S.; Massuger, L.; Ylä-Herttuala, S.; Brock, R.; Leenders, W. P. J. The Effect of Subcellular Localization on the Efficiency of EGFR-Targeted VHH Photosensitizer Conjugates. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2018**, *124*, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.12.009>.
- (153) van Lith, S. A. M.; van den Brand, D.; Wallbrecher, R.; van Duijnhoven, S. M. J.; Brock, R.; Leenders, W. P. J. A Conjugate of an Anti-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) VHH and a Cell-Penetrating Peptide Drives Receptor Internalization and Blocks EGFR Activation. *ChemBioChem* **2017**, *18* (24), 2390–2394. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700444>.
- (154) Priestestersbach, A.; Kubicek, J.; Schäfer, F.; Block, H.; Maertens, B. Chapter One - Purification of His-Tagged Proteins. In *Methods in Enzymology*; Lorsch, J. R., Ed.; Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part D; Academic Press, 2015; Vol. 559, pp 1–15. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.003>.
- (155) Getz, E. B.; Xiao, M.; Chakrabarty, T.; Cooke, R.; Selvin, P. R. A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2-Carboxyethyl)Phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry. *Anal. Biochem.* **1999**, *273* (1), 73–80. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4203>.
- (156) Burns, J. A.; Butler, J. C.; Moran, J.; Whitesides, G. M. Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-Carboxyethyl)Phosphine. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (8), 2648–2650. <https://doi.org/10.1021/jo00008a014>.
- (157) Hansen, R. E.; Winther, J. R. An Introduction to Methods for Analyzing Thiols and Disulfides: Reactions, Reagents, and Practical Considerations. *Anal. Biochem.* **2009**, *394* (2), 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.07.051>.
- (158) Brouwer, A. M. Standards for Photoluminescence Quantum Yield Measurements in Solution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83* (12), 2213–2228. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-10-09-31>.
- (159) Boer, E. de; Warram, J. M.; Hartmans, E.; Bremer, P. J.; Bijl, B.; Crane, L. M. A.; Nagengast, W. B.; Rosenthal, E. L.; Dam, G. M. van. A Standardized Light-Emitting Diode Device for Photoimmunotherapy. *J. Nucl.*

*Med.* **2014**, *55* (11), 1893–1898. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.142299>.

(160) Tolmachev, V.; Rosik, D.; Wållberg, H.; Sjöberg, A.; Sandström, M.; Hansson, M.; Wennborg, A.; Orlova, A. Imaging of EGFR Expression in Murine Xenografts Using Site-Specifically Labelled Anti-EGFR <sup>111</sup>In-DOTA-ZEGFR:2377 Affibody Molecule: Aspect of the Injected Tracer Amount. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2010**, *37* (3), 613–622. <https://doi.org/10.1007/s00259-009-1283-x>.

(161) Pruszyński, M.; D'Huyvetter, M.; Bruchertseifer, F.; Morgenstern, A.; Lahoutte, T. Evaluation of an Anti-HER2 Nanobody Labeled with <sup>225</sup>Ac for Targeted  $\alpha$ -Particle Therapy of Cancer. *Mol. Pharmaceutics* **2018**, *15* (4), 1457–1466. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00985>.

(162) D'Huyvetter, M.; Vincke, C.; Xavier, C.; Aerts, A.; Impens, N.; Baatout, S.; De Raeve, H.; Muyltermans, S.; Caveliers, V.; Devoogdt, N.; Lahoutte, T. Targeted Radionuclide Therapy with A <sup>177</sup>Lu-Labeled Anti-HER2 Nanobody. *Theranostics* **2014**, *4* (7), 708–720. <https://doi.org/10.7150/thno.8156>.

(163) Xavier, C.; Vaneycken, I.; D'huyvetter, M.; Heemskerk, J.; Keyaerts, M.; Vincke, C.; Devoogdt, N.; Muyltermans, S.; Lahoutte, T.; Caveliers, V. Synthesis, Preclinical Validation, Dosimetry, and Toxicity of <sup>68</sup>Ga-NOTA-Anti-HER2 Nanobodies for IPET Imaging of HER2 Receptor Expression in Cancer. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54* (5), 776–784. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.111021>.

(164) Chatalic, K. L. S.; Veldhoven-Zweistra, J.; Bolkestein, M.; Hoeben, S.; Koning, G. A.; Boerman, O. C.; Jong, M. de; Weerden, W. M. van. A Novel <sup>111</sup>In-Labeled Anti-Prostate-Specific Membrane Antigen Nanobody for Targeted SPECT/CT Imaging of Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56* (7), 1094–1099. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.156729>.

(165) Jin, J.; Hjerrild, K. A.; Silk, S. E.; Brown, R. E.; Labbé, G. M.; Marshall, J. M.; Wright, K. E.; Bezemer, S.; Clemmensen, S. B.; Biswas, S.; Li, Y.; El-Turabi, A.; Douglas, A. D.; Hermans, P.; Detmers, F. J.; de Jongh, W. A.; Higgins, M. K.; Ashfield, R.; Draper, S. J. Accelerating the Clinical Development of Protein-Based Vaccines for Malaria by Efficient Purification Using a Four Amino Acid C-Terminal 'C-Tag.' *Int. J. Parasitol.* **2017**, *47* (7), 435–446. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.12.001>.



---

# CONCLUSION GÉNÉRALE

---



Ces travaux de thèse ont été réalisés dans le but de concevoir et optimiser des agents d'imagerie pour le diagnostic et/ou la thérapie de divers cancers.

Le cancer du pancréas est la quatrième cause de décès par cancer en Europe. Ce cancer a un très mauvais pronostic dû à une présentation clinique tardive, une progression rapide, un effet limité de la chimiothérapie et un taux de rechute élevé après la chirurgie, en raison des difficultés à délimiter avec précision les marges tumorales. Les deux premiers projets de cette thèse avaient pour objectif d'améliorer le diagnostic et/ou l'efficacité de la chirurgie du cancer du pancréas en développant et optimisant des agents d'imagerie ciblant les récepteurs à la neurotensine NTS<sub>1</sub>, surexprimés dans le cancer du pancréas. L'enjeu était d'introduire des sondes d'imagerie volumineuses sur des petits vecteurs tout en conservant les meilleures propriétés pharmacocinétiques possibles.

Dans un premier projet, le développement d'un agent d'imagerie bimodal vectorisé (TEP/Fluorescence) nous a semblé approprié pour le diagnostic et l'assistance à la chirurgie du cancer du pancréas. L'imagerie TEP permettrait une détection efficace des tumeurs et de leurs métastases, tandis que l'imagerie par fluorescence faciliterait l'évaluation des marges tumorales pendant la chirurgie. Afin d'optimiser l'agent d'imagerie bimodal, nous avons choisi de jouer sur l'encombrement stérique et le caractère hydrophile des molécules. Cinq agents bimodaux ont été synthétisés en introduisant sur un peptide de ciblage des NTS<sub>1</sub>, un agent chélatant du gallium-68, le NODAGA, diverses cyanines 5 différant par le nombre de groupements sulfonates et des espaceurs de tailles différentes. L'évaluation de ces agents d'imagerie *in vitro* et *in vivo* sur des souris portant des xénogreffes de tumeurs du pancréas a permis de mettre en évidence des différences de comportement significatives. L'imagerie TEP a permis d'identifier le composé [<sup>68</sup>Ga]Ga-6, contenant quatre groupes sulfonates et un espaceur AEEAc, comme celui présentant le profil pharmacocinétique le plus prometteur. Une accumulation tumorale élevée a pu être observée, ainsi qu'un faible bruit-de-fond, conduisant à de très bons ratios tumeur/organes 1 h après l'injection du composé radiomarqué. L'imagerie optique a conduit aux mêmes observations et a pu être utilisée dans une preuve de concept de chirurgie guidée par la fluorescence. Ces résultats ont fait l'objet d'une première publication : Design of Bimodal Ligands of Neurotensin Receptor 1 for PET Imaging and Fluorescence-Guided Surgery of Pancreatic Cancer, E. Renard, P.A. Dancer, C. Portal, F. Denat, A. Prignon, V. Goncalves, *J. Med. Chem.*, **2020**, 63 (5), 2426-2433.

Une petite molécule antagoniste des récepteurs NTS<sub>1</sub>, nommée [<sup>177</sup>Lu]Lu-IPN01087, est actuellement évaluée dans des essais cliniques de phase I/II pour la radiothérapie ciblée des cancers surexprimant NTS<sub>1</sub>. L'identification d'un compagnon diagnostique faciliterait la sélection des patients éligibles pour cette approche thérapeutique.

Nous avons donc choisi, dans un second projet, de développer un radiotracer TEP antagoniste des NTS<sub>1</sub>. Il nous a semblé intéressant de moduler le caractère hydrophile et la charge de la molécule pour améliorer ses propriétés pharmacocinétiques. Nous avons alors

développé sept composés, basés sur la structure des antagonistes de NTS<sub>1</sub>, portant un ou deux agents chélatants différents. Les composés ont été marqués au gallium-68 puis évalués *in vitro* et *in vivo* sur des souris portant une xénogreffe de cancer colorectal. À nouveau, des différences importantes de biodistribution ont été observées. L'imagerie TEP nous a permis d'identifier le composé « bisNODAGA » [<sup>68</sup>Ga]Ga-**27** comme étant le plus prometteur. Ce radiotracteur a montré une accumulation tumorale élevée et une clairance rapide des tissus sains à 2 h après l'injection, conduisant à des images TEP très contrastées. Ces résultats ont donné lieu à la rédaction d'une seconde publication : PET Imaging of Neurotensin Receptor-Positive Tumors with <sup>68</sup>Ga-Labeled Antagonists : "the Chelate Makes Again the Difference", E. Renard, M. Moreau, P.-S. Bellaye, M. Guillemin, B. Collin, F. Denat, V. Goncalves, soumis au *Journal of Medicinal Chemistry*.

Le troisième projet de cette thèse concerne l'utilisation d'une plateforme trivalente pour la double modification d'un fragment d'anticorps. Les nanobodies (V<sub>H</sub>H) sont des fragments d'anticorps présentant des propriétés pharmacocinétiques favorables pour leur utilisation comme vecteur pour l'imagerie ou la thérapie de cancers. Leur petite taille et leurs propriétés de ciblage permettent une clairance rapide, une pénétration efficace et une distribution homogène dans les tissus, conduisant à de bons ratios tumeur/bruit-de-fond à des temps courts après l'injection. La méthode la plus couramment utilisée pour la modification de biomolécules est la conjugaison aléatoire à des lysines, mais cette approche n'est pas spécifique, peu reproductible, et l'affinité pour le récepteur peut être affectée. Nous avons donc choisi d'introduire une cystéine sur le V<sub>H</sub>H 7D12 (anti-EGFR) pour permettre une bioconjugaison site-spécifique. Une sonde bimodale TEMP/PDT a été synthétisée en utilisant une plateforme dichlorotétrazine sur laquelle un DTPA pour la chélation de l'indium-111 et le photosensibilisateur IRDye700DX ont été introduits. Une réaction de chimie *click* a ensuite été réalisée entre cette sonde bimodale et le V<sub>H</sub>H 7D12 modifié par un BCN-PEG<sub>2</sub>-maléimide. L'évaluation *in vitro* du conjugué a démontré que le conjugué conservait des propriétés spectrales satisfaisantes, malgré une légère diminution du rendement quantique de fluorescence par rapport à l'IRDye700DX, ainsi qu'une légère diminution de la production d'oxygène singulet. En revanche, l'affinité pour EGFR n'a quasiment pas été impactée. Les expériences de PDT *in vitro* ont été convaincantes, l'irradiation des cellules incubées avec [<sup>111</sup>In]In-**50** conduisant à plus de 90% de mort cellulaire. Toutefois, malgré de bons résultats obtenus *in vitro*, l'évaluation du profil de biodistribution *in vivo* a montré une clairance rapide mais peu d'accumulation tumorale. De nouvelles expériences sont en cours pour améliorer le protocole expérimental.

Pour conclure, durant cette thèse, plusieurs stratégies ont été évaluées pour la conception d'agents d'imagerie présentant des propriétés pharmacocinétiques optimales. Parmi elles, la variation de la lipophilie par l'introduction de groupements sulfonates, l'insertion d'espaceur, la modification de la nature de l'agent chélatant sont des techniques montrant un certain potentiel et pouvant être extrapolées à d'autres agents d'imagerie. La stratégie



« bischélateur » semble être une approche montrant un potentiel élevé et il serait donc intéressant de l'étudier sur d'autres radiotraceurs afin d'améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques.

Les différents composés conçus lors de cette thèse présentent une accumulation relativement importante au niveau des reins. Plusieurs approches pourraient alors être évaluées afin de réduire cette accumulation pour limiter les risques de radiotoxicité rénale. Une approche qui ne nécessite pas de modification structurale du composé serait, par exemple, la co-injection d'acides aminés basiques afin de bloquer les récepteurs responsables de la réabsorption tubulaire.

Ensuite, afin de valider les différents composés mis au point durant ces travaux, il serait intéressant de les évaluer sur d'autres modèles de cancers surexprimant les différentes cibles et/ou sur des modèles orthotopiques plus représentatifs de la réalité.

Enfin, l'utilisation de la plateforme dichlorotétrazine est une méthode permettant la double modification site-spécifique de biomolécules, applicable à de nombreux vecteurs de types fragments d'anticorps ou petites protéines (affibodies, DARPins, aptamères). De par sa flexibilité, différentes molécules (agent chélatant, sonde fluorescente, photosensibilisateur, groupement solubilisant, molécule à activité thérapeutique...) pourraient être introduites sur cette plateforme selon l'objectif souhaité.



---

# PARTIE EXPÉRIMENTALE

---



<b>PARTIE EXPÉRIMENTALE</b> .....	<b>- 259 -</b>
<b>I. Materials and Methods</b> .....	<b>- 263 -</b>
<b>II. Chapter 1 – Experimental part</b> .....	<b>- 266 -</b>
<b>II.1. Synthesis and characterization of DOTA-NT-20.3</b> .....	<b>- 266 -</b>
II.1.1. Synthesis of NT-20.3 .....	- 266 -
II.1.2. Synthesis of DOTA-NT-20.3 .....	- 268 -
<b>II.2. Synthesis and characterization of compound 1 to 7</b> .....	<b>- 269 -</b>
II.2.1. Synthesis of compounds <b>1a</b> , <b>1b</b> and <b>1c</b> .....	- 269 -
II.2.2. Synthesis of compounds <b>2a</b> , <b>2b</b> and <b>2c</b> .....	- 269 -
II.2.3. Synthesis of compound <b>3</b> .....	- 273 -
II.2.4. Synthesis of compound <b>4</b> .....	- 274 -
II.2.5. Synthesis of compounds <b>5</b> to <b>7</b> .....	- 276 -
<b>II.3. Spectral properties of compounds 3 to 7</b> .....	<b>- 280 -</b>
<b>II.4. Metalation of DOTA-NT-20.3 and peptides with <sup>nat</sup>Ga</b> .....	<b>- 281 -</b>
<b>II.5. <i>In vitro</i> stability</b> .....	<b>- 287 -</b>
<b>II.6. <i>In vitro</i> binding affinity</b> .....	<b>- 290 -</b>
<b>II.7. Radiolabeling of peptides with <sup>68</sup>Ga</b> .....	<b>- 290 -</b>
<b>II.8. Cell culture and animal models</b> .....	<b>- 290 -</b>
<b>II.9. Small animal PET imaging and biodistribution studies</b> .....	<b>- 291 -</b>
<b>II.10. Near-Infrared Fluorescence Imaging</b> .....	<b>- 292 -</b>
<b>II.11. Fluorescence-Guided Surgery</b> .....	<b>- 293 -</b>
<b>III. Chapter 2 – Experimental part</b> .....	<b>- 294 -</b>
<b>III.1. Synthesis and characterization of compound 8 to 20</b> .....	<b>- 294 -</b>
III.1.1. Synthesis of synthon <b>A</b> .....	- 294 -
III.1.2. Synthesis of synthon <b>B</b> .....	- 300 -
III.1.3. Synthesis of synthon <b>C</b> .....	- 301 -
III.1.4. Synthesis of synthon <b>D</b> .....	- 304 -
III.1.5. Synthesis of compound <b>20</b> .....	- 308 -
<b>III.2. Coupling with the chelating agents</b> .....	<b>- 312 -</b>
III.2.1. Synthesis of compound <b>21 (3BP-228)</b> .....	- 312 -
III.2.2. Synthesis of compound <b>22</b> .....	- 313 -
III.2.3. Synthesis of compound <b>23</b> .....	- 315 -
III.2.4. Synthesis of compound <b>24</b> .....	- 316 -
III.2.5. Synthesis of compound <b>25</b> .....	- 318 -
III.2.6. Synthesis of compound <b>27</b> .....	- 319 -
III.2.7. Synthesis of compound <b>29</b> .....	- 322 -
<b>III.3. Synthesis of compound 3BP-227</b> .....	<b>- 326 -</b>
III.3.1. Synthesis of synthon <b>E</b> .....	- 326 -
III.3.2. Synthesis of 3BP-227.....	- 327 -
<b>III.4. Metalation of peptides with <sup>nat</sup>Ga</b> .....	<b>- 333 -</b>
<b>III.5. <i>In vitro</i> stability</b> .....	<b>- 342 -</b>
<b>III.6. <i>In vitro</i> binding affinity</b> .....	<b>- 347 -</b>
<b>III.7. Radiolabeling of compounds with <sup>68</sup>Ga</b> .....	<b>- 347 -</b>
<b>III.8. Small animal PET imaging and biodistribution studies</b> .....	<b>- 348 -</b>
<b>IV. Chapter 3 – Experimental part</b> .....	<b>- 352 -</b>
<b>IV.1. Production and characterization of 7D12</b> .....	<b>- 352 -</b>
<b>IV.2. Synthesis and characterization</b> .....	<b>- 352 -</b>
IV.1.1. Synthesis of BCN-PEG <sub>2</sub> -maleimide <b>34</b> .....	- 352 -
IV.1.2. Synthesis of disubstituted tetrazine with amine groups <b>37</b> .....	- 354 -

IV.1.3. Synthesis of the bimodal probe <b>49</b> .....	- 356 -
IV.2.4. Synthesis of conjugates <b>35, 39, 40, 42, 43</b> .....	- 361 -
IV.2.5. Synthesis of conjugate DTPA-IRDye700DX-7D12 <b>50</b> .....	- 367 -
<b>IV.3. Spectral properties of compound IRDye700DX derivatives</b> .....	<b>- 367 -</b>
<b>IV.4. Stability of DTPA-IRDye700DX-7D12 in radiolabeling-like conditions</b> .....	<b>- 369 -</b>
<b>IV.5. Radiolabeling of conjugate with <sup>111</sup>In</b> .....	<b>- 369 -</b>
<b>IV.6. Cell culture and animal models</b> .....	<b>- 370 -</b>
<b>IV.7. <i>In vitro</i> binding assay</b> .....	<b>- 370 -</b>
<b>IV.8. <i>In vitro</i> binding and internalization of conjugate</b> .....	<b>- 370 -</b>
<b>IV.9. Singlet oxygen production of conjugate upon illumination</b> .....	<b>- 371 -</b>
<b>IV.10. <i>In vitro</i> photodynamic therapy</b> .....	<b>- 372 -</b>
<b>IV.11. Small animal SPECT imaging and biodistribution studies</b> .....	<b>- 373 -</b>

## I. Materials and Methods

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Acros Organics and Alfa Aesar and used without further purification. Fmoc-protected amino acids and coupling reagents for peptide synthesis were purchased from Iris Biotech. The tetrasulfonated cyanine Cy5\*\* was kindly given by C. Portal (EM Imaging, Edinburgh, United Kingdom). The disulfonated Cy5 and the Cy5 dye were provided by A. Romieu (ICMUB, Dijon, France). (*R*)-NODAGA-NHS, NOTA-NHS, DOTA-NHS, THP-NCS, DOTAGA(tBu)<sub>4</sub>, NODAGA(tBu)<sub>3</sub>, DOTAGA-anhydride and DTPA(tBu)<sub>4</sub> were provided by CheMatech (Dijon, France). IRDye700DX-NHS and BCN-PEG<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> were purchased from LICOR (USA) and SiChem (Germany) respectively. The V<sub>H</sub>H 7D12 was given by S. Van Lith (Netherlands). Moisture sensitive reactions were performed under a nitrogen or argon atmosphere.

HPLC-gradient grade MeCN was obtained from Biosolve or Carlo Erba. LC-HRMS grade MeCN was obtained from Fisher Scientific. All aqueous buffers used in this work and aqueous mobile-phases for HPLC were prepared using water purified to 18.2 MΩ cm with a PURELAB Ultra system from ELGA.

The number of TFA counterions was quantified by ionic chromatography. Chromatographic analysis was performed using an ion chromatograph Thermo Scientific Dionex ICS 5000 with a conductivity detector CD (Thermo Scientific Dionex) and a conductivity suppressor ASRS-ultra II 4 mm (Thermo Scientific Dionex). TFA was separated using an Ion Pac AS11-HC analytical column (4 μm, 4 × 250 mm, Thermo Scientific Dionex) equipped with an Ion Pac AS11-HC guard column (4 μm, 4 × 250 mm, Thermo Scientific Dionex). Chromatographic analysis was recorded with Chromeleon software, 7.2. The elution of TFA was conducted with a 15 min isocratic elution with 90% eluent A (NaOH 30 mM) and 10% eluent B (H<sub>2</sub>O) at a flow rate of 1.5 mL/min and a column temperature of 30 °C.

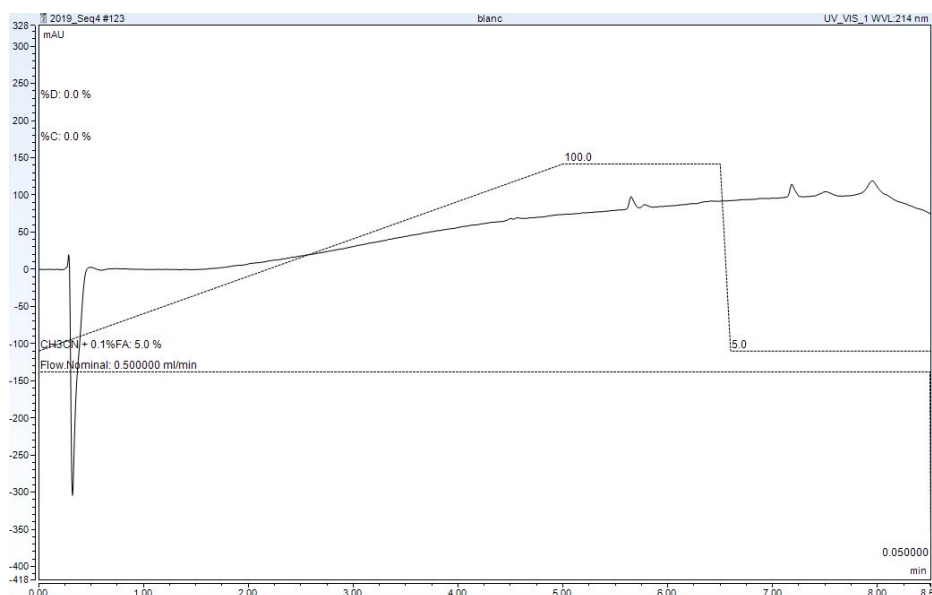
Purifications by semi-preparative HPLC were performed on a Thermo-Dionex Ultimate 3000 instrument (Dionex, semi-preparative pump HPG-3200P) equipped with a DAD detector (Dionex MWD-3000) on one of the following columns: BetaBasic-18 column (Thermo Scientific; 5 μm, 150 Å, 150 × 30 mm) at 20 mL/min or SiliaChrom® dt C<sub>18</sub> column (Silicycle; 10 μm, 100 Å, 250 × 20 mm) at 20 mL/min or Hypersil gold C18 column (Thermo Scientific, 100 Å, 250 × 10 mm) at 3.5 mL/minute, with HPLC grade eluents. The fractions of interest were analyzed by HPLC-MS, pooled, concentrated under reduced pressure to remove organic solvents and freeze-dried.

Purifications by flash chromatography were performed on a Puriflash 430 system (Interchim) with prepacked silica columns (25 μm).

The compounds were characterized by high performance liquid chromatography (HPLC) analyses performed on an UltiMate 3000 system Dionex (Thermo Scientific) equipped with a DAD detector and coupled to a low-resolution mass spectrometry detector MSQ Plus (Thermo Scientific) equipped with an ESI source. Separation was achieved using an RP Kinetex™ column (Phenomenex) (2.6  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 50  $\times$  2.1 mm) with ultrapure water and HPLC-grade MeCN (A: H<sub>2</sub>O 0.1% FA and B: MeCN 0.1% FA). Analyses were performed with the following gradient program: 5% to 100% of B in 5 min, 100% B for 1.5 min, 100% to 5% B in 0.1 min and 5% B for 1.9 min, at a flow rate of 0.5 mL/min.

The purity of the compounds was determined from the integration of HPLC-MS chromatograms at 214 nm.

HPLC-MS chromatogram of H<sub>2</sub>O injection at 214 nm (blank):



The protein 7D12 and related conjugates were characterized by RP-HPLC-HRMS performed on a HPLC UltiMate 3000 system (Thermo Scientific) equipped with a UV-visible detector and coupled to a high-resolution mass spectrometer LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific) equipped with an ESI source. The separation was achieved on a Thermo Scientific™ MAbPac™ column (4  $\mu\text{m}$ , 50  $\times$  21 mm) with the following eluents: A: H<sub>2</sub>O, 0.1% FA + 0.02% TFA and B: MeCN/H<sub>2</sub>O (90 : 10, v/v), 0.1% FA + 0.02% TFA, and a linear gradient program: 5% to 100% of B in 15 min, 100% B for 3 min, 100% to 5% B in 0.1 min and 5% B for 6 min, at a flow rate of 0.3 mL/min, at 80 °C. Multicharged mass spectra were deconvoluted with Protein Deconvolution 2.0 software (Thermo Scientific).

HRMS spectra were recorded on a mass spectrometer LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific) using an ESI source. Spectra were recorded in positive mode.



MALDI-TOF analyses were recorded with a Bruker Daltonics Ultraflex II spectrometer equipped with a Smartbeam (Nd-YAG 355 nm) and a Bruker Daltonics Microflex LRF spectrometer equipped with a N<sub>2</sub> beam (337 nm).

For small molecules, the MALDI-TOF reflectron positive mode (50-3500 Da mass range) was used. Samples were prepared by using a freshly prepared 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) matrix solution and spotted on a MSP 365 MALDI plate. Accurate calibration was achieved by using an appropriate PEG polymer in the same mass range as the analyte. Internal mass calibration is performed by adding the PEG sample on the same spot as the analyte while external reference is performed by preparing an extra spot on the plate analyzed in the same session as the analyte.

For proteins the MALDI-TOF linear positive mode (10-25 kDa mass range) was used. Samples were desalted using C<sub>4</sub> ZipTips, mixed with a freshly prepared 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid matrix solution and spotted on a MSP 365 MALDI plate.

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on Bruker spectrometers: Avance Neo 500 MHz and Avance III HD 600 MHz under routine conditions at 298 K and were referenced to TMS or residual solvent signals. The following abbreviations and their combinations are used: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; m, multiplet.

Concentrations of protein and protein conjugates were determined by measuring the absorbance on a Varian Cary 50 (double beam) spectrophotometer by using a TrayCell (Hellma, pathlength: 0.2 (factor 50) mm or 1.0 (factor 10) mm, chamber volume 0.7-4 μL), at 25 °C.

UV-visible spectra were obtained on an Agilent Cary 50 UV-Vis-Spectrophotometers by using a rectangular quartz cell (Hellma, 100-QS, 45 × 12.5 × 12.5 mm, pathlength: 10 mm, chamber volume: 3.5 mL), at 23 °C. Fluorescence spectroscopic studies were recorded on a JASCO FP8500 spectrofluorometer in a 10 mm path-length semimicro quartz cuvette (Starna), at 25 °C.

Melting points were measured on a melting point apparatus B-545 with an accuracy of ± 0.3 °C.

## II. Chapter 1 – Experimental part

### II.1. Synthesis and characterization of DOTA-NT-20.3

#### II.1.1. Synthesis of NT-20.3

Peptides were synthesized in 0.1 mmol scale on a Liberty Blue automated microwave peptide synthesizer (CEM). The synthesis was performed by using predefined Fmoc/tBu chemistry protocols on a Fmoc-Leu Wang resin (loading of 0.32 mmol/g), with DIC and Oxyma as coupling agents, and a solution of 20% piperidine in DMF for Fmoc deprotection steps.

The resin was washed three times with DMF. A solution of acetic anhydride (474  $\mu$ L, 5 mmol, 50 equiv.) and pyridine (406  $\mu$ L, 5 mmol, 50 equiv.) in dry DMF was added to the resin-bound peptide. The reaction mixture was shaken at room temperature for 1 h. The resin was washed three times with DMF,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , and  $\text{Et}_2\text{O}$ .

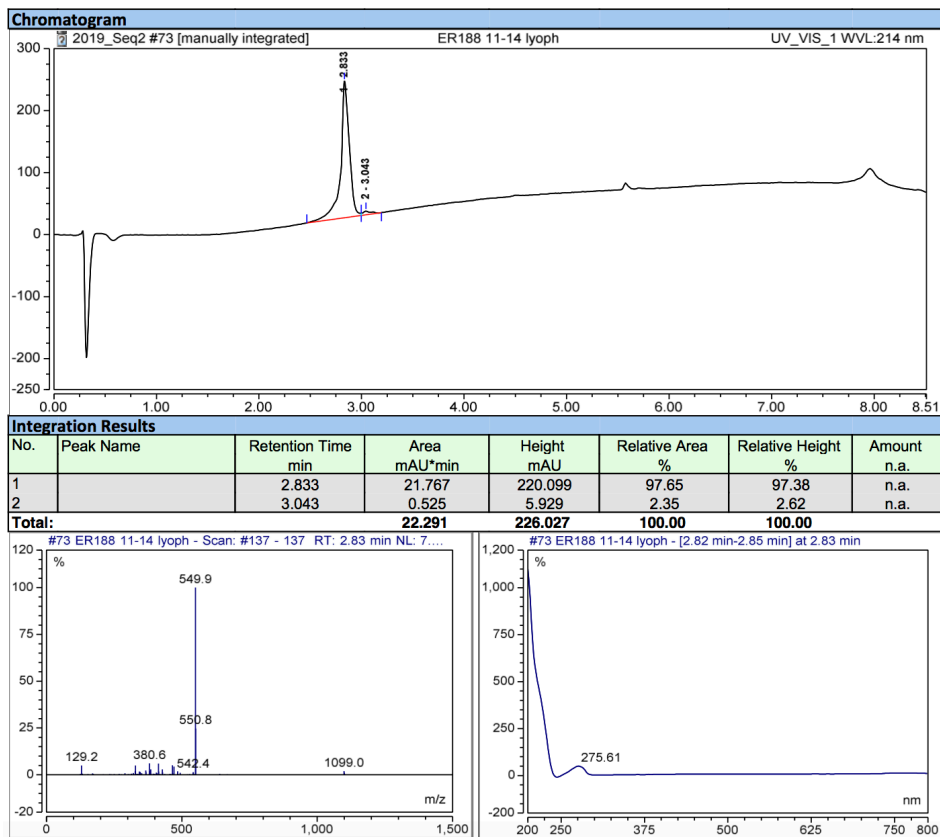
The peptide was cleaved from the resin using a TFA/ triisopropylsilane/ $\text{H}_2\text{O}$  mixture (95/2.5/2.5, v/v/v, 5 mL) for 2 h at room temperature. The filtrate was recovered and heated at 40 °C for an additional 4 h and then concentrated under a flow of nitrogen gas, followed by precipitation in diethyl ether and centrifugation (4000 rpm, 10 min). The supernatant was removed, and the residue was dried under vacuum.

The crude peptide was purified by semipreparative HPLC on a BetaBasic-18 column (A being  $\text{H}_2\text{O}$  with 0.1% TFA and B being MeCN with 0.1% TFA, with the following gradient program: 5% to 60% B over 80 min, at a flow rate of 20 mL/min), and the appropriate fractions were lyophilized to afford peptide as white powder (1 TFA salt, 56.4 mg, 47%, purity: 98%).

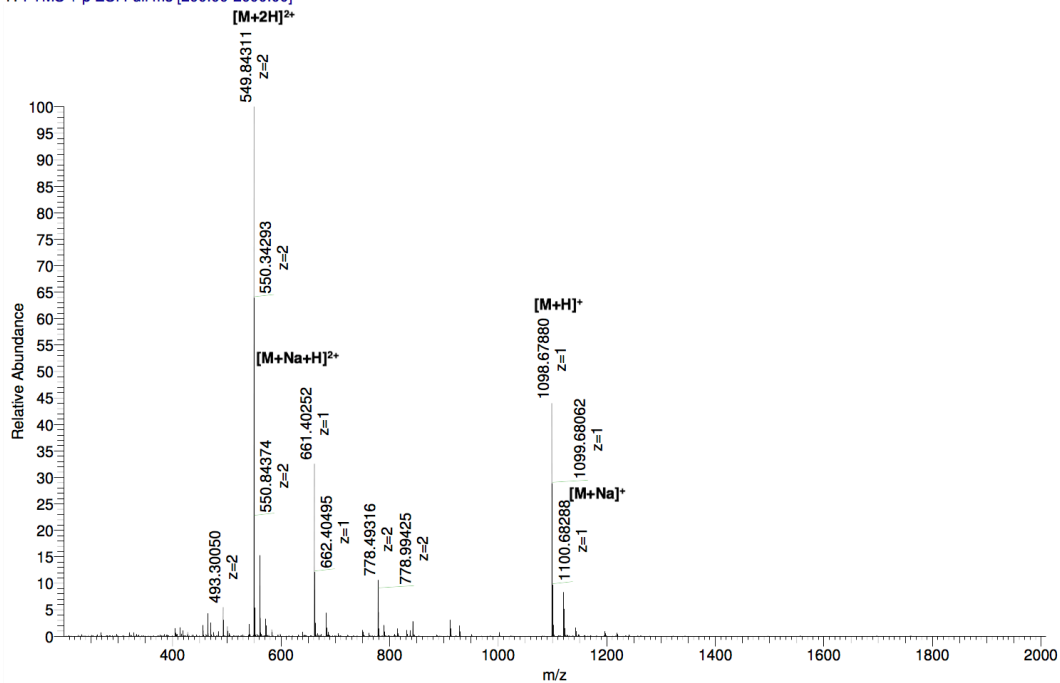
RP-HPLC-MS:  $t_r$  = 2.8 min.  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{52}\text{H}_{87}\text{N}_{15}\text{O}_{11}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  1098.67, found 1099.0 ;  $m/z$  calculated for  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  549.8, found 549.9.

HRMS:  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{52}\text{H}_{87}\text{N}_{15}\text{O}_{11}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  1098.67889, found 1098.67880.

RP-HPLC-MS and HRMS analysis of NT-20.3:



ACN/H<sub>2</sub>O  
 19er\_230\_1 #1-20 RT: 0.00-0.29 AV: 20 NL: 2.68E7  
 T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-2000.00]

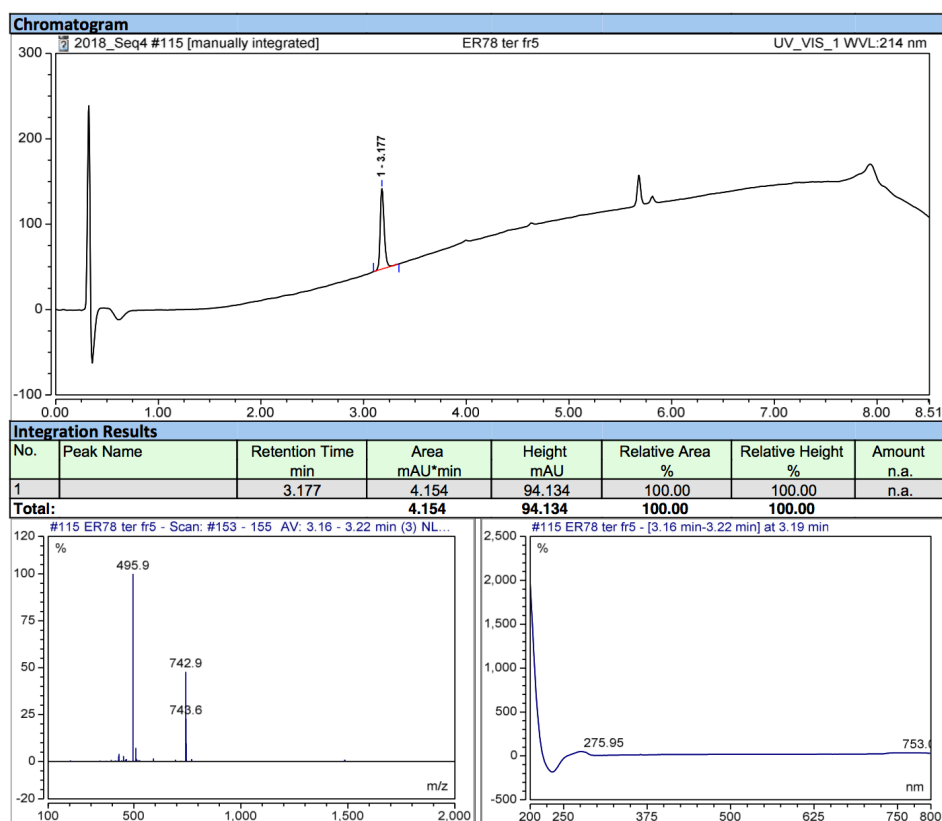


### II.1.2. Synthesis of DOTA-NT-20.3

To a solution of NT-20.3 (15 mg, 12.4  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) in anhydrous DMF (0.5 mL) and DIPEA (8.4  $\mu\text{L}$ , 49.6  $\mu\text{mol}$ , 4 equiv.), was added a solution of DOTA-NHS (18.9 mg, 24.8  $\mu\text{mol}$ , 2 equiv.) in anhydrous DMF (0.5 mL) with DIPEA (30.3  $\mu\text{L}$ , 173.6  $\mu\text{mol}$ , 14 equiv.). The reaction mixture was stirred at 40 °C overnight. The reaction medium was concentrated under vacuum and the oil was purified on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% FA, B: MeCN 0.1% FA with the following gradient program: 15% of B for 5 min, 15% to 45% of B in 70 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product was obtained as a white powder (FA salt, 4.62 mg, 23%, purity >99%).

RP-HPLC-MS:  $t_r$  = 3.2 min,  $m/z$  calculated for C<sub>68</sub>H<sub>113</sub>N<sub>19</sub>O<sub>18</sub> [M+2H]<sup>+</sup> 742.9, found 742.9 ;  $m/z$  calculated for [M+3H]<sup>3+</sup> 495.6, found 495.9.

RP-HPLC-MS analysis of DOTA-NT-20.3:



## II.2. Synthesis and characterization of compound 1 to 7

### II.2.1. Synthesis of compounds 1a, 1b and 1c

#### **General procedure**

Peptides were synthesized in 0.1 mmol scale on a Liberty Blue automated microwave peptide synthesizer (CEM). The synthesis was performed by using predefined Fmoc/tBu chemistry protocols on a Fmoc-Leu Wang resin (loading of 0.32 mmol/g), with DIC and Oxyma as coupling agents, and a solution of 20% piperidine in DMF for Fmoc deprotection steps.

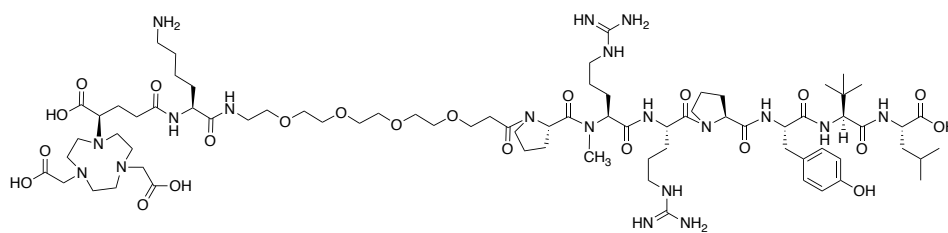
### II.2.2. Synthesis of compounds 2a, 2b and 2c

#### **General procedure**

A solution of (*R*)-NODAGA-NHS (2 equiv.) and DIPEA (10 equiv.) in dry DMF was added to the resin-bound peptide. The reaction mixture was shaken at room temperature overnight. The resin was washed three times with DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and Et<sub>2</sub>O.

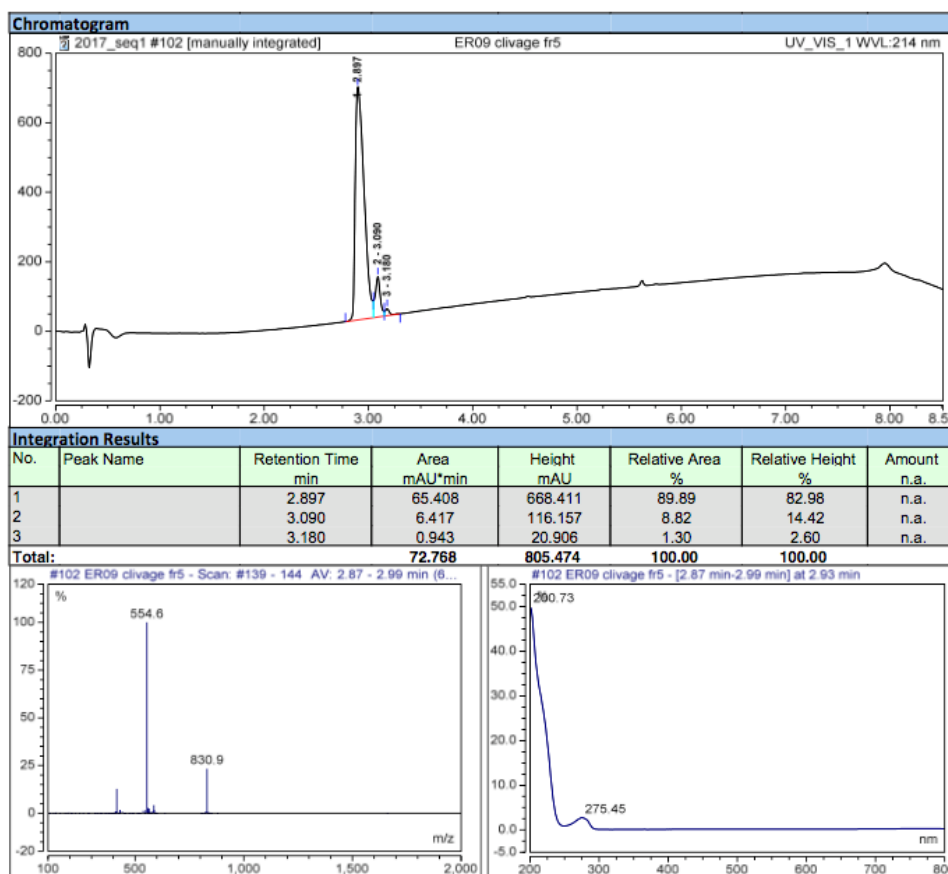
The peptide was cleaved from the resin using a TFA/ triisopropylsilane/H<sub>2</sub>O mixture (95/2.5/2.5, v/v/v, 5 mL) for 2 h at room temperature. The filtrate was recovered and heated at 40 °C for an additional 4 h and then concentrated under a flow of nitrogen gas, followed by precipitation in diethyl ether and centrifugation (4000 rpm, 10 min). The supernatant was removed, and the residue was dried under vacuum.

The crude peptide was purified by semipreparative HPLC on a BetaBasic-18 column (A being H<sub>2</sub>O with 0.1% TFA and B being MeCN with 0.1% TFA, with the following gradient program: 10% to 60% B over 50 min, at a flow rate of 20 mL/min), and the appropriate fractions were lyophilized to afford target peptides as white powders with a yield ranging from 43% to 69%.

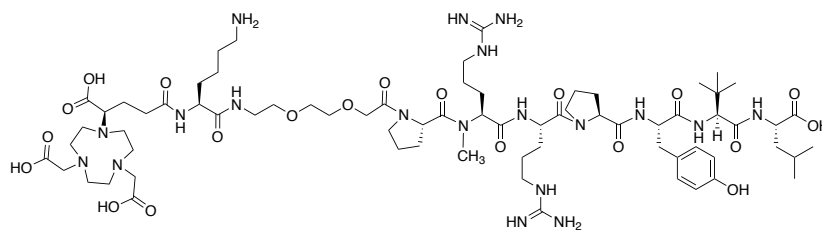
**Conjugate 2a, (R)-NODAGA-Lys-PEG4-Pro-N-Me-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH.3TFA**

138 mg, 69%, purity 90%. RP-HPLC-MS:  $t_r = 2.9$  min.  $m/z$  calculated for  $C_{76}H_{129}N_{19}O_{22}$   $[M+2H]^{2+}$  830.98, found 830.9;  $m/z$  calculated for  $[M+3H]^{3+}$  554.32, found 554.6.

RP-HPLC-MS analysis of **2a**:

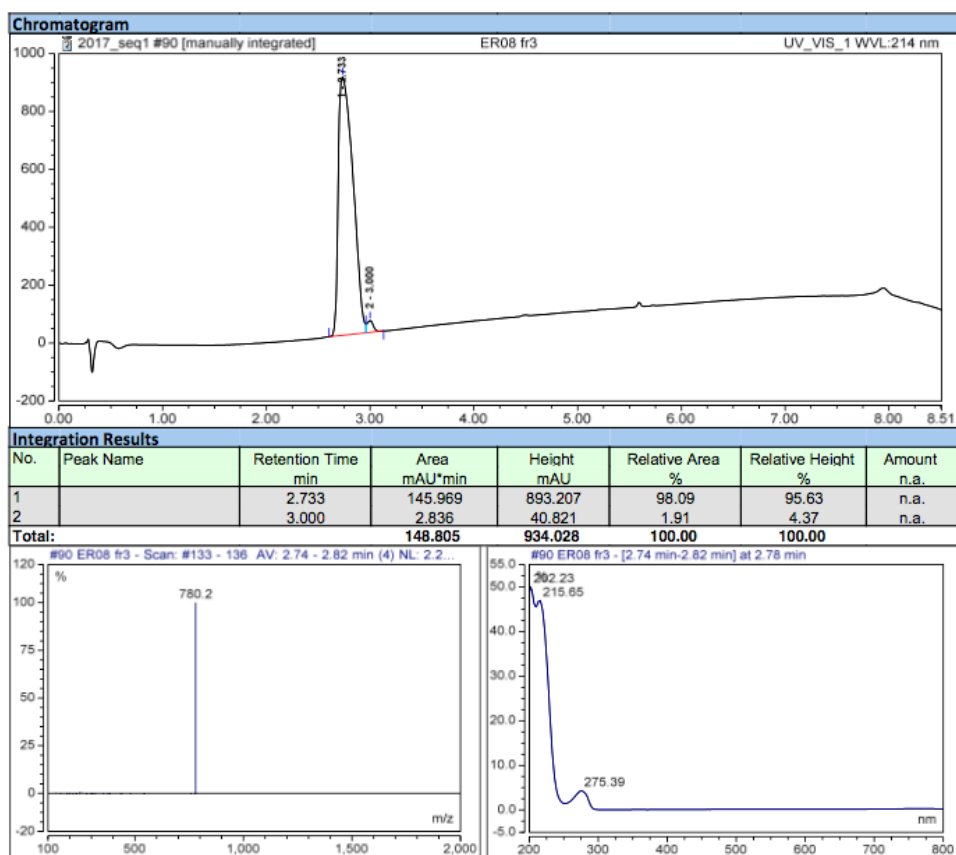


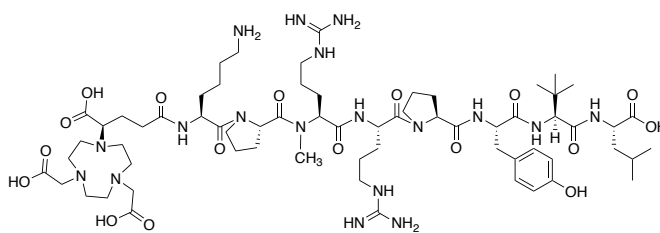
### Conjugate 2b, (R)-NODAGA-Lys-AEEAc-Pro-N-Me-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH.3TFA



81 mg, 43%, purity 98%. RP-HPLC-MS:  $t_r = 2.73$  min.  $m/z$  calculated for  $C_{71}H_{119}N_{19}O_{20}$   $[M+2H]^{2+}$  779.95, found 780.2.

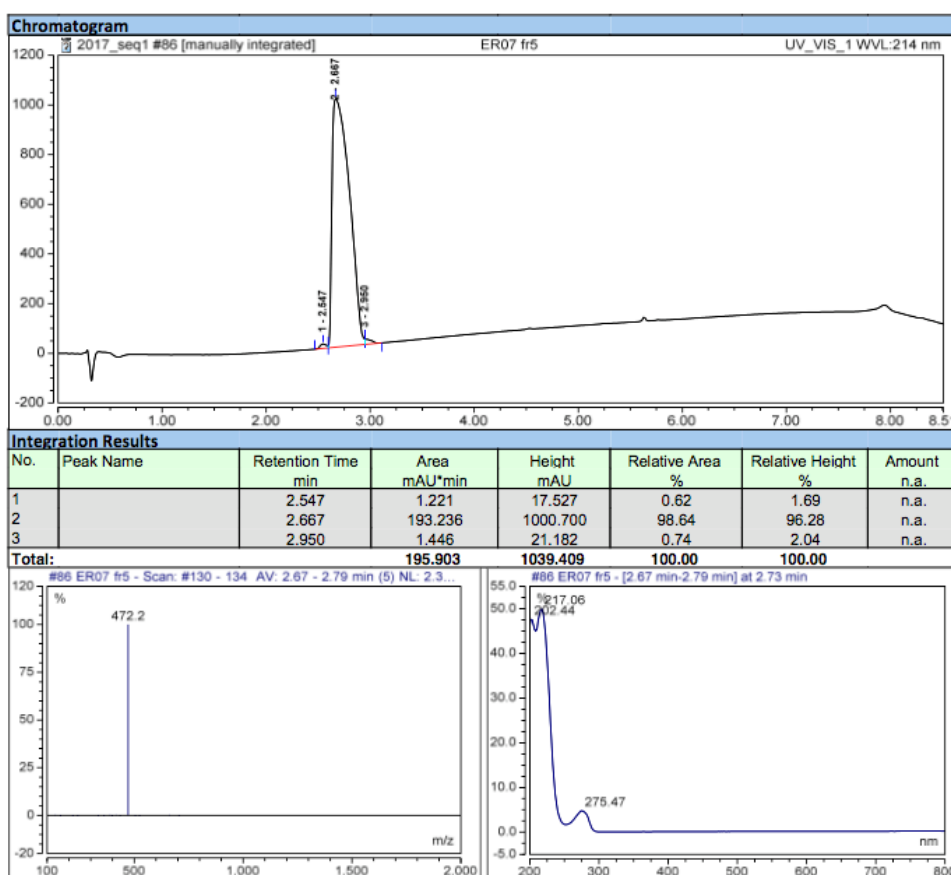
RP-HPLC-MS analysis of **2b**:



**Conjugate 2c, (R)-NODAGA-Lys-Pro-N-Me-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH.3TFA**

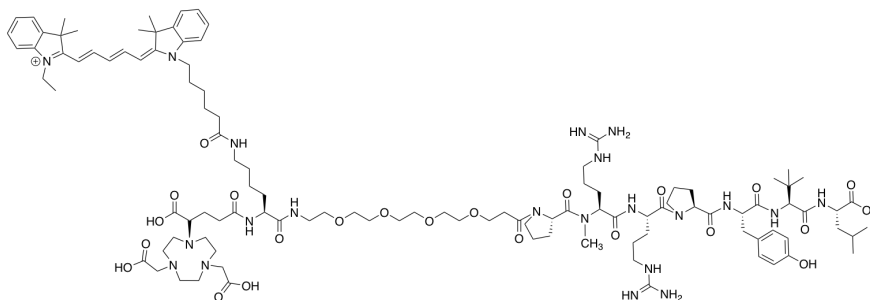
103 mg, 59%, purity 98%. RP-HPLC-MS:  $t_r = 2.67$  min.  $m/z$  calculated for  $C_{65}H_{108}N_{18}O_{17}$   $[M+3H]^{3+}$  471.94, found 472.2.

RP-HPLC-MS analysis of **2c**:

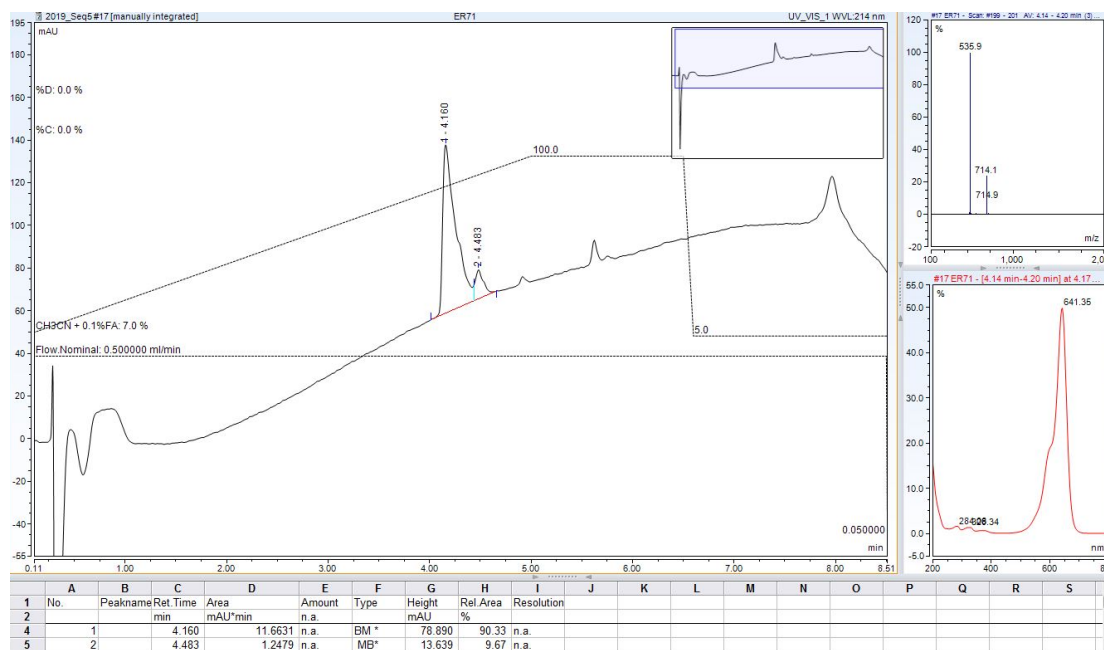




## II.2.3. Synthesis of compound 3

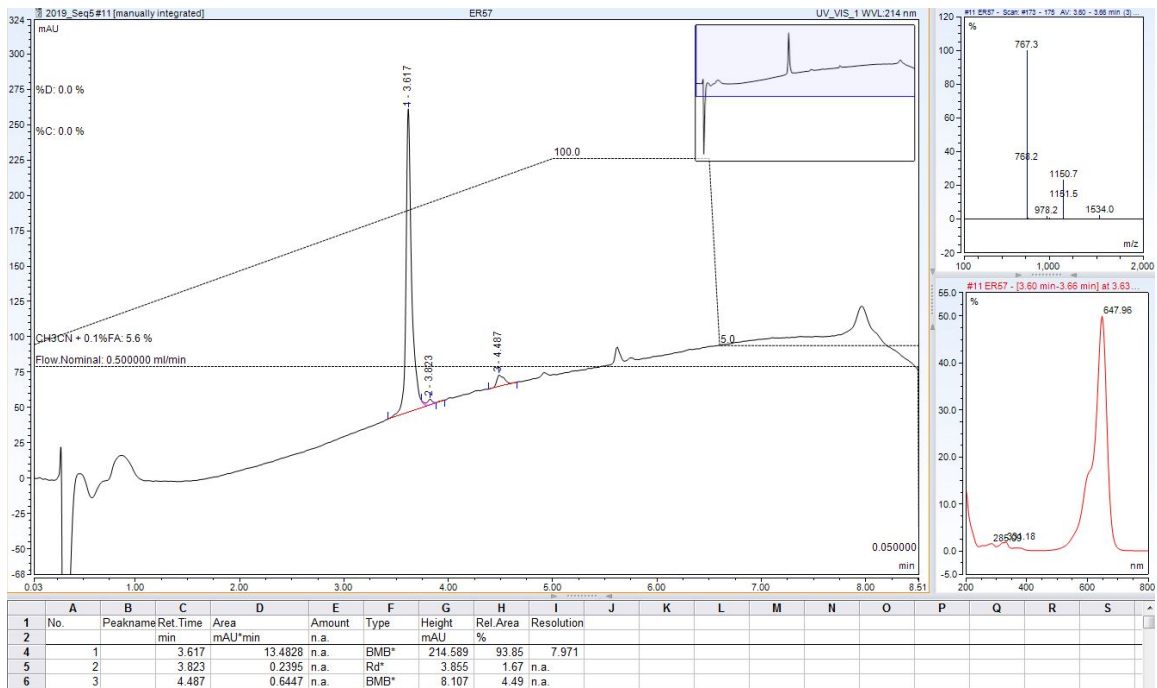
**Compound 3, (R)-NODAGA-(Cy5)Lys-PEG<sub>4</sub>-Pro-N-Me-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH.TFA**

To a solution of cyanine Cy5 (3.55 mg, 0.0072 mmol, 1.2 equiv.) in DMF (0.5 mL) was added DIPEA (2.1  $\mu$ L, 0.012 mmol, 2 equiv.) and TSTU (2.35 mg, 0.0078 mmol, 1.3 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. This solution was added to a solution of (R)-NODAGA-Lys-PEG<sub>4</sub>-Pro-N-Me-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH (10 mg, 0.006 mmol, 1 equiv.) and DIPEA (11  $\mu$ L, 0.06 mmol, 10 equiv.) in DMF (0.5 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under vacuum and the solid was purified on semi-preparative HPLC on a SiliaChrom® dt C<sub>18</sub> column (Silicycle) (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 20% of B for 10 min, 20% to 70% of B in 70 min, at a flow rate of 20 mL/min) afforded to a blue powder (TFA salt, 5.4 mg, 38%, purity: 90%). RP-HPLC-MS:  $t_r$  = 4.16 min.,  $m/z$  calculated for C<sub>109</sub>H<sub>168</sub>N<sub>21</sub>O<sub>23</sub> [M+3H]<sup>3+</sup> 714.42, found 714.2. HRMS:  $m/z$  calculated for C<sub>109</sub>H<sub>168</sub>N<sub>21</sub>O<sub>23</sub> [M+2H]<sup>2+</sup> 1070.13446, found 1070.13486.

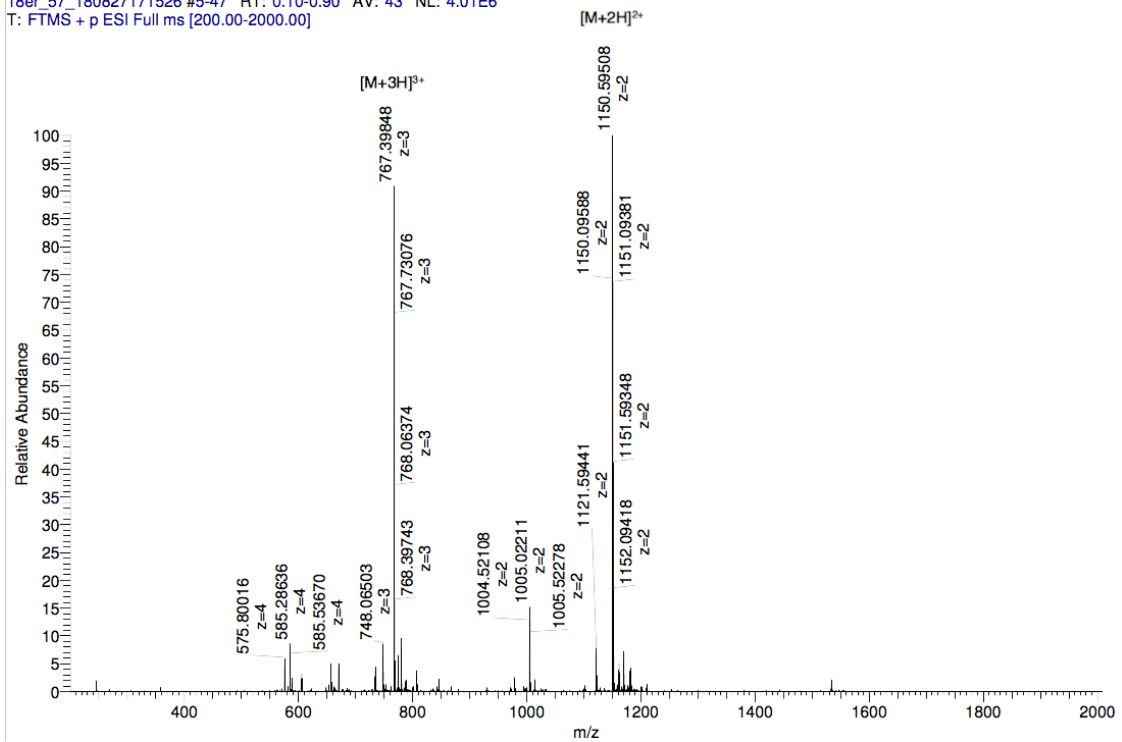
RP-HPLC-MS analysis of **3**:



RP-HPLC-MS and HRMS analysis of 4:



18er\_57\_180827171526 #5-47 RT: 0.10-0.90 AV: 43 NL: 4.01E6  
 T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-2000.00]



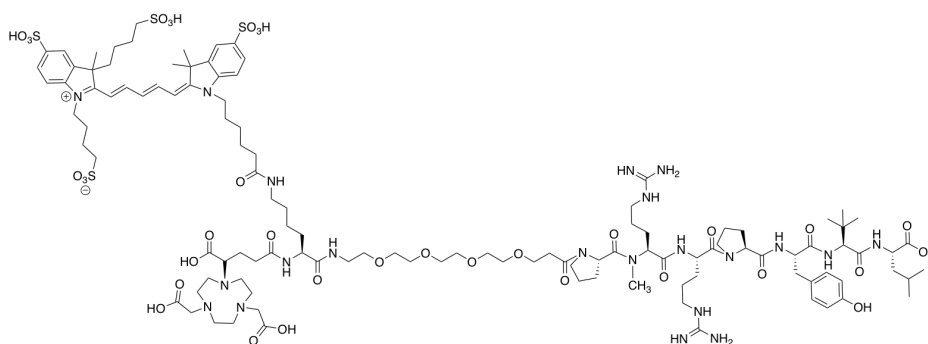
## II.2.5. Synthesis of compounds 5 to 7

**General procedure**

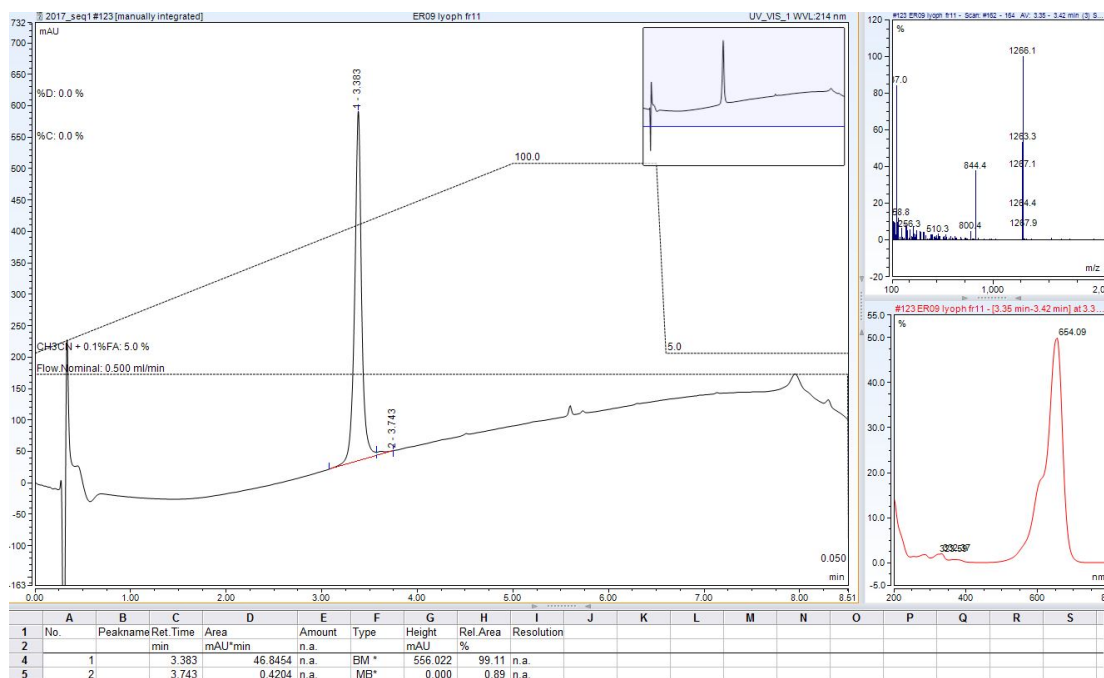
To a solution of tetrasulfonated cyanine 5.0 Cy5\*\* (1.3 equiv.) in DMF was added DIPEA (7.8 equiv.) and TSTU (1.3 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. This solution was added to a solution of peptide (1 equiv.) and DIPEA (10 equiv.) in DMF. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under vacuum and the solid was purified by semi-preparative HPLC on a SiliaChrom® dt C<sub>18</sub> column (Silicycle) (A: TEAB 50 mM, B: MeCN with the following gradient program: 5% of B for 10 min, 5% to 60% of B in 60 min, at a flow rate of 20 mL/min) to afford the target peptide.

**Compound 5, (R)-NODAGA-(Cy5\*\*)Lys-PEG<sub>4</sub>-Pro-N-Me-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH.8TEA**

A blue powder was obtained (15.4 mg, 18%, purity 99%). RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.38$  min., HRMS:  $m/z$  calculated for C<sub>114</sub>H<sub>177</sub>N<sub>21</sub>O<sub>35</sub>S<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 2529.16715, found 2529.17383.

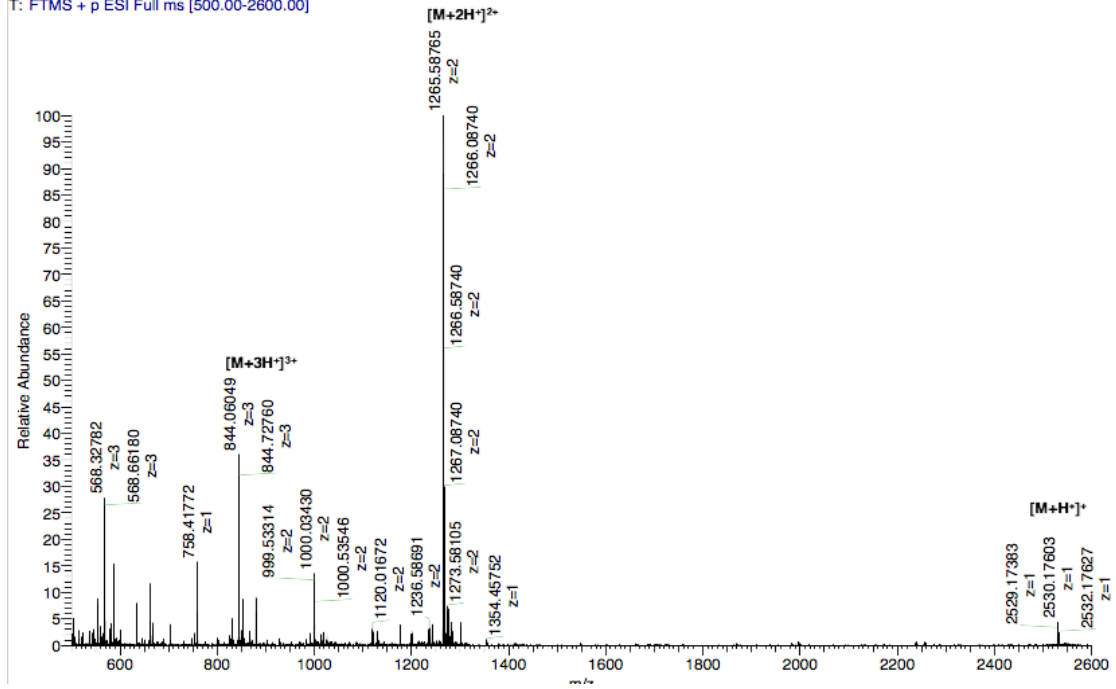


## RP-HPLC-MS analysis of 5:



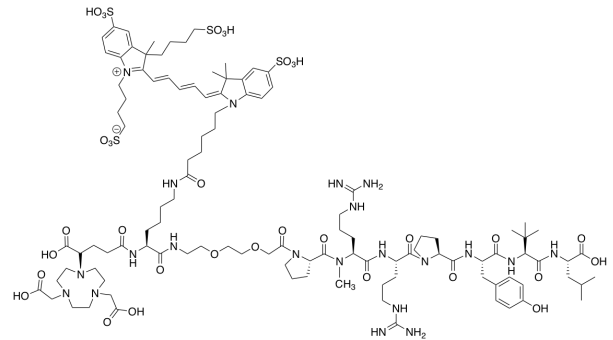
## HRMS spectra of 5:

18er\_09\_me\_1#14 RT: 0.30 AV: 1 NL: 7.64E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [500.00-2600.00]

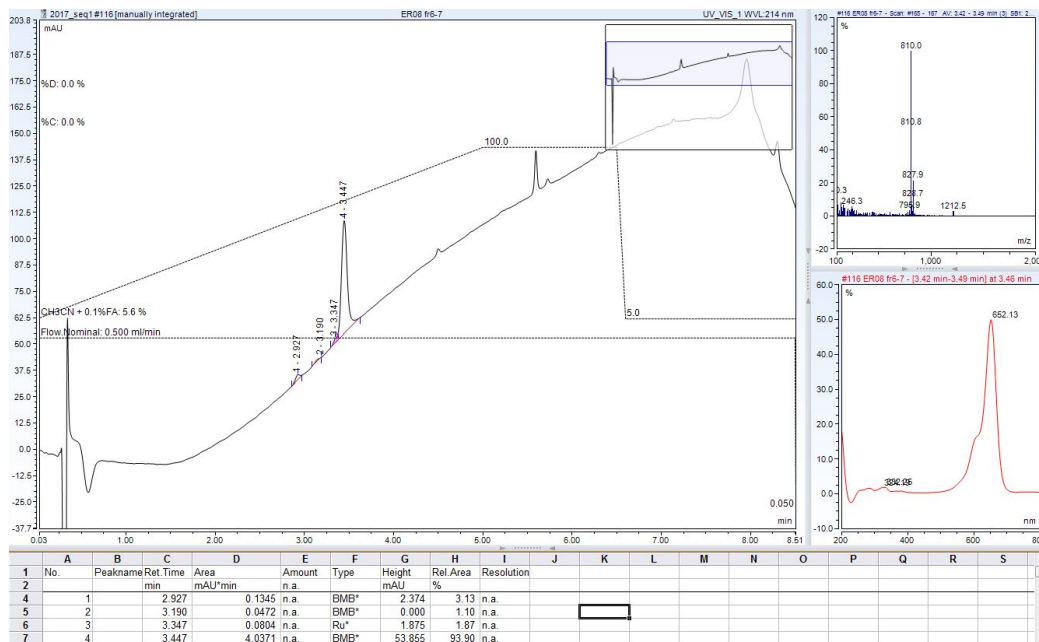


**Compound 6, (R)-NODAGA-(Cy5\*\*)Lys-AEEAc-Pro-N-Me-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH.8TEA**

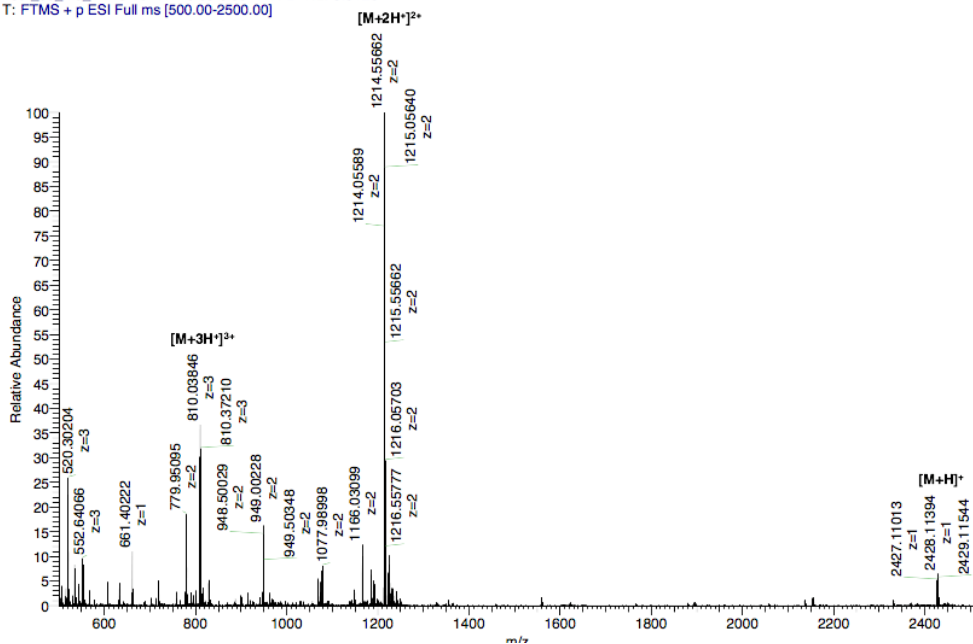
A blue powder was obtained (15.8 mg, 23%, purity 94%). RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.45$  min., HRMS:  $m/z$  calculated for  $C_{109}H_{167}N_{21}O_{33}S_4$   $[M+H]^+$  2427.09908, found 2427.11013.



**RP-HPLC-MS and HRMS analysis of 6:**

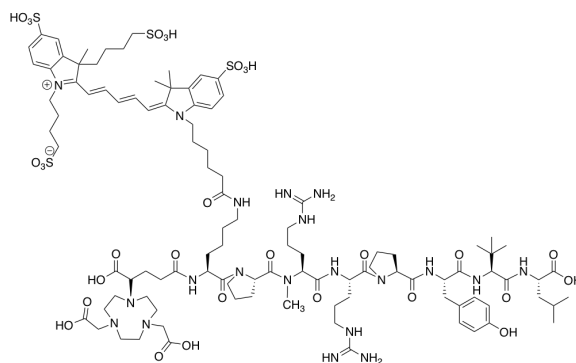


1ber\_08\_me\_1 #15-16 RT: 0.33-0.35 AV: 2 NL: 3.51E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [500.00-2500.00]

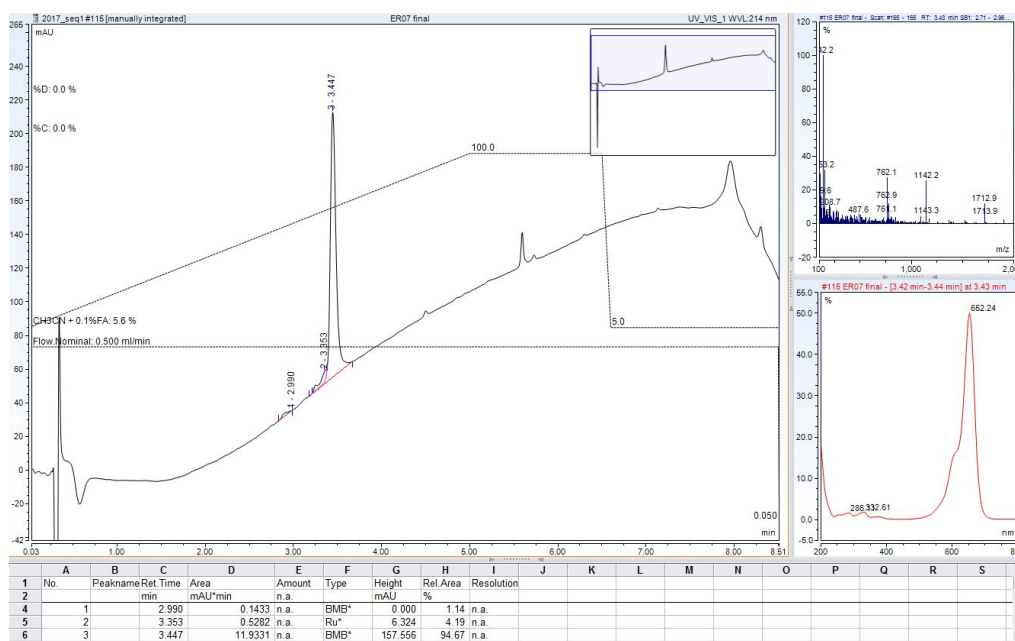


## Compound 7, (*R*)-NODAGA-(Cy5\*\*)Lys-Pro-N-Me-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH.8TEA

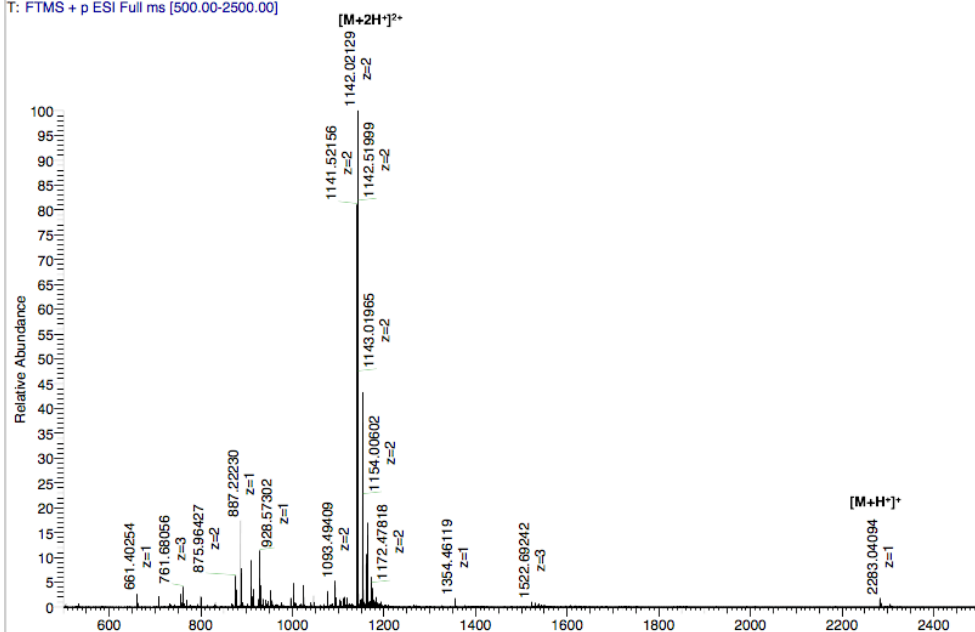
A blue powder was obtained (36.4 mg, 20%, purity: 95%). RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.45$  min., HRMS:  $m/z$  calculated for  $C_{103}H_{156}N_{20}O_{30}S_4$   $[M+H]^+$  2282.02518, found 2282.03806.



RP-HPLC-MS and HRMS analysis of 7:



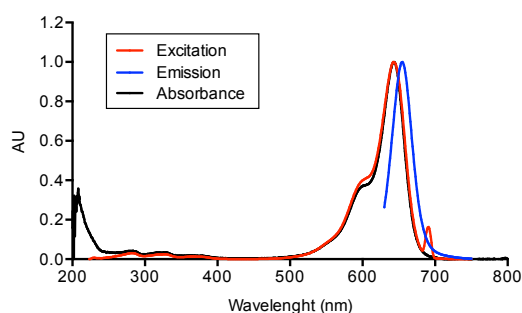
18er\_07\_me\_2\_#1-20 RT: 0.00-0.42 AV: 20 NL: 6.95E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [500.00-2500.00]



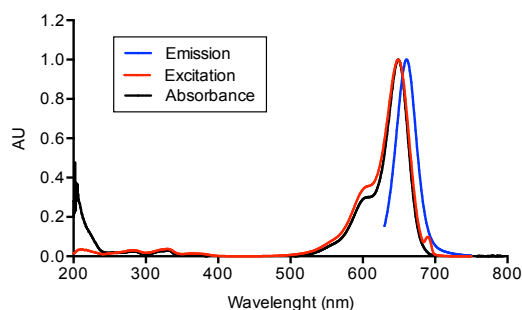
### II.3. Spectral properties of compounds 3 to 7

UV-Vis absorbance and fluorescence spectra of the compounds were recorded in the range 200-800 nm in PBS (pH 7.4, 0.01 M) with concentrations in the micromolar range. Emission spectra were recorded in the range 630-800 nm after excitation at 620 nm (shutter: Auto Open, Ex. Slit = 5 nm and Em. slit = 5 nm). Excitation spectra were recorded in the range 200-800 nm with emission measurement at 690 nm (shutter: Auto Open, Ex. slit = 5 nm and Em. slit = 5 nm).

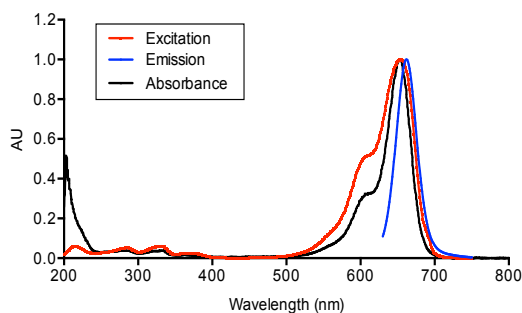
Normalized photophysical spectra (absorbance, excitation and emission) of compound **3**.  $\lambda_{Ex, max} = 643$  nm,  $\lambda_{Em, max} = 655$  nm:



Normalized photophysical spectra (absorbance, excitation and emission) of compound **4**.  $\lambda_{Ex, max} = 649$  nm,  $\lambda_{Em, max} = 661$  nm:



Normalized photophysical spectra (absorbance, excitation and emission) of compound **6**.  $\lambda_{Ex, max} = 652-653$  nm,  $\lambda_{Em, max} = 665-666$  nm:





## II.4. Metalation of DOTA-NT-20.3 and peptides with $^{nat}\text{Ga}$

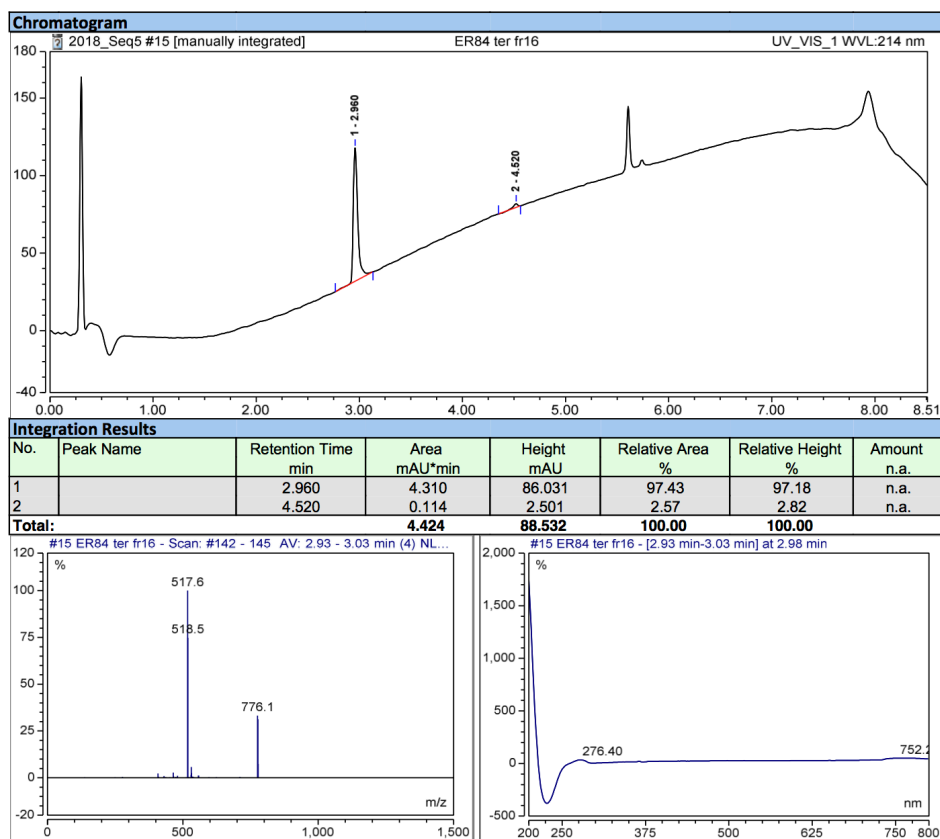
### General procedure

The compound was dissolved in acetate buffer (0.1 M, pH 3.48). A solution of  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  (1.5 equiv.) in acetate buffer was then added, eventually with a small amount of acetonitrile to improve the solubility. The reaction mixture was stirred for 5 h at 40 °C. The excess of free gallium was removed by semi-preparative RP-HPLC.

### Compound [ $^{nat}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-NT-20.3

Purification on an Hypersil column (A:  $\text{H}_2\text{O}$  0.1% FA, B: MeCN 0.1% FA with the following gradient program: 0% to 40% of B in 60 min, at a flow rate of 3.5 mL/min). The FA salt was obtained as a white powder (1.4 mg, 37%, purity: 97%). RP-HPLC-MS:  $t_r$  = 2.96 min ;  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{68}\text{H}_{110}\text{GaN}_{19}\text{O}_{18}$  [ $\text{M}+2\text{H}$ ] $^{2+}$  775.9, found 776.1; [ $\text{M}+3\text{H}$ ] $^{3+}$  517.6, found 517.6.

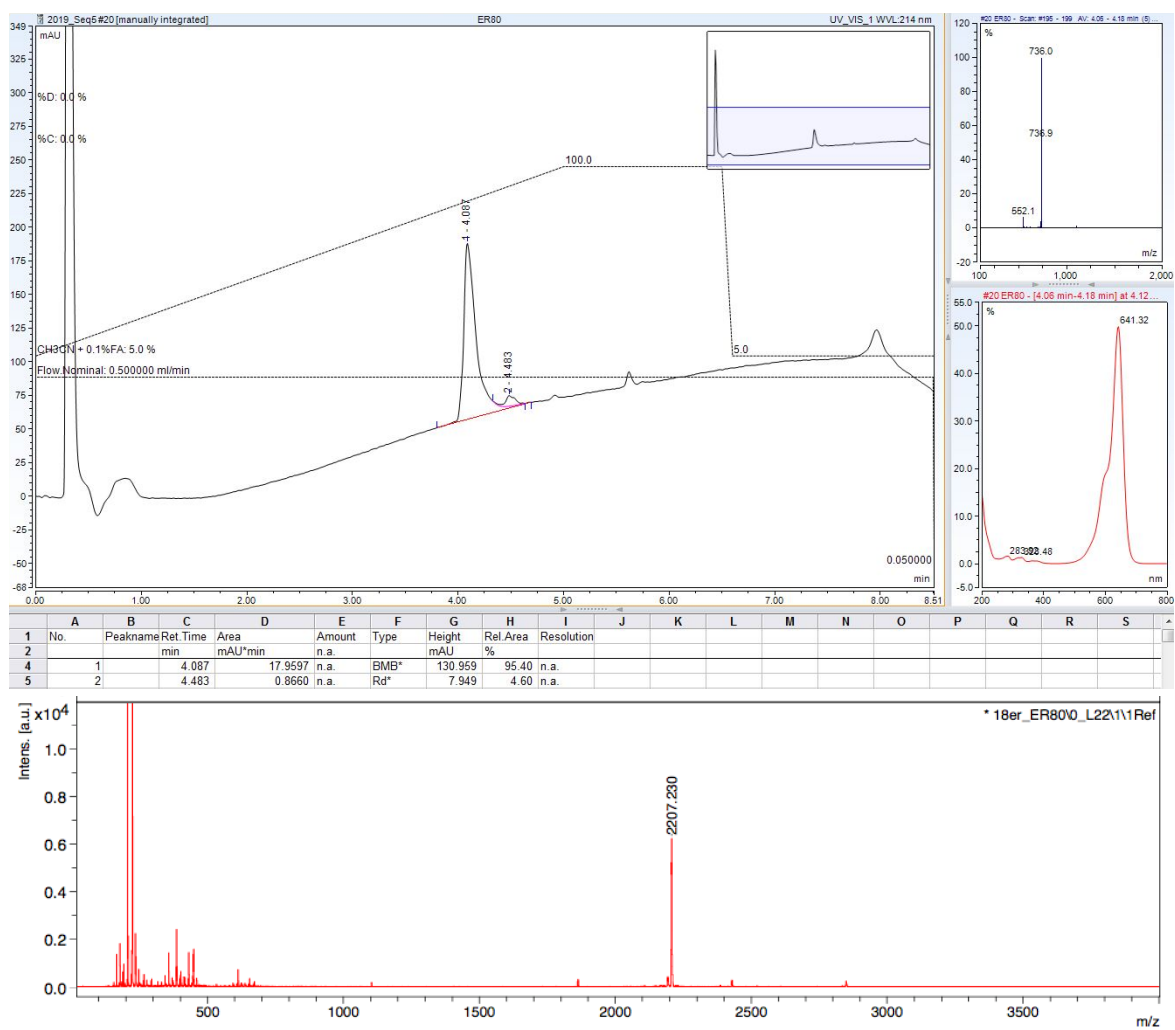
RP-HPLC-MS analysis of [ $^{nat}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-NT-20.3:



### Compound [<sup>nat</sup>Ga]Ga-3

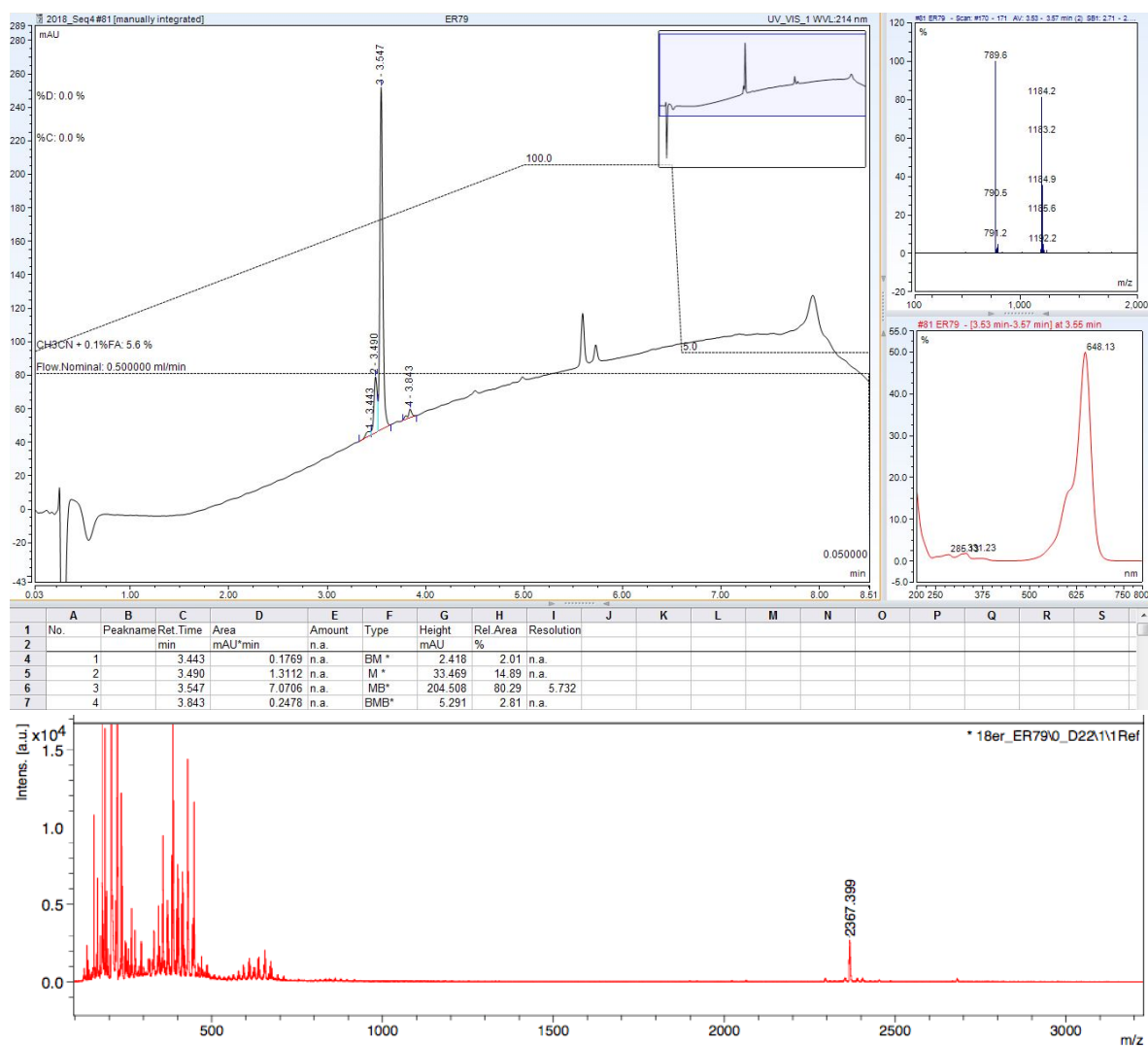
Purification on a SiliaChrom® dt C<sub>18</sub> column (Silicycle) (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 30% to 70% of B in 40 min, at a flow rate of 20 mL/min). The TFA salt was obtained as a blue powder (3.3 mg, 68%, purity: 95%). RP-HPLC-MS: t<sub>r</sub> = 4.09 min. MALDI-TOF: m/z calculated for C<sub>109</sub>H<sub>165</sub>GaN<sub>21</sub>O<sub>23</sub> [M+H]<sup>+</sup> 2207.17, found 2207.23.

#### RP-HPLC-MS and MALDI-TOF analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-3:



**Compound [<sup>nat</sup>Ga]Ga-4**

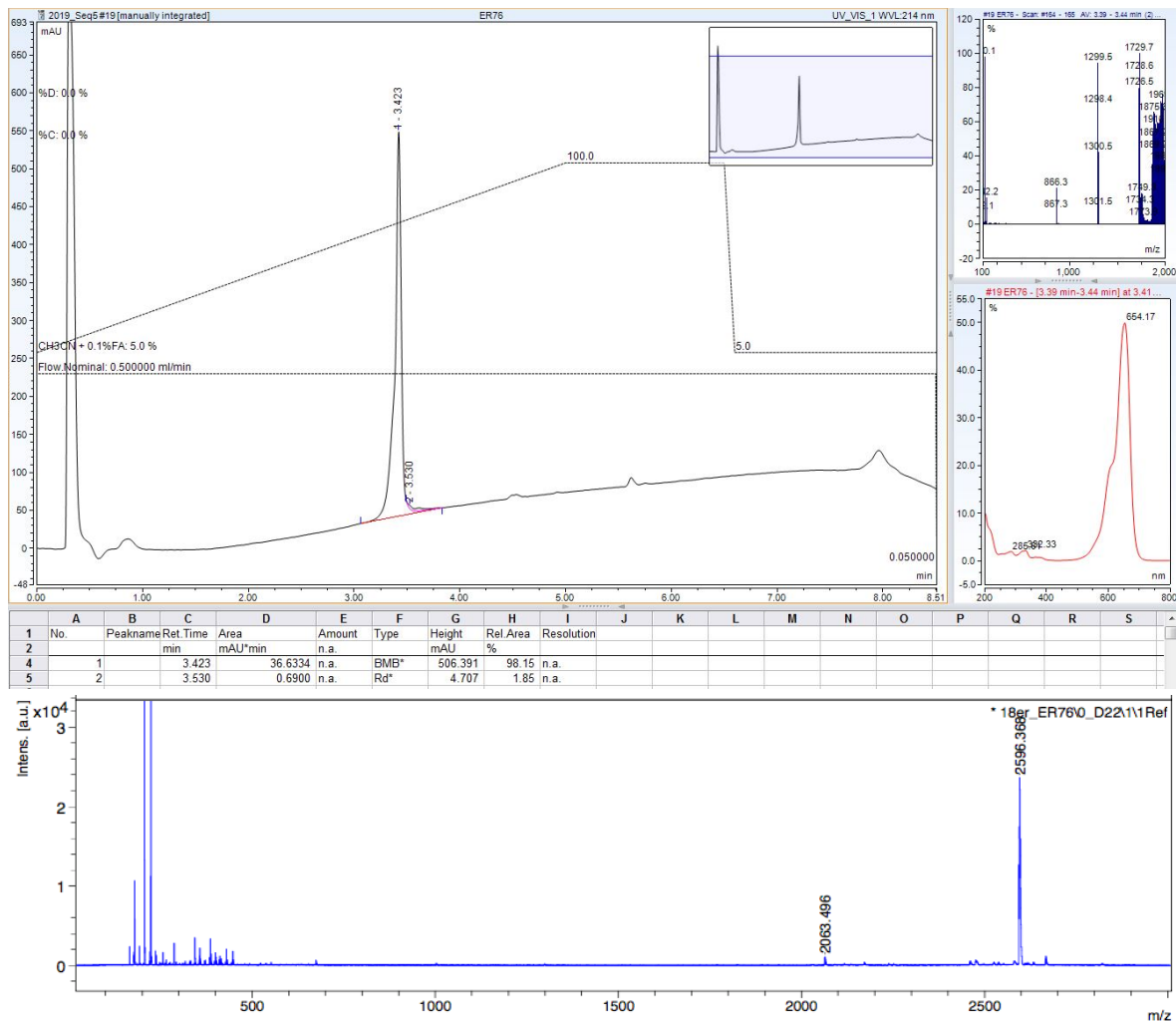
Purification on a SiliaChrom® dt C<sub>18</sub> column (Silicycle) (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 10% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min). The TFA salt was obtained as a blue powder (4 mg, 76%, purity: 80%). RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.55$  min. MALDI-TOF:  $m/z$  calculated for C<sub>109</sub>H<sub>164</sub>GaN<sub>21</sub>O<sub>29</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 2366.07, found 2367.40.

**RP-HPLC-MS and MALDI-TOF analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-4:**

### Compound [<sup>nat</sup>Ga]Ga-5

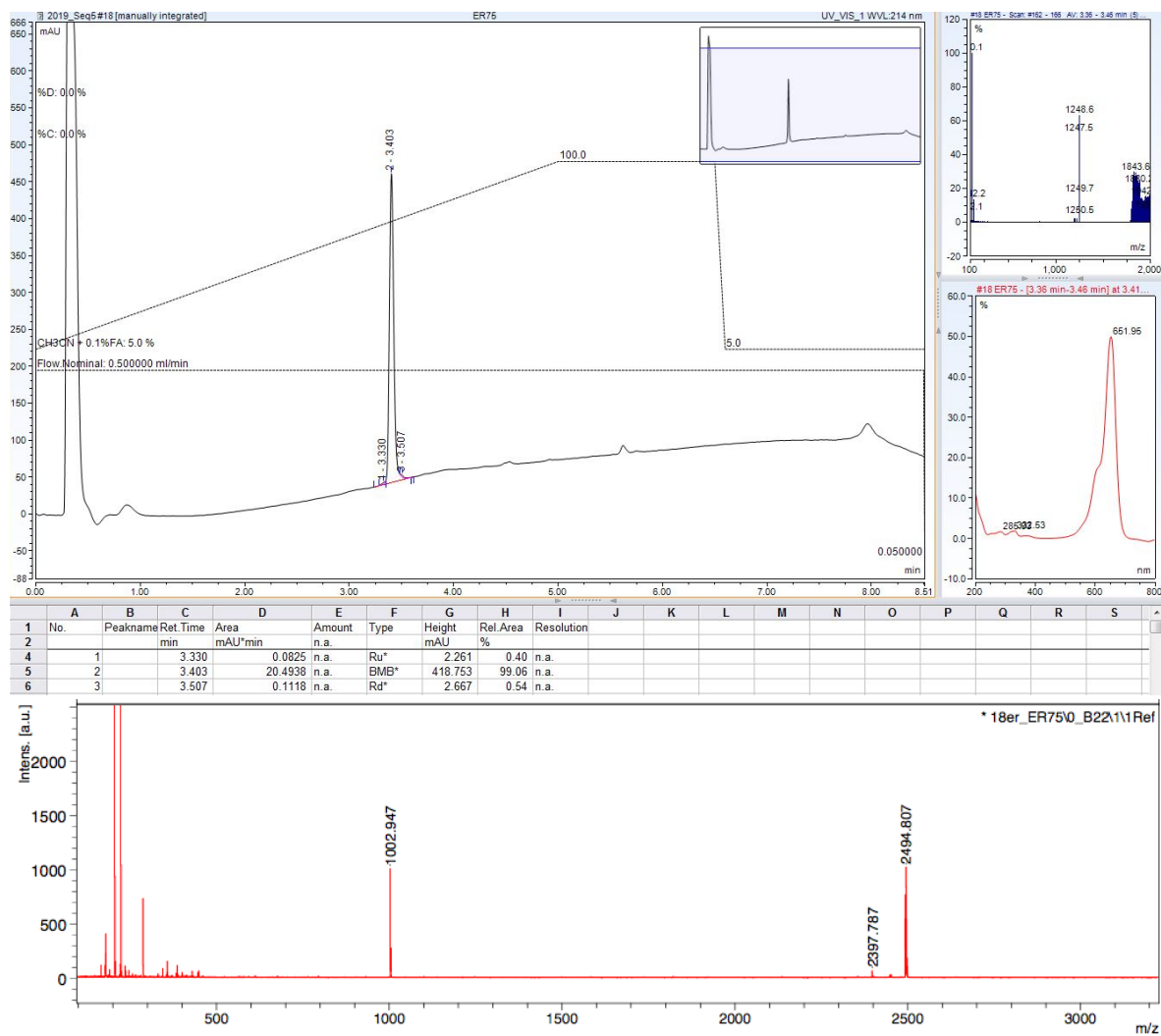
Purification on a SiliaChrom® dt C<sub>18</sub> column (Silicycle) (A: TEAB 50 mM, B: MeCN with the following gradient program: 10% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min). The triethylammonium salt was obtained as a blue powder (7 mg, 74%, purity 98%). RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.42$  min. MALDI-TOF:  $m/z$  calculated for C<sub>114</sub>H<sub>174</sub>GaN<sub>21</sub>O<sub>35</sub>S<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 2596.07, found 2596.37.

#### RP-HPLC-MS and MALDI-TOF analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-5:



**Compound [<sup>nat</sup>Ga]Ga-6**

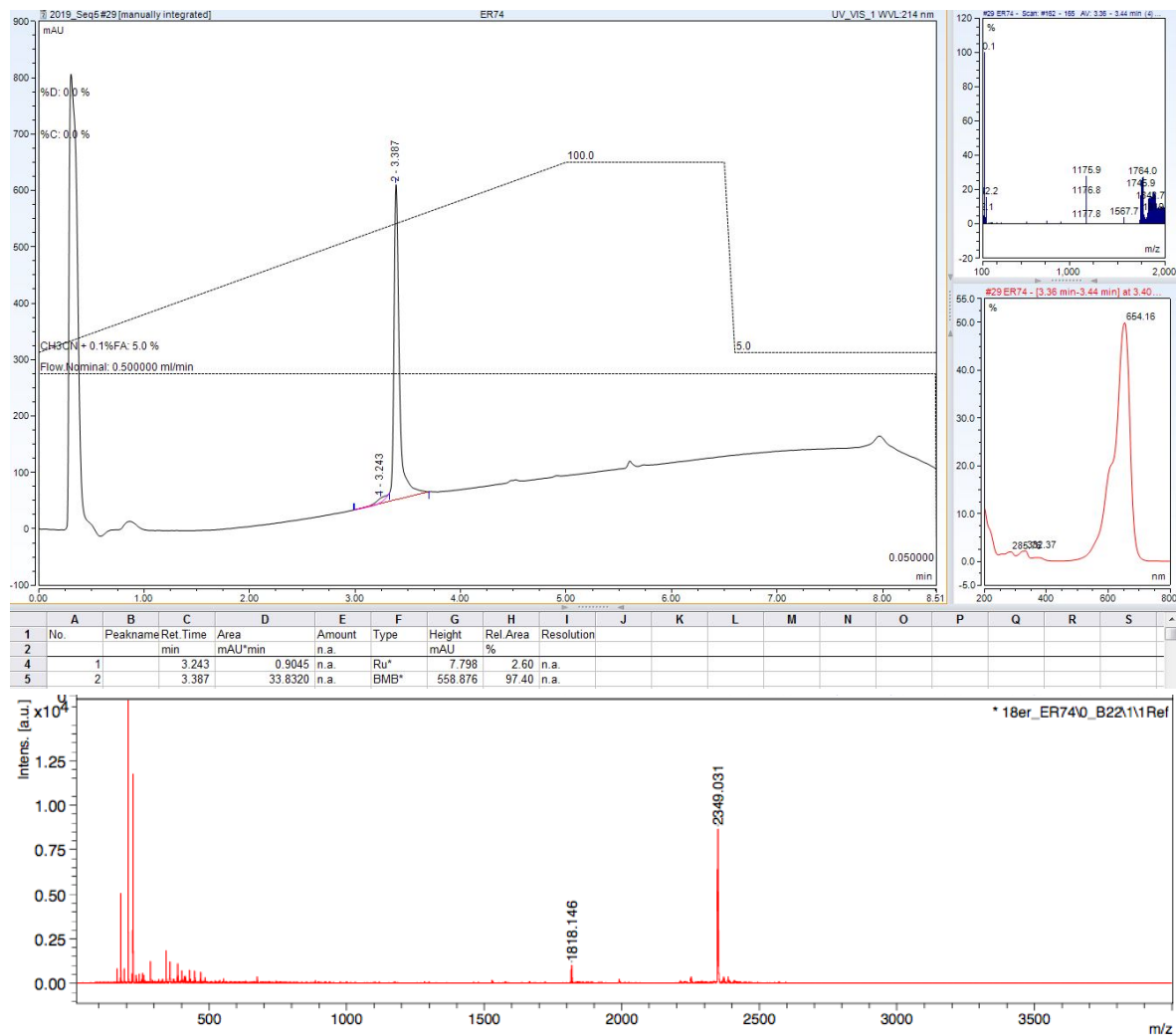
Purification on a SiliaChrom® dt C<sub>18</sub> column (Silicycle) (A: TEAB 50 mM, B: MeCN with the following gradient program: 10% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min). The triethylammonium salt was obtained as a blue powder (8 mg, 84%, purity 99%). RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.4$  min. MALDI-TOF:  $m/z$  calculated for C<sub>109</sub>H<sub>164</sub>GaN<sub>21</sub>O<sub>33</sub>S<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 2494.0, found 2494.81.

**RP-HPLC-MS and MALDI-TOF analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-6:**

### Compound [<sup>nat</sup>Ga]Ga-7

Purification on a SiliaChrom® dt C<sub>18</sub> column (Silicycle) (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 10% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min). The TFA salt was obtained as a blue powder (6 mg, 59%, purity: 97%). RP-HPLC-MS: *t<sub>r</sub>* = 3.37 min. MALDI-TOF: *m/z* calculated for C<sub>103</sub>H<sub>153</sub>GaN<sub>20</sub>O<sub>30</sub>S<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 2348.92, found 2349.03.

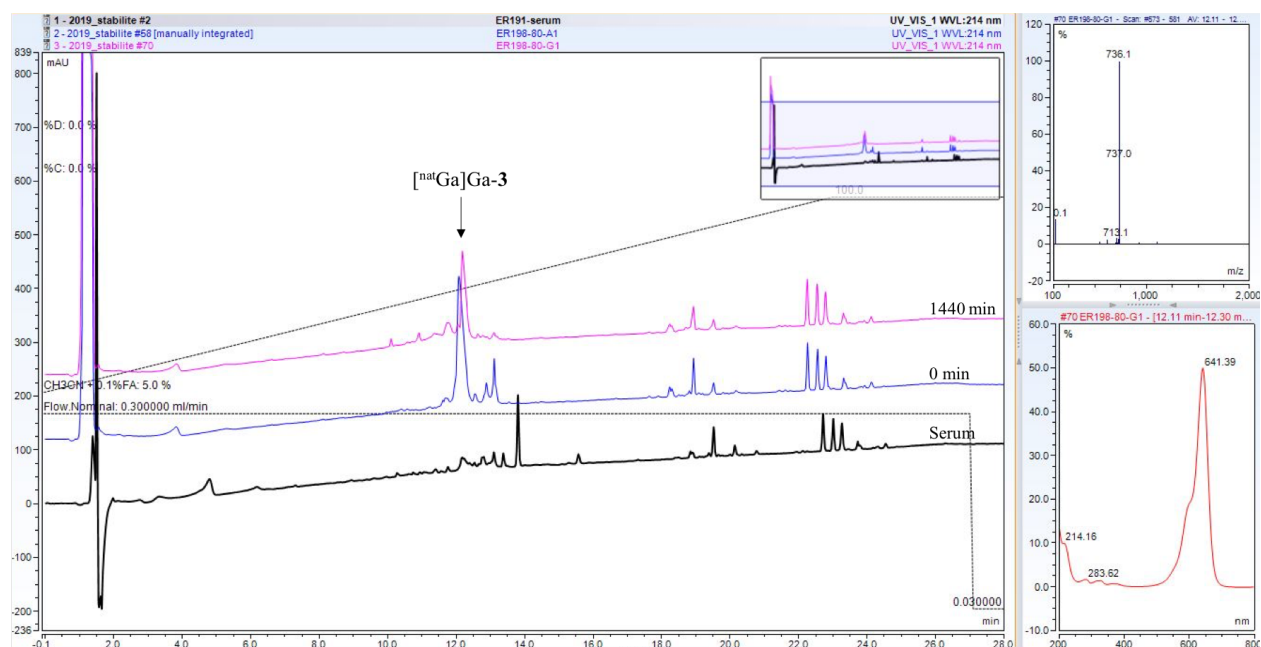
#### RP-HPLC-MS and MALDI-TOF analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-7:



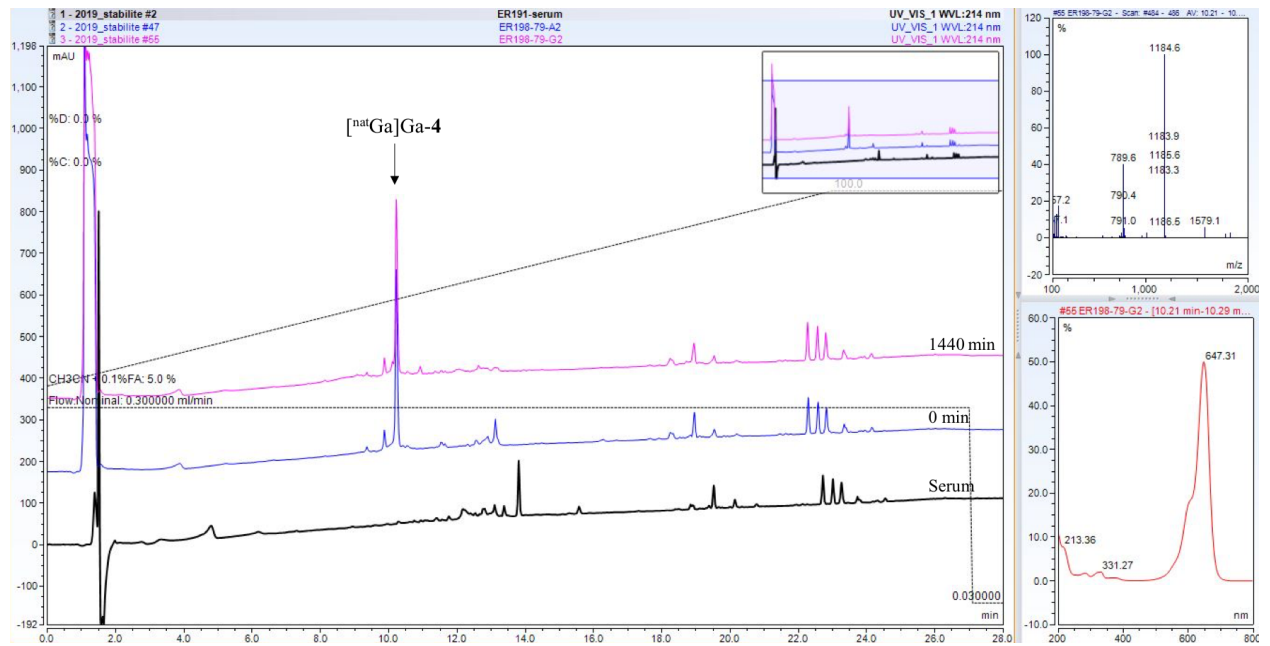
## II.5. *In vitro* stability

Fifteen microliters of a 5 mM stock solution of peptide in H<sub>2</sub>O was stirred in a thermomixer (900 rpm, 37 °C, dark) with 135 µL of mouse serum (Sigma-Aldrich, M5905, batch SLBT4412). The final concentration in peptide was 0.5 mM. After 0 min, 20 min, 35 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h and 24 h, a sample (15 µL) was collected and diluted with 60 µL of 99% ethanol. Samples were vortexed and centrifuged (11700 rpm, 10 min) to remove precipitated proteins. The supernatant was analyzed by RP-HPLC-MS at a wavelength of 214 nm on a RP Kinetex™ column (Phenomenex) (2.6 µm, 100 Å, 150 × 2.1 mm) with ultrapure water and HPLC-grade MeCN (A: H<sub>2</sub>O 0.1% FA and B: MeCN 0.1% FA). Analyses were performed with the following gradient program: 5% to 100% of B in 23 min, 100% B for 4 min at a flow rate of 0.3 mL/min.

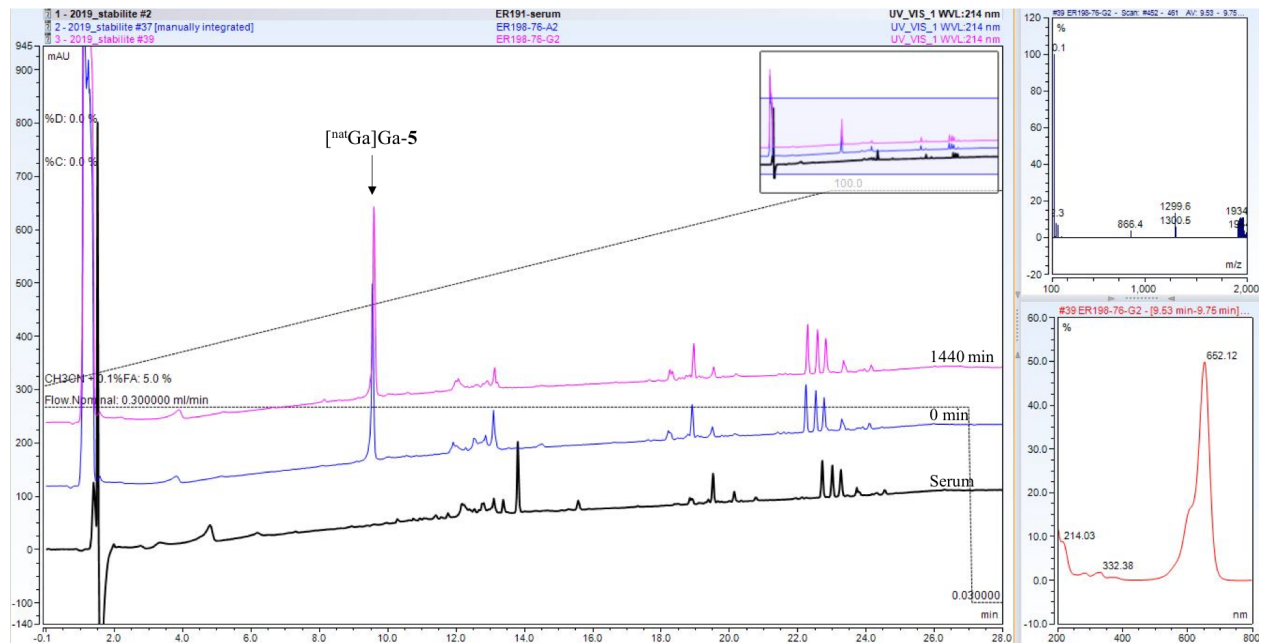
RP-HPLC-MS analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-3 after 0 min and 24 h of incubation in mouse serum:



RP-HPLC-MS analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-4 after 0 min and 24 h of incubation in mouse serum:

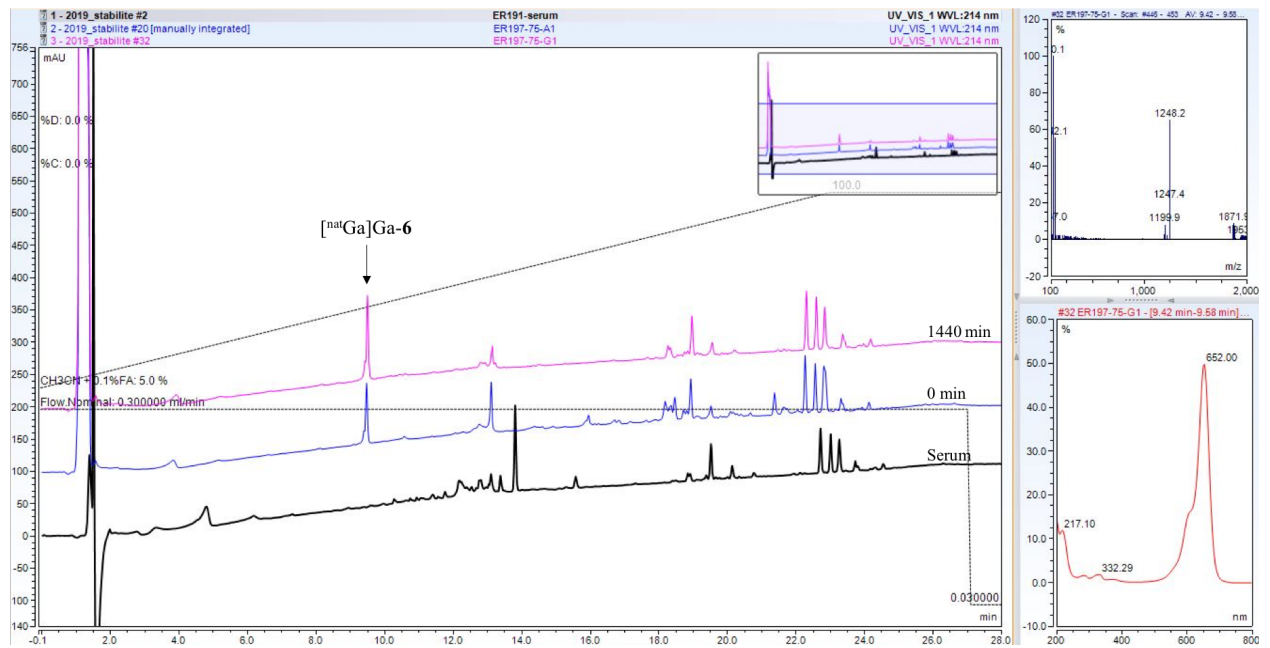


RP-HPLC-MS analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-5 after 0 min and 24 h of incubation in mouse serum:

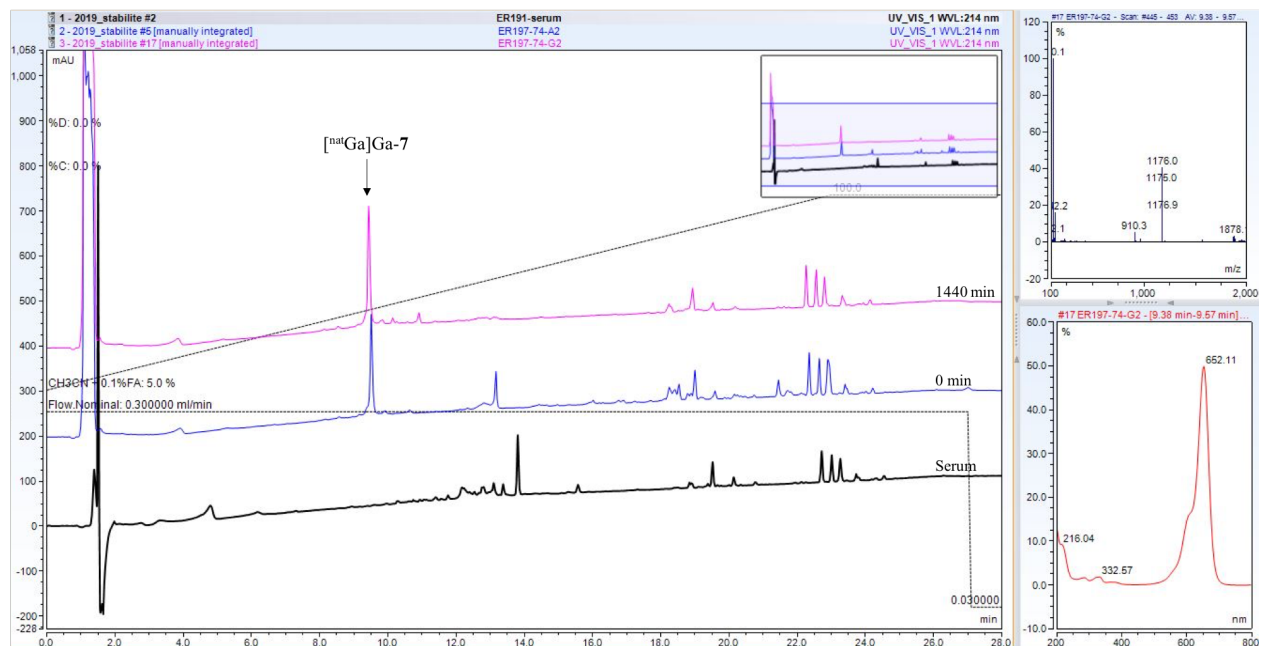




RP-HPLC-MS analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-6 after 0 min and 24 h of incubation in mouse serum:



RP-HPLC-MS analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-7 after 0 min and 24 h of incubation in mouse serum:



## II.6. *In vitro* binding affinity

The affinity of each bimodal compound [<sup>nat</sup>Ga]Ga-**3**, [<sup>nat</sup>Ga]Ga-**4**, [<sup>nat</sup>Ga]Ga-**5**, [<sup>nat</sup>Ga]Ga-**6** and [<sup>nat</sup>Ga]Ga-**7** for the NTS<sub>1</sub> receptors was measured on a competitive binding assay on human recombinant CHO cells overexpressing NTS<sub>1</sub>, using [<sup>125</sup>I]-Tyr<sup>3</sup>-neurotensin (0.05 nM;  $K_d = 0.22$  nM) as a radioligand (Eurofins). IC<sub>50</sub> values were converted into inhibition constants ( $K_i$ ) using the Cheng–Prusoff equation.

## II.7. Radiolabeling of peptides with <sup>68</sup>Ga

Compounds were radiolabeled using an R&D Synchrom module (Raytest). The <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga eluate (1.5 mL, 150– 300 MBq) was adjusted to pH 3.5 with sodium acetate (0.8 M). Each compound (9–12 nmol; **3** and **4** as TFA salts; **5–7** as triethylammonium salts) was added and incubated under agitation at 40 °C for 10 min. The products were purified on a C<sub>18</sub> Sep-Pack cartridge (Waters, Milford, MA), eluted using 800 µL of 80% ethanol in the second reactor, and subsequently evaporated at 70 °C under an argon flow. The final products were diluted with 9 mg/mL sodium chloride (NaCl). HPLC quality control was performed using a reverse phase column (Discovery Bio, 5 µm, 300 Å, Supelco) on a Waters Breeze System equipped with a 1525 binary pump. Radioactivity was detected with a Berthold radio-HPLC detector (A being H<sub>2</sub>O with 0.1% TFA and B being MeCN with 0.1% TFA with the following gradient program: 17% to 80% B in 15 min, at a flow rate of 2 mL/ min). The tracers were dissolved in a saline solution (9 mg/mL NaCl) before injection.

## II.8. Cell culture and animal models

Human pancreatic adenocarcinoma cell line AsPC-1 (ATCC, Rockville, MD) was cultured in RPMI-1640 medium with 10% fetal bovine serum (FBS) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

All animal experiments were carried out in compliance with the French laws relating to the conduct of animal experimentation. The subcutaneous AsPC-1 tumors were developed by injection of  $5 \times 10^6$  cells in a 1/1 mixture of matrigel (BD Biosciences) in the right shoulder of female immunodeficient mice (Nu/nu, Charles River) (5–6 weeks old). Animals were subjected to further imaging experiments when the tumors grew to at least 3 mm in diameter.

## II.9. Small animal PET imaging and biodistribution studies

Healthy female adult Nu/nu mice were weighed and intravenously injected *via* the retro-orbital sinus with  $3.49 \pm 2.71$  MBq of each radiotracer based on a consistent number of picomoles being injected. Dynamic PET imaging was performed immediately p.i. using the Mosaic HP Small Animal Imager (Philips) for 70 min with  $4 \times 2$  min,  $2 \times 5$  min frames with 1 min between each sinogram followed by  $3 \times 10$  min frames. The animals were kept under anesthesia using 1.5% isoflurane from the time of administration of  $^{68}\text{Ga}$ -labeled compounds until the end of imaging. All sinograms were reconstructed in three-dimensional standardized uptake value (SUV) images and visualized as maximum intensity projection (MIP). Processing of reconstructed images was performed with the Syntegra–Philips software (PETView; Philips Medical Systems).

Static PET images were acquired 40 min p.i. for 15 min. After imaging, 1 h p.i. of  $^{68}\text{Ga}$ –Ga-5,  $^{68}\text{Ga}$ –Ga-6, and  $^{68}\text{Ga}$ –Ga-7 ( $553 \pm 145$  pmol,  $3.17 \pm 0.92$  MBq), mice were sacrificed and the main organs and tissues were dissected, washed, weighed, and  $\gamma$ -counted (1480 Wizard 3, PerkinElmer). Tumor or tissue uptake was expressed as mean  $\pm$  SD percentage injected dose per gram (%ID/g), corrected for radionuclide decay.

(Top) *Ex vivo* biodistribution of  $^{68}\text{Ga}$ –Ga-5,  $^{68}\text{Ga}$ –Ga-6,  $^{68}\text{Ga}$ –Ga-7 and  $^{68}\text{Ga}$ –Ga-DOTA-NT-20.3. Values are expressed as the percentage of injected dose per gram of tissue (%ID/g  $\pm$  SD). (Bottom) Tumor-to-organ ratios from the *ex vivo* biodistribution. <sup>a</sup>Values are derived from Prignon et al., *Mol. Pharmaceutics* **2019**, *16*, 2776-2784.

	$^{68}\text{Ga}$ –Ga-5	$^{68}\text{Ga}$ –Ga-6	$^{68}\text{Ga}$ –Ga-7	$^{68}\text{Ga}$ –Ga-DOTA-NT-20.3 <sup>a</sup>
Uptake (%ID/g)	n = 3	n = 3	n = 3	n = 4
Blood	$0.450 \pm 0.361$	$0.283 \pm 0.097$	$0.317 \pm 0.091$	$0.99 \pm 0.44$
Heart	$0.313 \pm 0.176$	$0.210 \pm 0.061$	$0.198 \pm 0.025$	$0.52 \pm 0.10$
Lung	$0.397 \pm 0.083$	$0.217 \pm 0.126$	$0.307 \pm 0.141$	$0.68 \pm 0.16$
Spleen	$0.337 \pm 0.035$	$0.203 \pm 0.047$	$0.518 \pm 0.525$	$0.34 \pm 0.07$
Liver	$0.240 \pm 0.036$	$0.303 \pm 0.031$	$0.142 \pm 0.054$	$0.31 \pm 0.09$
Kidneys	$17.490 \pm 1.129$	$16.690 \pm 3.528$	$17.409 \pm 5.068$	$5.38 \pm 0.54$
Pancreas	$0.187 \pm 0.025$	$0.090 \pm 0.017$	$0.137 \pm 0.036$	$0.22 \pm 0.03$
Stomach	$0.840 \pm 1.109$	$0.263 \pm 0.081$	$0.275 \pm 0.215$	$0.14 \pm 0.03$
Intestine	$0.450 \pm 0.108$	$0.377 \pm 0.146$	$0.570 \pm 0.199$	$0.53 \pm 0.08$
Colon	$0.240 \pm 0.141$	$0.110 \pm 0.056$	$0.229 \pm 0.273$	$0.41 \pm 0.23$
Muscle	$0.210 \pm 0.173$	$0.107 \pm 0.058$	$0.198 \pm 0.095$	$0.29 \pm 0.02$
Bone	$0.283 \pm 0.157$	$0.130 \pm 0.035$	$0.512 \pm 0.426$	$0.49 \pm 0.11$
Tumor	$0.947 \pm 0.257$	$2.563 \pm 0.965$	$2.976 \pm 0.497$	$5.28 \pm 0.93$

	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-5	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-6	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-7	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-DOTA-NT-20.3 <sup>a</sup>
Uptake	n = 3	n = 3	n = 3	n = 4
Tumor/Blood	3.140 ± 2.539	9.030 ± 2.525	9.881 ± 2.865	5.93 ± 1.82
Tumor/Muscle	6.130 ± 3.543	27.963 ± 9.683	18.293 ± 10.386	18.21 ± 4.01
Tumor/Kidneys	0.05 ± 0.02	0.17 ± 0.08	0.18 ± 0.06	1 ± 0.26
Tumor/Pancreas	5.103 ± 1.621	28.340 ± 10.394	23.805 ± 11.700	24.56 ± 6.18

## II.10. Near-Infrared Fluorescence Imaging

First, 50 pmol, 500 pmol, or 5 nmol of **6** was injected intravenously, in a 0.1 mL volume, in mice bearing subcutaneous AsPC-1 tumors. After 1, 3, or 24 h p.i., optical imaging was conducted *in vivo*, *post mortem* with the skin above the tumor removed, and *ex vivo* on dissected tumors and organs using an IVIS Lumina system (PerkinElmer) with the following settings: 640 ex/680 em (Cy5.5) and 1 s exposure time. Living Image Software (IVIS Imaging Systems, PerkinElmer) was used to display fluorescence/visible light overlays and to measure average radiant efficiencies  $[(p/s/cm^2/sr)/(\mu W/cm^2)]$  on isolated organs.

Summary table of fluorescence signals measured from the images of *ex vivo* organs, 1 h, 3 h, 24 h post injection of 50 pmol, 500 pmol or 5 nmol of **6**. Values are expressed as the average radiant efficiency for each organ  $[(p/s/cm^2/sr) / [\mu W/cm^2)]$ .

Tumor	Injected Dose	1 h	3 h	24 h
	50 pmol	1.62 <sup>E7</sup>	-	-
	500 pmol	3.90 <sup>E7</sup> ± 6.58 <sup>E6</sup>	3.77 <sup>E7</sup>	1.41 <sup>E7</sup>
	5 nmol	2.44 <sup>E8</sup> ± 6.86 <sup>E6</sup>	1.5 <sup>E8</sup>	9.98 <sup>E6</sup>

Muscle	Injected Dose	1 h	3 h	24 h
	50 pmol	6.97 <sup>E6</sup>	-	-
	500 pmol	8.09 <sup>E6</sup> ± 2.04 <sup>E6</sup>	5.83 <sup>E6</sup>	7.44 <sup>E6</sup>
	5 nmol	1.68 <sup>E7</sup> ± 1.61 <sup>E6</sup>	9.98 <sup>E6</sup>	1.32 <sup>E7</sup>

Pancreas	Injected Dose	1 h	3 h	24 h
	50 pmol	7.68 <sup>E6</sup>	-	-
	500 pmol	8.40 <sup>E6</sup> ± 2.46 <sup>E5</sup>	7.72 <sup>E6</sup>	6.62 <sup>E6</sup>
	5 nmol	1.60 <sup>E7</sup> ± 2.83 <sup>E5</sup>	1.45 <sup>E7</sup>	1.15 <sup>E7</sup>

Kidneys	Injected Dose	1 h	3 h	24 h
	50 pmol	2.44 <sup>E7</sup>	-	-
	500 pmol	8.44 <sup>E7</sup> ± 1.70 <sup>E7</sup>	1.16 <sup>E8</sup>	6.99 <sup>E7</sup>
	5 nmol	4.90 <sup>E8</sup> ± 6.72 <sup>E7</sup>	5.53 <sup>E8</sup>	7.47 <sup>E8</sup>

Ratio Tumor/Muscle	Injected Dose	1 h	3 h	24 h
	50 pmol	2.33	-	-
	500 pmol	4.87 ± 0.42	6.46	1.90
	5 nmol	12.64 ± 0.96	15.02	2.96

Ratio Tumor/Pancreas	Injected Dose	1 h	3 h	24 h
	50 pmol	2.11	-	-
	500 pmol	4.63 ± 0.65	4.88	2.14
	5 nmol	15.27 ± 0.16	10.30	3.40

## II.11. Fluorescence-Guided Surgery

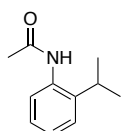
The Kaer Imaging System (KIS) 650 (KaerLabs, Nantes, France) was used for fluorescence real-time imaging during the postmortem dissection of the tumor. The system has an open design that allows for simultaneous surgery and imaging (open fluorescence). Laser excitation was applied at a wavelength of 640 nm, and fluorescence emission was collected with a high-pass filter with a cutoff frequency of 665 nm. Sequences were saved as series of tiff images with raw data to allow for quantification, before they were exported as movies for illustration. For each fluorescence image, an image with the laser off was subtracted from the fluorescence signal, to increase the sensitivity and robustness to ambient light. All images (raw fluorescence, background, subtracted images, and overlay color images) were displayed in real time and saved.

## III. Chapter 2 – Experimental part

### III.1. Synthesis and characterization of compound 8 to 20

#### III.1.1. Synthesis of synthon A

##### Compound 8, 2-isopropylacetanilide



A solution containing 2-isopropylaniline (5 mL, 35.3 mmol, 1 equiv.) and toluene (48 mL) was cooled in an ice bath. Acetic anhydride (3.52 mL, 37.1 mmol, 1.05 equiv.) was added slowly. After stirring for 45 minutes at RT, the reaction medium was evaporated. The red oil obtained was then taken up with petroleum ether (15 mL). The white precipitate formed was filtered and dried under vacuum to give a white solid (5.83 g, 93%, purity >99%).

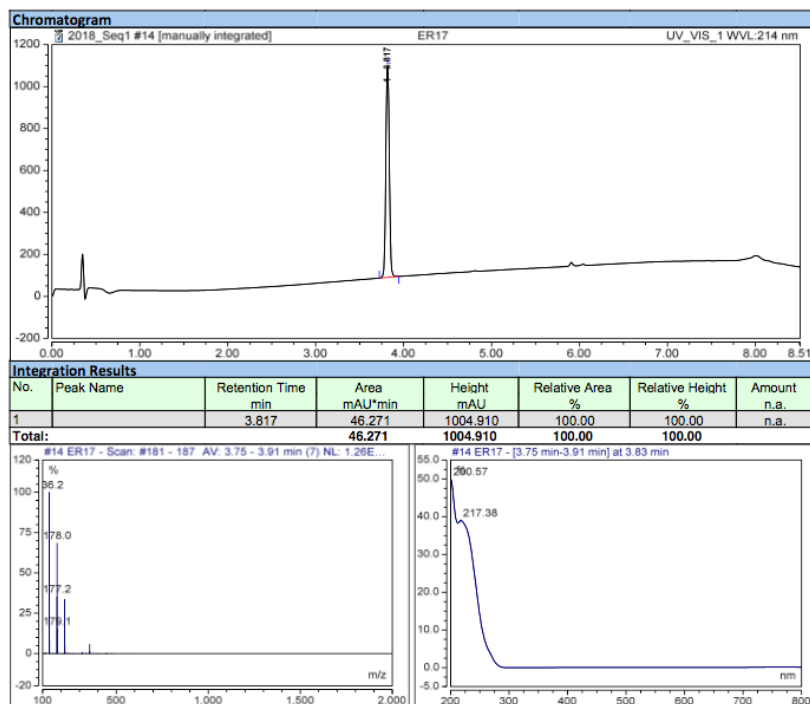
RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.82$  min.,  $m/z$  calculated for  $C_{11}H_{15}NO$   $[M+H]^+$  178.1, found 178.0.

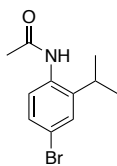
$R_f$  ( $CH_2Cl_2/MeOH$ , 98/2) = 0.26.

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 1.25$  (d,  $J=6.8$  Hz, 6H), 2.2 (s, 3H), 3.05 (hept,  $J=6.8$  Hz, 1H), 7-7.3 (m, 4H), 7.6 (m, 1H) ppm;  $^{13}C$ -NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 23.2$  ( $CH_3$ ), 24.3 ( $CH_3$ ), 28.1 (CH), 125.4 (CH), 125.8 (CH), 126.4 (CH), 126.5 (CH), 134.1 (C), 141.1 (C), 168.9 (C) ppm.

mp: 72 °C.

RP-HPLC-MS analysis of 8:



**Compound 9, 4-Bromo-2-isopropylacetanilide**

A solution of *N*-bromo succinimide (7.53 g, 42.3 mmol, 1.5 equiv.) in DMF (14 mL) was added dropwise over 45 minutes to a solution of 2-isopropylacetanilide (**8**) (5 g, 28.2 mmol, 1 equiv.) in DMF (14 mL). The mixture was stirred at RT overnight. The reaction mixture was evaporated to obtain a yellow oil, extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, washed with acidic water, brine and dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvent was evaporated to give a yellow solid, which was purified by flash-column chromatography (A: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, B: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1; with the following gradient program: 0% to 40% of B in 25 CV). A white solid (4.62 g, 64%, purity: 91%) was obtained.

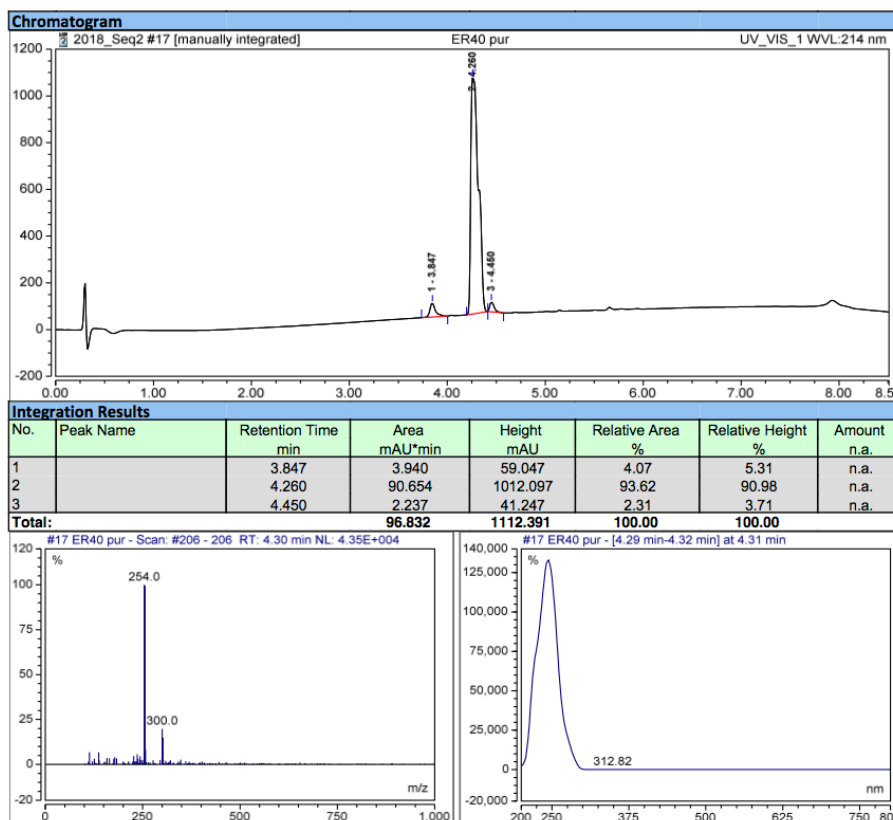
RP-HPLC-MS:  $t_r = 4.26$  min.,  $m/z$  calculated for C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>BrNO [M-H]<sup>-</sup> 254.0, found 254.0.

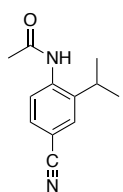
$R_f$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 98/2) = 0.32.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.23$  (d,  $J=6.8$  Hz, 6H), 2.19 (s, 3H), 2.98 (hept,  $J=6.8$  Hz, 1H), 7.00 (br, 1H), 7.30 (d,  $J=8.5$  Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.53 (d,  $J=8.5$  Hz, 1H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 23.0$  (CH<sub>3</sub>), 24.3 (CH<sub>3</sub>), 28.2 (CH), 119.7 (C), 126.8 (CH), 129.0 (CH), 129.6 (CH), 133.2 (C), 143.0 (C), 168.8 (C) ppm.

mp: 132 °C.

RP-HPLC-MS analysis of **9**:



**Compound 10, 4-Cyano-2-isopropylacetanilide**

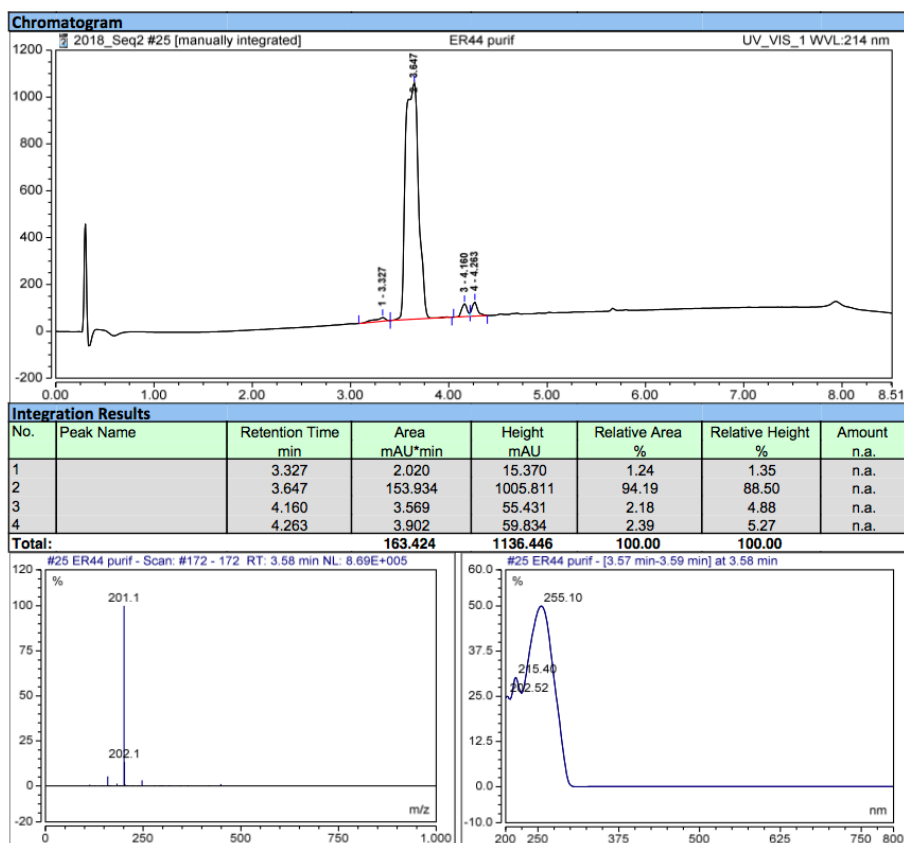
A mixture of 4-bromo-2-isopropylacetanilide (**9**) (4.8 g, 18.74 mmol, 1 equiv.), DMF (22.5 mL), cuprous cyanide (2.51 g, 28.1 mmol, 1.5 equiv.) and water (0.370 mL) was stirred under reflux overnight. After cooling, the reaction medium was concentrated under vacuum and water (58 mL) was added to the mixture under stirring. The precipitate was filtered off, rinsed with water and dried under vacuum. The grey/brown solid was purified by flash-column chromatography (A: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, B: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1; with the following gradient program: 0% to 40% of B in 25 CV). A white solid (1.23 g, 33%, purity: 95%) was obtained.

RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.65$  min.,  $m/z$  calculated for C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O [M-H]<sup>-</sup> 201.1, found 201.1.

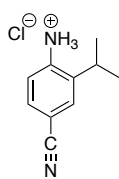
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.28$  (d, J=6.8 Hz, 6H), 2.24 (s, 3H), 3.01 (hept, J=6.8 Hz, 1H), 7.25 (br, 1H), 7.49 (d, J=8.5 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 8.08 (d, J=8.5 Hz, 1H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 22.6$  (CH<sub>3</sub>), 24.7 (CH<sub>3</sub>), 27.8 (CH), 108.4 (C), 119.1 (C), 123.4 (CH), 129.8 (CH), 130.5 (CH), 138.5 (C), 168.4 (C) ppm.

mp: 139 °C.

RP-HPLC-MS analysis of **10**:





**Compound 11, 4-Cyano-2-isopropylaniline hydrochloride**

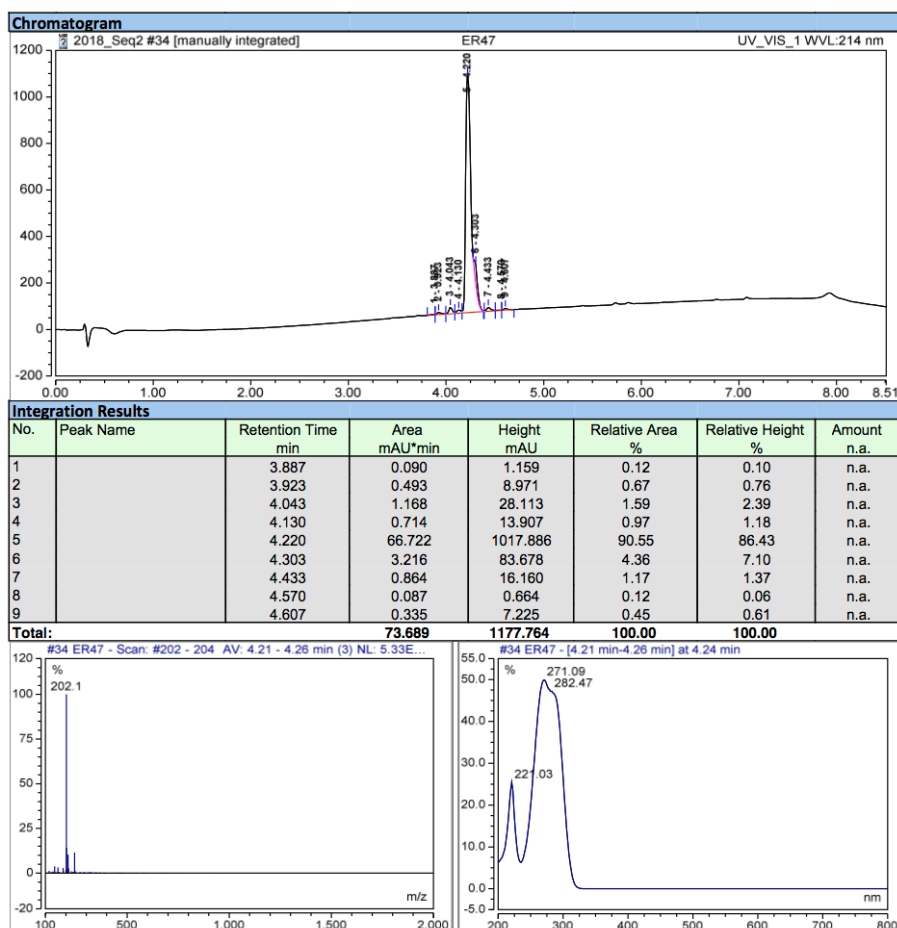
A mixture of 4-cyano-2-isopropylacetanilide (**10**) (2.5 g, 15.3 mmol, 1 equiv.), absolute ethanol (12 mL) and 1N HCl (12 mL) was stirred under reflux for three days. A solution of 10% NaOH (7 mL) was added to reach a pH of 10. The reaction medium was extracted three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, the organic layers were combined, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The orange oil obtained was dissolved in diethylether (36 mL) and 1M ethereal hydrogen chloride (10 mL) was added. The white precipitate was filtered off and rinsed with diethylether to give the expected product (2.21 g, 74%, purity: 91%).

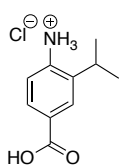
RP-HPLC-MS:  $t_r = 4.22$  min.,  $m/z$  calculated for C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 202.3, found 202.1.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta = 1.14$  (d, J=6.8 Hz, 6H), 2.96 (hept, J=6.8 Hz, 1H), 6.72 (d, J=8.3 Hz, 1H), 7.28 (d, J=8.3 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta = 22.4$  (CH<sub>3</sub>), 26.7 (C), 107.4 (C), 115.1 (C), 121.3 (CH), 129.7 (CH), 131.1 (CH) ppm.

mp: 186 °C.

RP-HPLC-MS analysis of **11**:



**Compound 12, 4-amino-3-isopropylbenzoic acid hydrochloride**

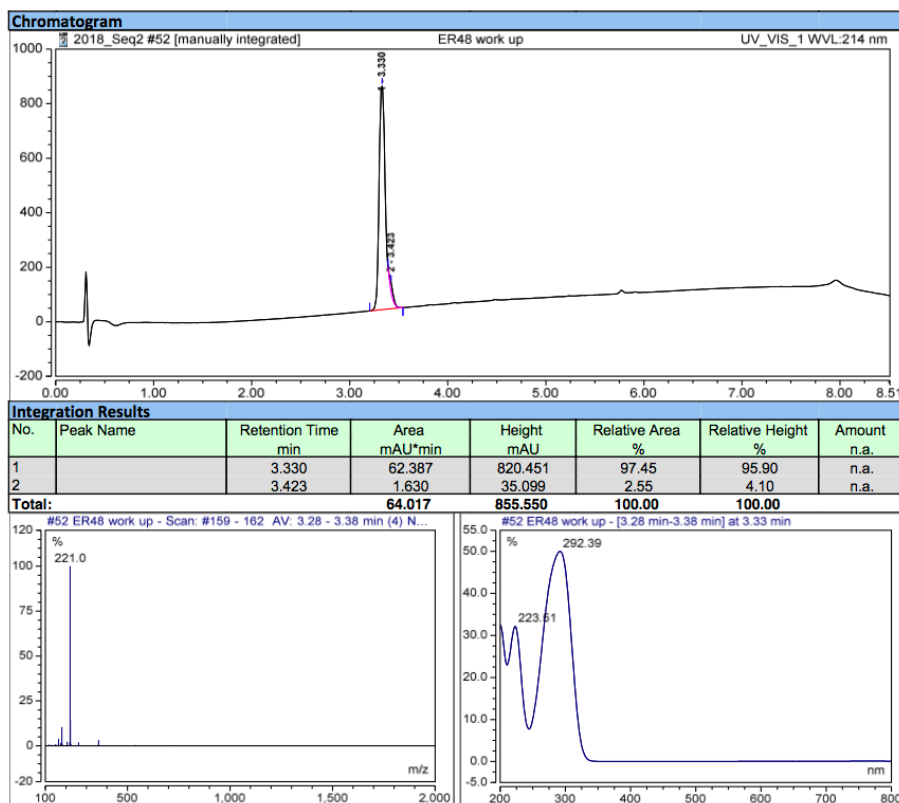
A solution of potassium hydroxide (16.8 g, 0.3 mol, 20 equiv.), water (18 mL) and 1,2-dimethoxyethane (1.5 mL) was added to 4-cyano-2-isopropylaniline hydrochloride (**11**) (3.0 g, 15.0 mmol, 1 equiv.). The mixture was heated to reflux for three days. After cooling, concentrated HCl (12 mL) was added to reach a pH of 1 and the mixture was then extracted three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layers were combined, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to yield an orange solid (2.42 g, 75%, purity: 97%).

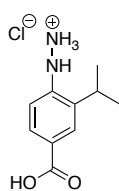
RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.33$  min.,  $m/z$  calculated for C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub> [M+H+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 221.1, found 221.0.  $R_f$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 98/2) = 0.3.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.30$  (d,  $J=6.8$  Hz, 6H), 2.85 (hept,  $J=6.8$  Hz, 1H), 6.66 (d,  $J=8.3$  Hz, 1H), 7.80 (dd,  $J=8.3, 1.9$  Hz, 1H), 7.92 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 22.1$  (CH<sub>3</sub>), 27.8 (CH), 114.7 (CH), 119.1 (C), 128.5 (CH), 129.8 (CH), 131.4 (C), 148.9 (C), 172.5 (C) ppm.

mp: 130 °C.

RP-HPLC-MS analysis of **12**:



**Synthon A, 3-isopropyl-4-hydrazinobenzoic acid hydrochloride**

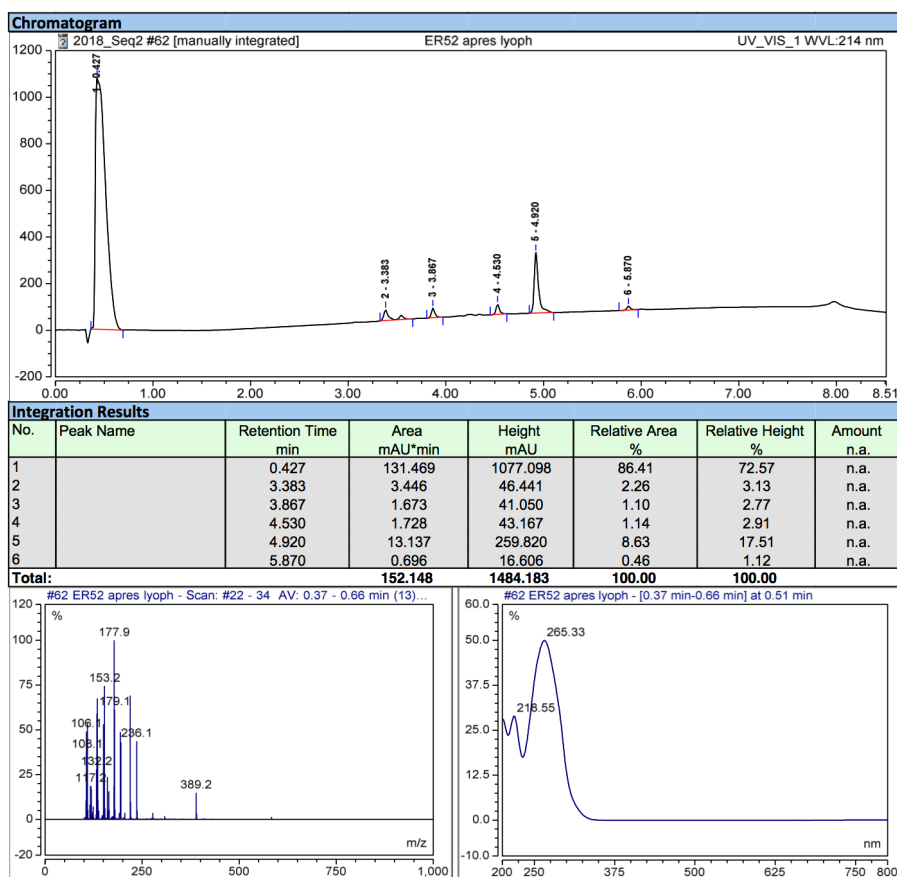
A solution of concentrated HCl (25 mL) and AcOH (22 mL) was added to 4-amino-3-isopropylbenzoic acid hydrochloride (**12**) (1.3 g, 6.0 mmol, 1 equiv.). The mixture was cooled to -5 °C and a solution of NaNO<sub>2</sub> (0.62 g, 9.0 mmol, 1.5 equiv.) in water (4.5 mL) was added dropwise over 10 minutes. The mixture was stirred at 0 °C for 3 h and then cooled to -10 °C. A solution of stannous chloride dihydrate (4.11 g, 18.0 mmol, 3.1 equiv.) in concentrated HCl (4.5 mL) was added slowly. The temperature was allowed to rise to RT and the precipitate formed was filtered off after 2 h and rinsed with 1M HCl (5 mL). A yellowish powder (1.29 g, 93%, purity: 89%) was obtained after drying over P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

RP-HPLC-MS:  $t_r$  = 0.4 min.,  $m/z$  calculated for C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [2M+H]<sup>+</sup> 389.2, found 389.2.

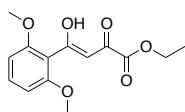
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 1.19 (d, J=6.8 Hz, 6H), 3.14 (hept, J=6.8 Hz, 1H), 6.98 (d, J=8.4 Hz, 1H), 7.76 (d, J=8.4 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 8.31 (br, 1H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 22.9 (CH<sub>3</sub>), 26.5 (CH), 112.6 (CH), 124.0 (C), 127.0 (CH), 128.5 (CH), 134.7 (C), 146.1 (C), 167.6 (C) ppm.

mp: 245 °C.

RP-HPLC-MS analysis of synthon A:



## III.1.2. Synthesis of synthon B

**Synthon B, Ethyl-4-(2,6-dimethoxyphenyl)-4-hydroxy-2-oxobut-3-enoate**

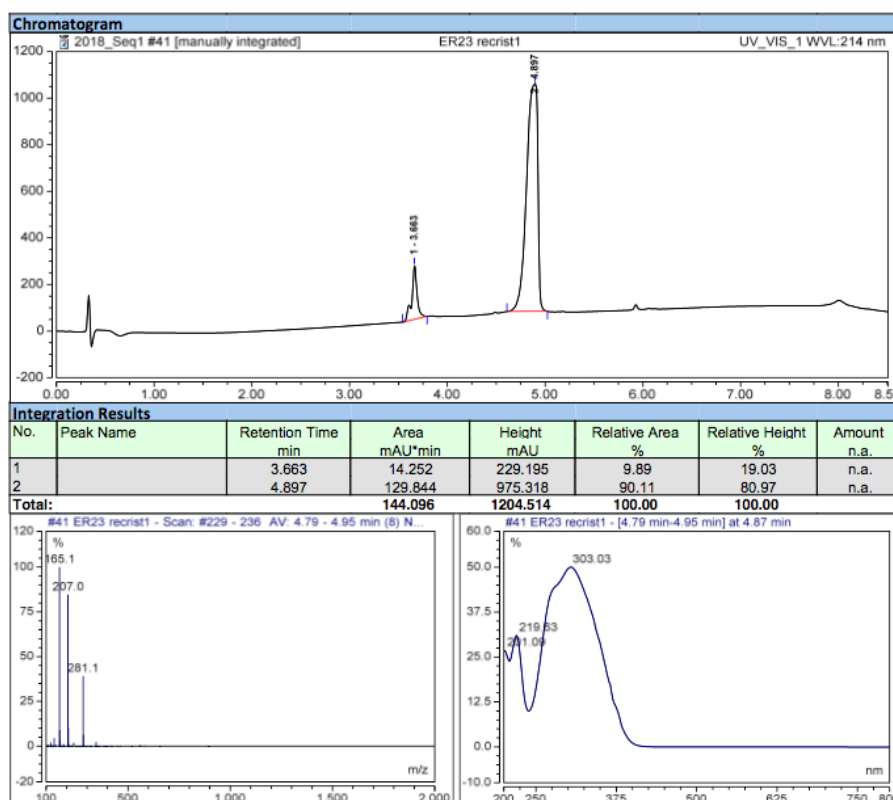
Sodium hydride 60% (0.40 g, 9.96 mmol, 1.2 equiv.) was added to a solution of diethyl oxalate (1.36 g, 9.96 mmol, 1.2 equiv.) in DMF (5 mL) and the mixture was stirred for 5 minutes. A solution of 2,6-dimethoxyacetophenone (1.5 g, 8.3 mmol, 1 equiv.) in DMF (5 mL) was slowly added over 15 minutes. The mixture was then stirred at RT overnight. The reaction medium was extracted with EtOAc three times, ensuring the pH remained below 6 between each extraction. The organic layers were combined, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. Following recrystallization from EtOH, a yellowish powder (1.7 g, 73%, purity: 90%) was obtained.

RP-HPLC-MS:  $t_r$  = 4.90 min.,  $m/z$  calculated for C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 281.1, found 281.1.

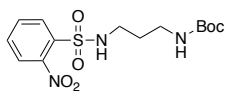
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.37 (t, J=7.1 Hz, 3H), 3.82 (s, 6H), 4.35 (q, J=7.1 Hz, 2H), 6.59 (d, J=8.4 Hz, 2H), 6.61 (s, 1H), 7.34 (t, J=8.4 Hz, 1H), 14.33 (br 1H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 14.2 (CH<sub>3</sub>), 56.2 (CH<sub>3</sub>), 62.5 (CH<sub>2</sub>), 104.2 (CH), 106.4 (CH), 117.2 (C), 132.4 (CH), 158.0 (C), 162.6 (C), 163.9 (C), 195.9 (C) ppm.

mp: 103 °C.

RP-HPLC-MS analysis of synthon B:



## III.1.3. Synthesis of synthon C

**Compound 13, tert-butyl (3-((2-nitrophenyl)sulfonamido)propyl)-carbamate**

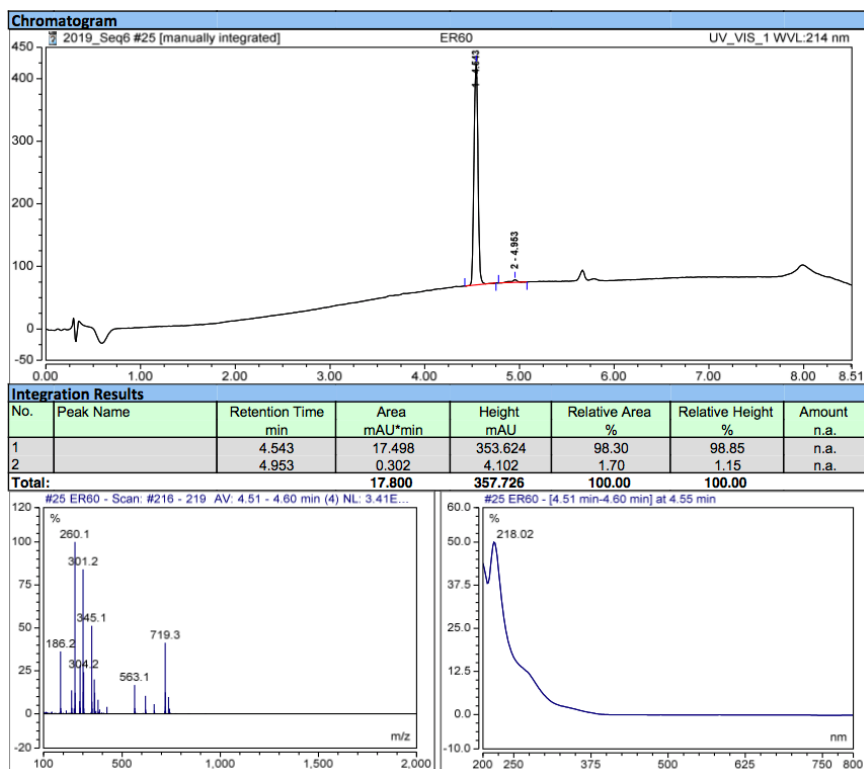
A solution of *N*-Boc-1,3-propanediamine (0.5 g, 2.87 mmol, 1 equiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) and triethylamine (0.4 mL, 2.87 mmol, 1 equiv.) was cooled in an ice-water bath. 2-nitrobenzenesulfonyl chloride (0.636 g, 2.87 mmol, 1 equiv.) was added over a period of 5 min. After 5 min, the ice bath was removed and the reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 15 min. The reaction mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and washed three times with a solution of citric acid (pH = 3). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum. The yellowish oil was purified by flash-column chromatography (A: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, B: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1; with the following gradient program: 100% to 0% of A in 20 CV). An oil, which crystallizes, was obtained (0.942 g, 90%, purity: 98%).

RP-HPLC-MS:  $t_r$  = 4.46 min,  $m/z$  calculated for C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 360.1, found 260.1 [M-Boc+H]<sup>+</sup>

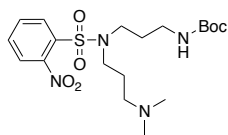
$R_f$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9/1) = 0.68.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.42 (s, 9H), 1.69 (quint,  $J$ =6.4 Hz, 2H), 3.15 (q,  $J$ =6.4 Hz, 2H), 3.21 (q,  $J$ =6.4 Hz, 2H), 4.67 (br, 1H), 5.87 (br, 1H), 7.72 (m, 2H), 7.84 (m, 1H), 8.16 (m, 1H) ppm;  
<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 28.4 (CH<sub>3</sub>), 30.6 (CH<sub>2</sub>), 37.2 (CH<sub>2</sub>), 40.8 (CH<sub>2</sub>), 125.3 (CH), 130.9 (CH), 132.7 (CH), 133.4 (CH) ppm. (Note: three quaternary carbons not detected).

RP-HPLC-MS analysis of **13**:



**Compound 14, *tert*-butyl (3-((N-(3-(dimethylamino)propyl)-2-nitrophenyl)sulfonamido)propyl)carbamate**

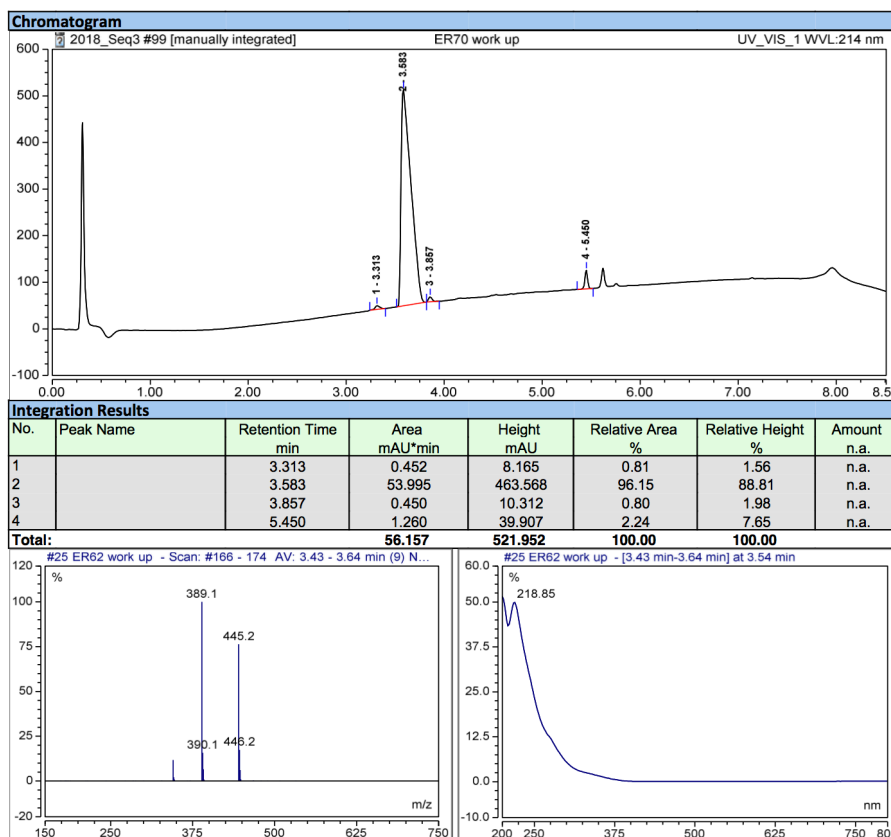


To a solution of *tert*-butyl (3-((2-nitrophenyl)sulfonamido)propyl)carbamate (**13**) (0.94 g, 2.6 mmol, 1 equiv.) in DMF (10 mL) was added  $K_2CO_3$  (1.08 g, 7.8 mmol, 3 equiv.). To the stirred suspension was added 3-dimethylamino-1-propyl hydrochloride (0.45 g, 2.86 mmol, 1.1 equiv.) over a period of 5 min. The resulting suspension was heated to 60 °C overnight. The reaction mixture was cooled to RT, diluted with water (50 mL), and extracted three times with  $CH_2Cl_2$ . The organic layers were combined, washed with brine, dried over  $MgSO_4$ , filtered and concentrated under vacuum. A yellowish oil (1.15 g, 99%, purity: 96%) was obtained.

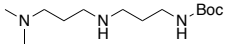
RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.6$  min,  $m/z$  calculated for  $C_{19}H_{32}N_4O_6S$   $[M+H]^+$  445.2, found 445.2.

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 1.41$  (s, 9H), 1.66 (quint,  $J=6.9$  Hz, 2H), 1.74 (quint,  $J=6.9$  Hz, 2H), 2.13 (s, 6H), 2.19 (t,  $J=7.0$  Hz, 2H), 3.14 (m, 2H), 3.32 (t,  $J=7.4$  Hz, 2H), 3.36 (t,  $J=7.4$  Hz, 2H), 4.91 (br, 1H), 7.62 (m, 2H), 7.98 (m, 2H) ppm;  $^{13}C$ -NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 26.5$  ( $CH_2$ ), 28.4 ( $CH_3$ ), 37.3 ( $CH_2$ ), 45.3 ( $CH_2$ ), 45.4 ( $CH_3$ ), 45.9 ( $CH_2$ ), 56.5 ( $CH_2$ ), 79.2 (C), 124.2 (CH), 130.6 (CH), 131.7 (CH), 133.4 (CH), 133.5 (C), 148.1 (C), 156.0 (C) ppm.

**RP-HPLC-MS analysis of 14:**



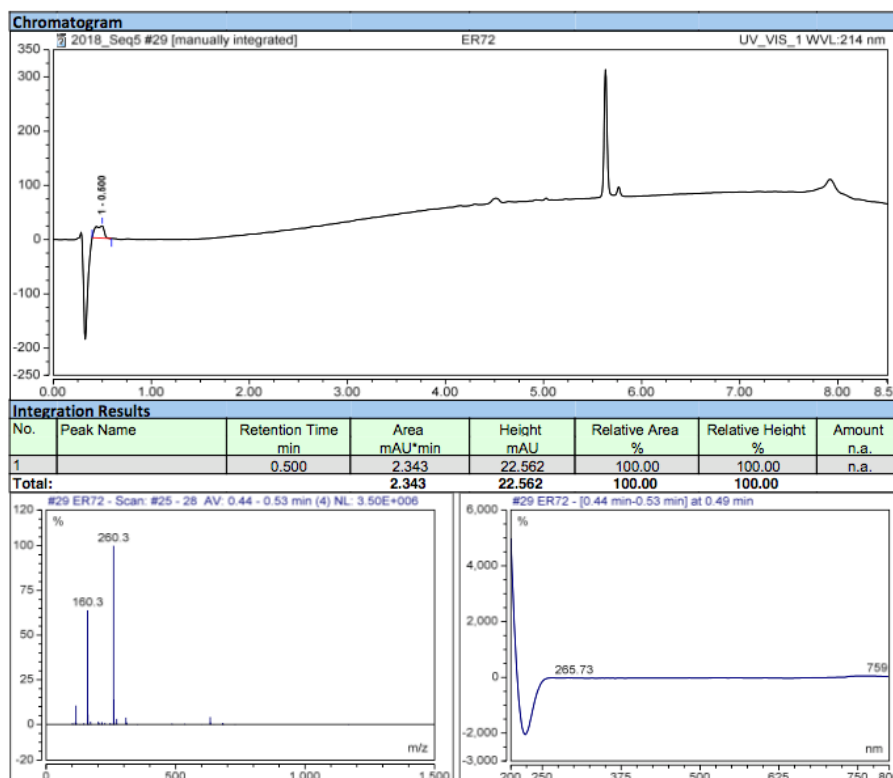
**Synthon C, *tert*-butyl (3-((3-(dimethylamino)propyl)amino)propyl)-carbamate**

 To a solution of *tert*-butyl (3-((N-(3-(dimethylamino)propyl)-2-nitrophenyl)sulfonamido)propyl)carbamate (**14**) (1.1 g, 2.5 mmol, 1 equiv.) in DMF (10 mL) was added cesium carbonate (3.3 g, 10 mmol, 4 equiv.). Thiophenol (0.51 mL, 5 mmol, 2 equiv.) was then added to the suspension and the reaction mixture was stirred at 40 °C for 5 h. The reaction medium was extracted in a solution of citric acid (pH = 3) and washed three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. After basification with a solution of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, the compound was extracted four times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layers were combined, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum. The yellowish oil was purified by semi-preparative HPLC on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA; with the following gradient program: 0% of B for 10 min, 0% to 40% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min) to obtain a white solid as 3 TFA salt (0.681 g, 56%).

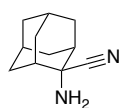
RP-HPLC-MS:  $t_r$  = injection peak,  $m/z$  calculated for C<sub>13</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 260.2, found 260.3.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 1.38 (s, 9H), 1.70 (quint, J=7.8 Hz, 2H), 1.95 (quint, J=7.8 Hz, 2H), 2.78 (s, 6H), 2.89 (m, 2H), 2.96 (m, 2H), 2.99 (m, 2H), 3.11 (m, 2H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 21.3 (CH<sub>2</sub>), 26.7 (CH<sub>2</sub>), 28.8 (CH<sub>3</sub>), 37.5 (CH<sub>2</sub>), 42.7 (CH<sub>2</sub>), 44.3 (CH<sub>3</sub>), 45.2 (CH<sub>2</sub>), 54.2 (CH<sub>2</sub>), 78.3 (C) ppm. (Note: one quaternary carbon not detected).

RP-HPLC-MS analysis of synthon C:



## III.1.4. Synthesis of synthon D

**Compound 15, 2-aminoadamantane-2-carbonitrile**

A mixture of 2-adamantanone (2 g, 13.3 mmol, 1 equiv.), NaCN (0.784 g, 16 mmol, 1.2 equiv.), aqueous ammonia 25% solution (2.4 mL) and ammonium chloride (1.423 g, 26.6 mmol, 2 equiv.) was dissolved in water (12 mL) and EtOH (24 mL). The resulting solution was stirred at 50 °C overnight. The solution was cooled to RT, extracted with Et<sub>2</sub>O (120 mL) and concentrated. The white solid obtained was then purified on a silica plug (heptane/EtOAc 7:3). A white powder (2.16 g, 92%) was obtained.

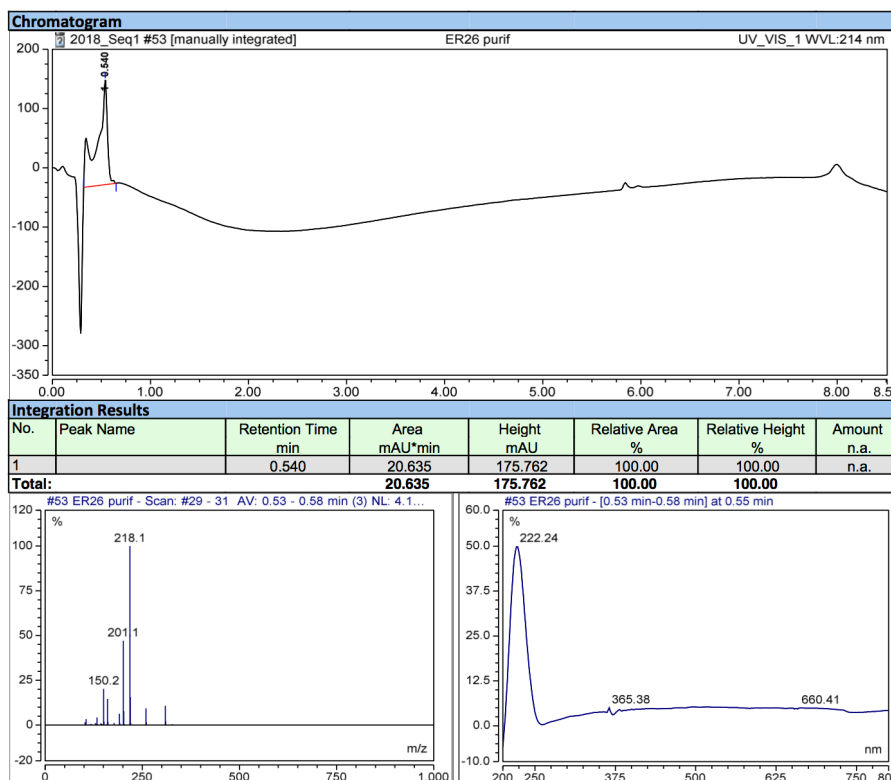
RP-HPLC-MS:  $t_r = 0.5$  min.,  $m/z$  calculated for C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub> [M+H+ACN]<sup>+</sup> 218.1, found 218.1.

R<sub>f</sub> (heptane/EtOAc, 7/3) = 0.4.

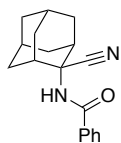
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.54$  (m, 1H), 1.70 (m, 1H), 1.72 (m, 1H), 1.76 (m, 1H), 1.84 (m, 1H), 1.87 (m, 1H), 1.90 (m, 1H), 1.93 (m, 1H), 1.96 (m, 1H), 1.98 (m, 1H), 2.06 (m, 1H), 2.14 (m, 1H), 2.23 (d, 1H), 2.51 (m, 1H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 26.5$  (CH), 26.8 (CH), 27.5 (CH), 30.3 (CH<sub>2</sub>), 35.0 (CH<sub>2</sub>), 36.4 (CH<sub>2</sub>), 36.6 (CH), 37.6 (CH<sub>2</sub>), 39.3 (CH<sub>2</sub>), 56.4 (C), 125.5 (C) ppm.

mp: 186 °C.

RP-HPLC-MS analysis of **15**:





**Compound 16, N-(2-cyanoadamantan-2-yl)benzamide**

To a solution of 2-aminoadamantane-2-carbonitrile (**15**) (1.5 g, 8.5 mmol, 1 equiv.) in THF (15 mL) was added a solution of  $K_2CO_3$  (1.78 g, 12.9 mmol, 1.52 equiv.) in water (15 mL). To the resulting solution was added dropwise, over 30 min, a solution of benzoyl chloride (1.48 mL, 12.8 mmol, 1.5 equiv.) in THF (15 mL) with vigorous stirring at RT. After 5 min, a white precipitate began to form. After a further 2 h, the white solid was isolated by filtration and dried under vacuum. The solid was purified on a silica plug ( $CH_2Cl_2/MeOH$  95:5) to obtain a white powder (1.64 g, 69%, purity: 90%).

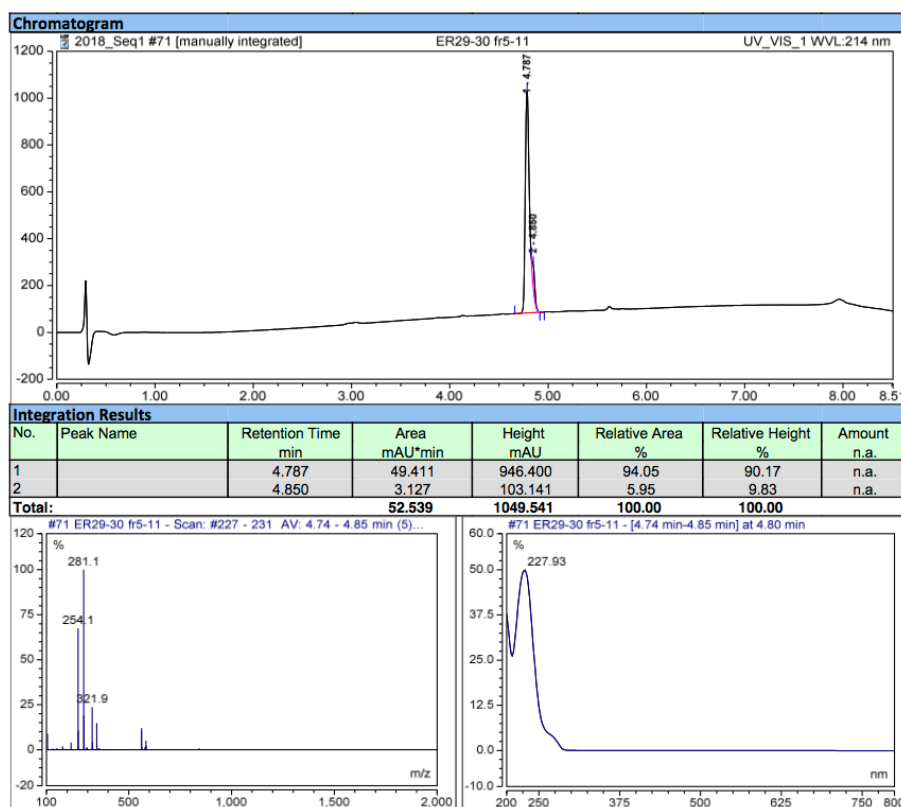
RP-HPLC-MS:  $t_r = 4.79$  min.,  $m/z$  calculated for  $C_{18}H_{20}N_2O$   $[M+H]^+$  281.2, found 281.1.

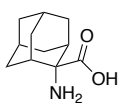
$R_f$  (heptane/EtOAc, 7/3) = 0.31.

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 1.76$  (m, 3H), 1.85-2.02 (m, 8H), 2.05 (m, 1H), 2.32 (d, 1H), 2.65 (m, 1H), 6.12 (br, 1H), 7.43 (td,  $J=8.5, 1.7$  Hz, 2H), 7.52 (tt,  $J=8.5, 1.7$  Hz, 1H), 7.77 (dt,  $J=8.5, 1.7$  Hz, 2H) ppm;  $^{13}C$ -NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 26.2$  (CH), 26.5 (CH), 27.6 ( $CH_2$ ), 31.5 ( $CH_2$ ), 33.9 (CH), 34.2 ( $CH_2$ ), 37.3 ( $CH_2$ ), 39.4 ( $CH_2$ ), 47.1 (CH), 57.3 (C), 120.2 (C), 127.2 (CH), 128.9 (CH), 132.3 (CH), 134.0 (C), 166.6 (C) ppm.

mp: 250 °C.

RP-HPLC-MS analysis of **16**:



**Compound 17, 2-aminoadamantane-2-carboxylic acid hydrochloride**

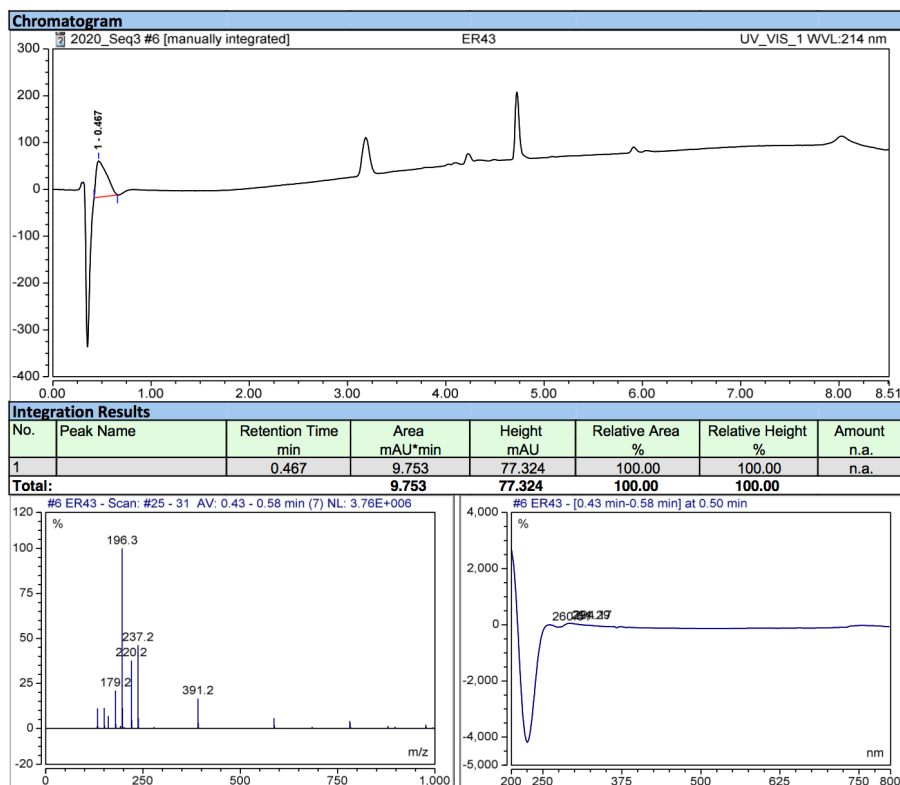
To *N*-(2-cyanoadamantan-2-yl)benzamide (**16**) (1 g, 3.6 mmol, 1 equiv.) was added acetic acid (18 mL), concentrated HCl (5 mL) and water (3 mL). The white suspension was then heated to reflux for 5 days. The reaction mixture was concentrated under vacuum to obtain a white solid which was triturated twice in hot Et<sub>2</sub>O (40 mL) and twice in hot MeCN (25 mL). A white powder (0.768 g, 92%) was obtained.

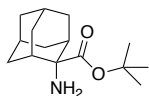
RP-HPLC-MS:  $t_r = 0.5$  min,  $m/z$  calculated for C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 196.1, found 196.3.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta = 1.6$ -2.2 (m, 14H), 8.59 (br, 2H), 13.84 (br, 1H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta = 26.2$  (CH), 31.2 (CH<sub>2</sub>), 32.2 (CH), 34.4 (CH<sub>2</sub>), 37.5 (CH<sub>2</sub>), 63.9 (C), 171.4 (C) ppm.

mp: 271 °C.

RP-HPLC-MS analysis of **17**:



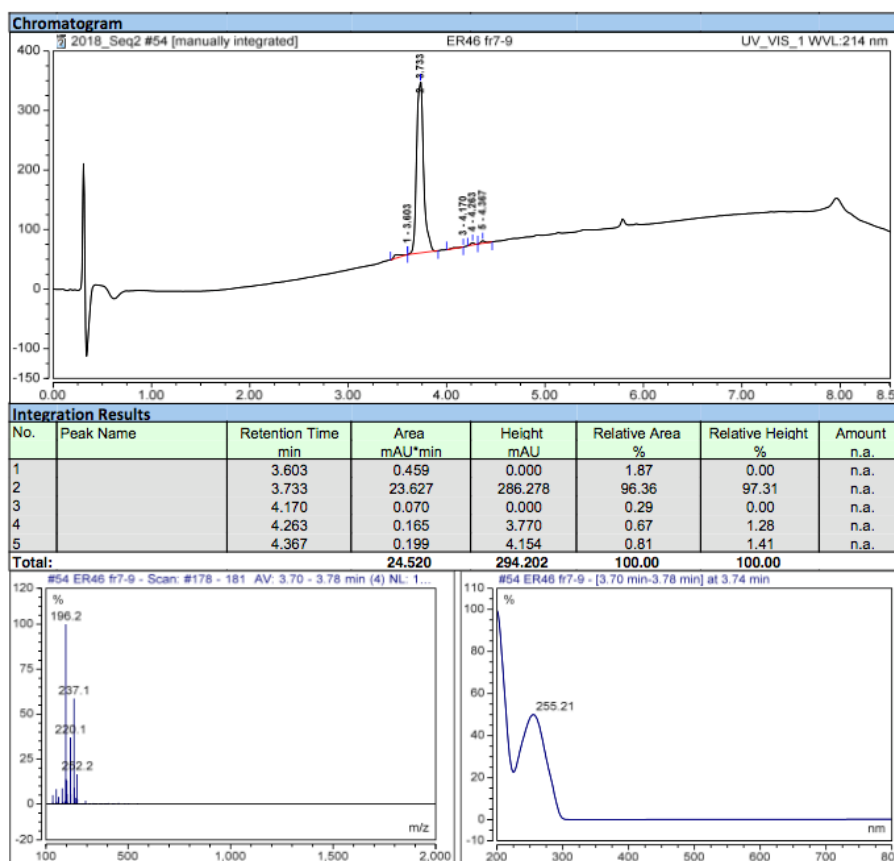
**Synthon D, *tert*-butyl-2-aminoadamantane-2-carboxylate**

A suspension of 2-aminoadamantane-2-carboxylic acid hydrochloride (**17**) (0.7 g, 3.0 mmol, 1 equiv.) in *tert*-butyl acetate (25 mL) was cooled to 0 °C. HClO<sub>4</sub> (0.42 mL, 4.8 mmol, 1.6 equiv.) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at RT overnight. 2M NaOH (40 mL) was added slowly at 0 °C to quench the reaction until the pH reached 9-10. The mixture was then extracted with EtOAc (4 × 100 mL) and washed with brine. After being dried with MgSO<sub>4</sub>, the organic layer was filtered and concentrated under vacuum to obtain a white solid, which was purified by flash-column chromatography (A: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, B: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1; with the following gradient program: 0% to 20% of B in 10 CV, 20% of B for 10 CV). A white solid (0.3 g, 40%, purity: 96%) was obtained. RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.7$  min.,  $m/z$  calculated for C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 252.2, found 252.2.

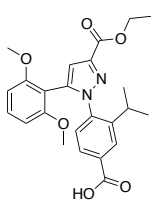
$R_f$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 98/2) = 0.34.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.35$  (m, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.47 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.69 (m, 6H), 1.97 (m, 2H), 2.15 (m, 2H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 26.9$  (CH), 27.2 (CH<sub>3</sub>), 27.9 (CH), 32.0 (CH<sub>2</sub>), 34.1 (CH), 35.1 (CH<sub>2</sub>), 37.8 (CH<sub>2</sub>), 61.8 (C), 79.9 (C), 176.0 (C) ppm.

mp: 99 °C.

**RP-HPLC-MS analysis of synthon D:**

## III.1.5. Synthesis of compound 20

**Compound 18, 4-(5-(2,6-dimethoxyphenyl)-3-(ethoxycarbonyl)-1H-pyrazol-1-yl)-3-isopropylbenzoic acid**

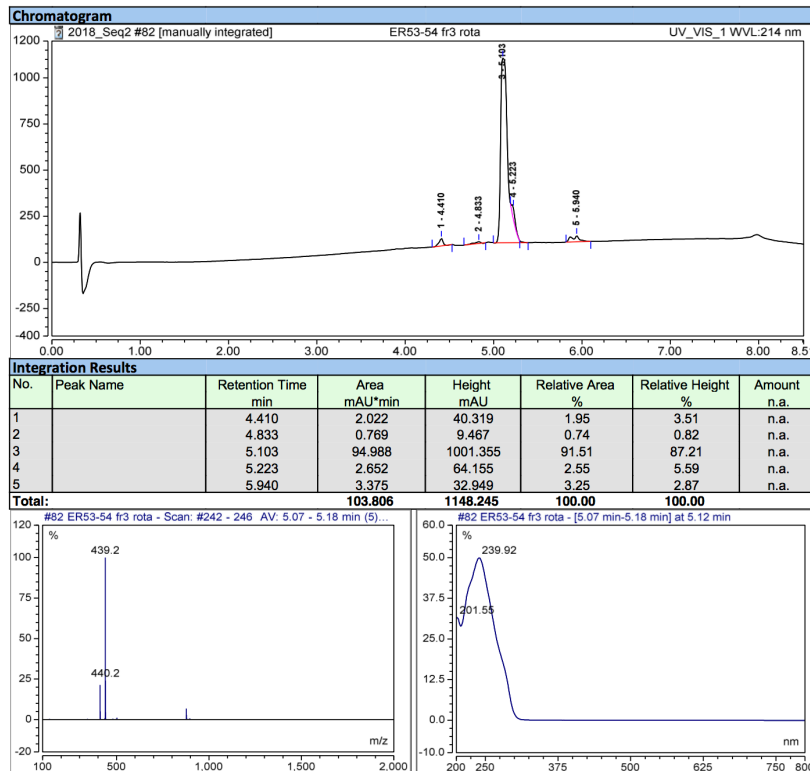
A mixture of 3-isopropyl-4-hydrazinobenzoic acid hydrochloride (**synthon A**) (0.56 g, 2.4 mmol, 1.05 equiv.) and ethyl-4-(2,6-dimethoxyphenyl)-4-hydroxy-2-oxobut-3-enoate (**synthon B**) (0.65 g, 2.3 mmol, 1 equiv.) in AcOH (8.5 mL) was stirred under reflux for 4 days. The brownish suspension was poured into 15 mL of ice-bath water and the yellow precipitate was filtered off and washed with water. The yellow solid was purified on a silica plug (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) to obtain the expected product (0.8 g, 80%, purity: 92%).

RP-HPLC-MS:  $t_r = 5.1$  min,  $m/z$  calculated for C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 439.2, found 439.2.

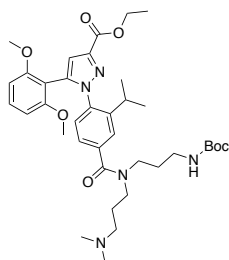
R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9/1) = 0.52.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta = 0.96$  (d, J=5.3 Hz, 6H), 1.31 (t, J=7.1 Hz, 3H), 2.65 (m, 1H), 3.61 (s, 6H), 4.31 (q, J=7.1 Hz, 2H), 6.60 (d, J=8.5 Hz, 2H), 6.83 (s, 1H), 7.28 (d, J=8.2 Hz, 1H), 7.31 (t, J=8.5 Hz, 1H), 7.76 (dd, J=8.2, 1.8 Hz, 1H), 7.85 (d, J=1.8 Hz, 1H), 13.19 (br, 1H) ppm;  
<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta = 14.7$  (CH<sub>3</sub>), 27.6 (CH<sub>3</sub>), 40.6 (CH), 56.0 (CH<sub>3</sub>), 60.8 (CH<sub>2</sub>), 104.3 (CH), 106.1 (C), 111.2 (CH), 127.0 (CH), 127.4 (CH), 128.6 (CH), 132.2 (C), 132.2 (CH), 139.2 (C), 141.2 (C), 143.7 (C), 146.0 (C), 158.4 (C), 162.2 (C), 167.1 (C) ppm.

RP-HPLC-MS analysis of **18**:



**Compound 19, ethyl 1-(4-((3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propyl)(3-(dimethylamino)propyl)carbamoyl)-2-isopropylphenyl)-5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1H-pyrazole-3-carboxylate**

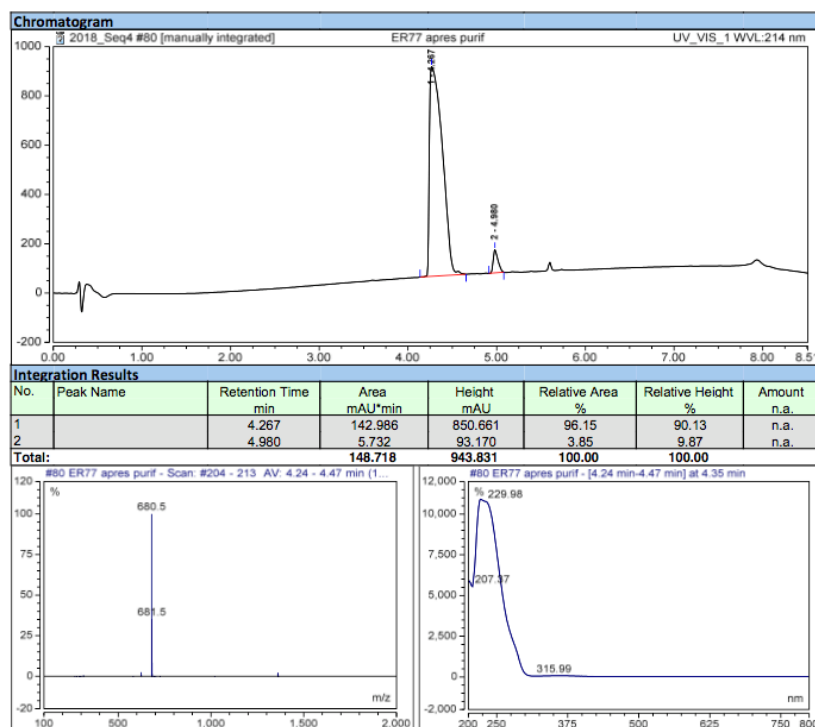


To a solution of **18** (0.4 g, 0.91 mmol, 1 equiv.) in anhydrous DMF (5 mL) was added DIPEA (0.174 mL, 1.0 mmol, 1.1 equiv.) and HATU (0.38 g, 1.0 mmol, 1.1 equiv.). The orange solution was stirred 10 min at RT. A solution of *tert*-butyl (3-((3-(dimethylamino)propyl)amino)propyl)carbamate (2 TFA) (**Synthon C**) (0.487 g, 1.0 mmol, 1.1 equiv.) in DMF (5 mL) and DIPEA (0.522 mL, 3.0 mmol, 3.3 equiv.) was added to the reaction mixture. The orange solution was stirred for 6 h at RT. The reaction mixture was evaporated to obtain an orange oil which was taken up in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and washed twice with brine. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum. An orange oil was obtained, which was purified by flash-column chromatography (A: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, B: MeOH; with the following gradient program: 100% to 70% of B in 30 CV). The product was isolated as an orange oil (0.602 g, 97%, purity: 96%).

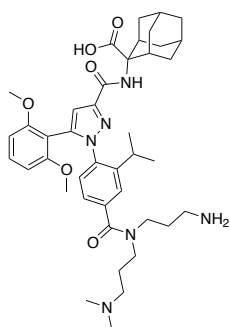
RP-HPLC-MS:  $t_r = 4.27$  min,  $m/z$  calculated for C<sub>37</sub>H<sub>53</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> 680.4, found 680.5.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 0.98$  (s, 6H), 1.39 (s, 9 H), 1.41 (t, J=7.1 Hz, 3H), 1.68 (m, 2H), 1.81 (m, 1H), 2.04 (m, 1H), 2.19 (m, 2H), 2.72 (m, 1H), 2.79 (s, 6H), 3.1-3.3 (m, 4H), 3.55 (m, 2H), 3.65 (s, 6H), 4.42 (q, J=7.1 Hz, 2H), 4.81 (br, 1H), 6.46 (d, J=8.4 Hz, 2H), 6.92 (s, 1H), 7.16 (d, J=7.8 Hz, 1H), 7.2-7.25 (m, 2H), 7.39 (d, J=7.8 Hz, 1H) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 12.2$  (CH<sub>3</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 17.4 (CH), 18.6 (CH<sub>2</sub>), 27.6 (CH<sub>3</sub>), 28.4 (CH<sub>3</sub>), 42.3 (CH<sub>2</sub>), 43.1 (CH<sub>3</sub>), 43.6 (CH<sub>3</sub>), 54.2 (CH<sub>3</sub>), 55.5 (CH<sub>2</sub>), 60.9 (CH<sub>2</sub>), 81.5 (CH), 103.5 (CH), 111.1 (CH), 124.2 (CH), 128.8 (CH), 131.6 (CH), 133.9 (CH), 158.3 (C), 162.7 (C) ppm.

RP-HPLC-MS analysis of **19** :



**Compound 20, 2-((1-(4-((3-aminopropyl)-(3-dimethylaminopropyl)-carbamoyl)-2-isopropylphenyl)-5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1H-pyrazole-3-carbonyl)-amino)-adamantane-2-carboxylic acid**



To a solution of **19** (0.602 g, 0.86 mmol, 1 equiv.) in dioxane (9 mL) was added a solution of 5M KOH (0.886 mL, 4.43 mmol, 5 equiv.). The yellow solution was stirred overnight at RT. The reaction mixture was concentrated under vacuum. The residue was taken up in water and washed three times with Et<sub>2</sub>O. The aqueous phase was acidified to pH 3-4 (precipitation) with a solution of 1M HCl and evaporated. EtOH was added to the residue and KCl was filtered off. The solution was concentrated under vacuum to obtain an orange oil.

DMF (15 mL), NEt<sub>3</sub> (0.46 mL, 3.3 mmol, 3 equiv.) and HATU (0.46 g, 1.2 mmol, 1.1 equiv.) were added. The yellowish solution was stirred for 15 min at RT. A solution of *tert*-butyl-2-aminoadamantane-2-carboxylate (**Synthon D**) (0.302 g, 1.2 mmol, 1.1 equiv.) in DMF (5 mL) and NEt<sub>3</sub> (0.31 mL, 2.2 mmol, 2 equiv.) was added to the reaction mixture and stirred for 4 h at RT. The reaction mixture was concentrated under vacuum to obtain an orange oil.

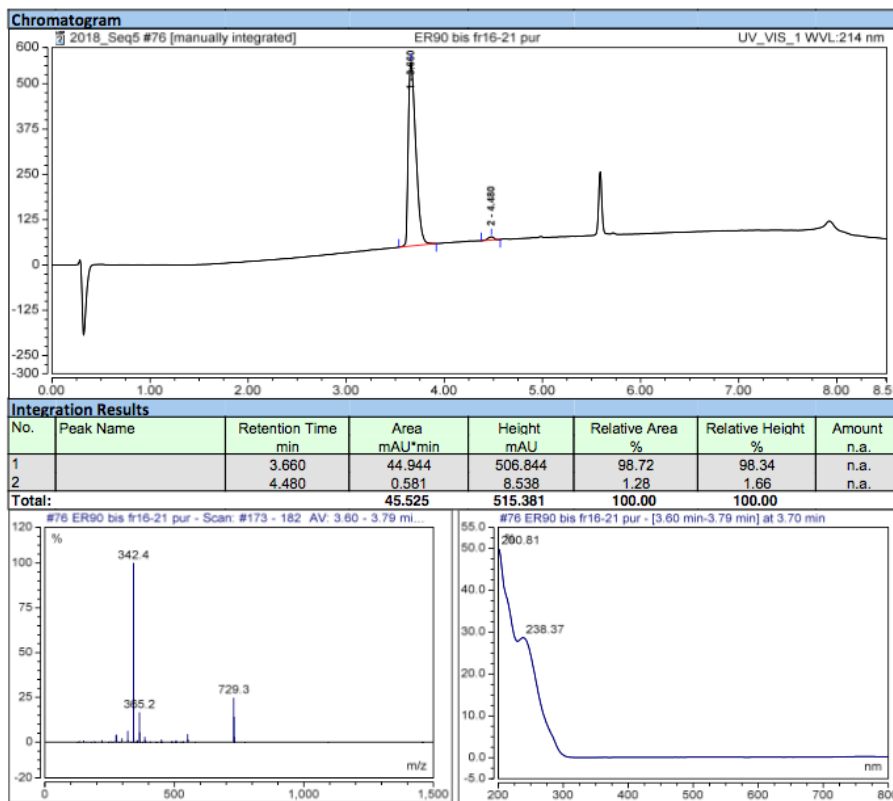
Finally, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL), TFA (5 mL) and H<sub>2</sub>O (0.5 mL) were added. The yellow solution was stirred at RT for 1.5 h. The reaction mixture was concentrated under vacuum and purified by semi-preparative HPLC on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 20% of b for 5 min, 20% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min) to obtain **20** as a white powder (2 TFA salt, 0.456 g, 55%, purity: 99%).

RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.66$  min,  $m/z$  calculated for C<sub>41</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 729.4, found 729.3.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 0.97$  (s, 6H), 1.49 (m, 2H), 1.63 (m, 4H), 1.67-1.80 (m, 4H), 1.90 (m, 2H), 1.98 (m, 2H), 2.11 (m, 4H), 2.51 (m, 2H), 2.6-2.7 (m, 2H), 2.72 (s, 3H), 2.78 (m, 1H), 2.91 (s, 3H), 3.09 (m, 1H), 3.2-3.35 (m, 3H), 3.57 (s, 6H), 6.6 (d, J=8.4 Hz, 2H), 6.87 (s, 1H), 7.2-7.4 (m, 4H) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 11.3$  (CH<sub>3</sub>), 26.4 (CH<sub>3</sub>), 27.6 (CH<sub>3</sub>), 33.4 (CH<sub>2</sub>), 36.7 (CH<sub>2</sub>), 37.0 (CH<sub>2</sub>), 42.6 (CH<sub>3</sub>), 42.8 (CH<sub>3</sub>), 54.5 (CH<sub>2</sub>), 55.2 (CH<sub>2</sub>), 55.6 (CH<sub>3</sub>), 63.6 (CH<sub>2</sub>), 104.0 (CH), 105.6 (C), 109.0 (CH), 123.5 (CH), 124.3 (CH), 129.9 (CH), 137.8 (C), 158.1 (C), 159.4 (C) ppm.

HRMS:  $m/z$  calculated for C<sub>41</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 729.43407, found 729.43468;  $m/z$  calculated for [M+Na]<sup>+</sup> 751.41590, found 751.41378.

RP-HPLC-MS and HRMS analysis of **20**:



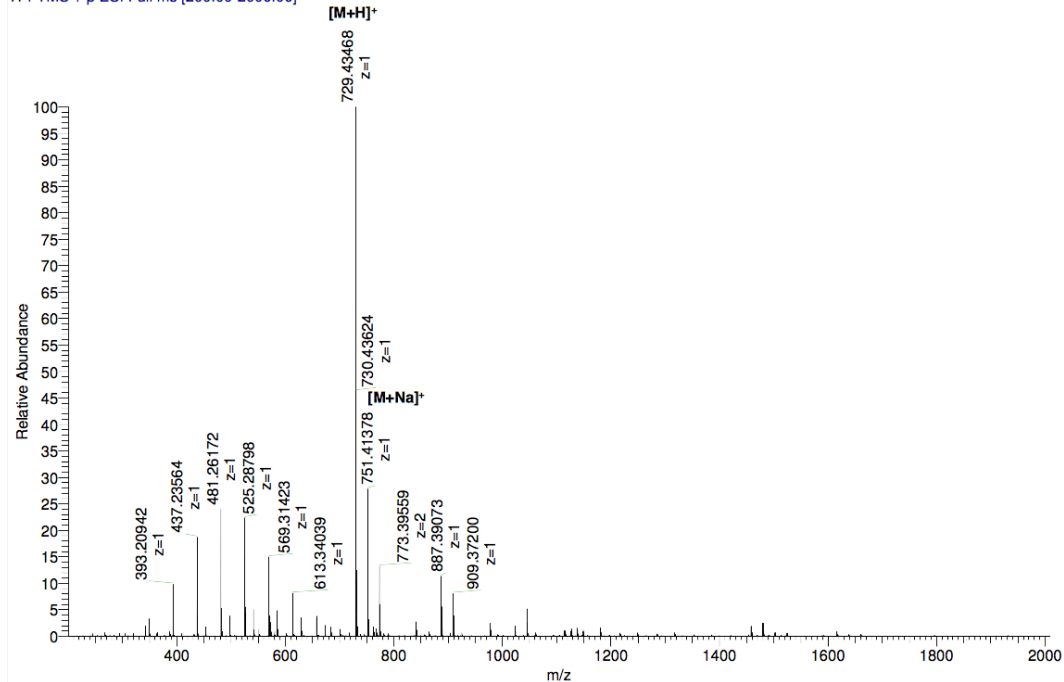
C:\Xcalibur\data\2018\ER\18er\_90\_2

10/23/2018 5:18:19 PM

DCM/MeOH

18er\_90\_2 #5-12 RT: 0.08-0.19 AV: 8 NL: 1.32E7

T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-2000.00]



## III.2. Coupling with the chelating agents

### III.2.1. Synthesis of compound **21** (3BP-228)

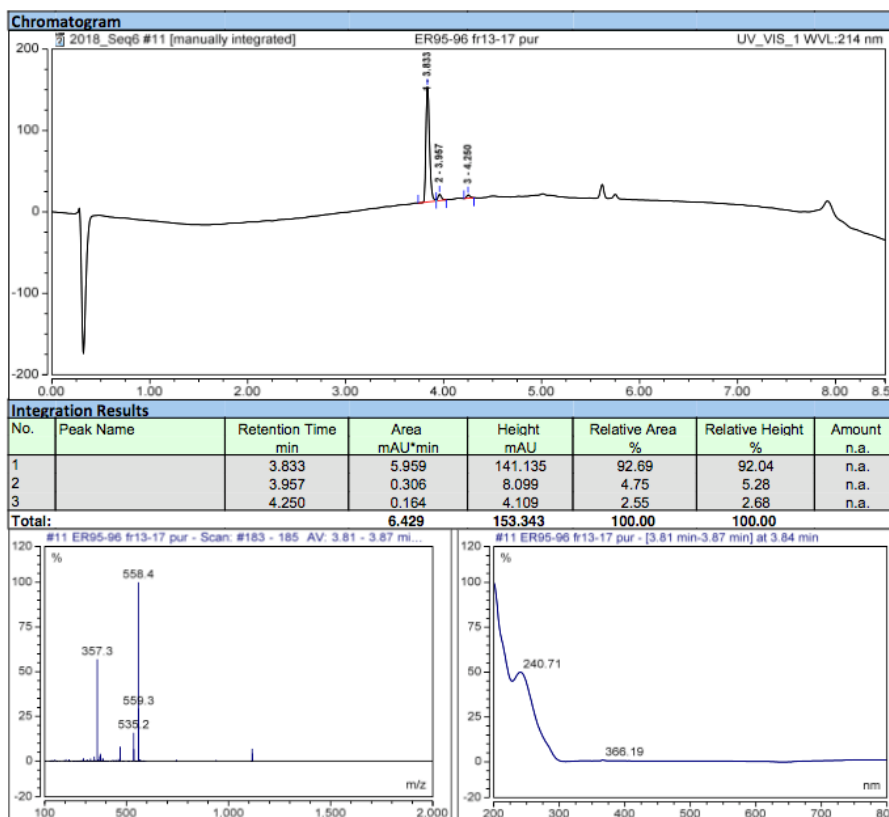
#### Compound **21**, 2-((1-(4-((3-DOTA-aminopropyl)-(3-dimethylaminopropyl)-carbamoyl)-2-isopropylphenyl)-5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1H-pyrazole-3-carbonyl)-amino)-adamantane-2-carboxylic acid

To a solution of **20** (30 mg, 35.6  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) in anhydrous DMF (0.5 mL) and DIPEA (12.4  $\mu\text{L}$ , 71.2  $\mu\text{mol}$ , 2 equiv.), was added a solution of DOTA-NHS (40.66 mg, 53.4  $\mu\text{mol}$ , 1.5 equiv.) in anhydrous DMF (0.5 mL) with DIPEA (55.8  $\mu\text{L}$ , 0.32 mmol, 9 equiv.). The reaction mixture was stirred for 2 h at RT. The reaction medium was concentrated under vacuum and the oil was purified on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 20% of B for 5 min, 20% to 60% of B in 45 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product **21** was obtained as a white powder (3 TFA salt, 21 mg, 40%, purity: 93%).

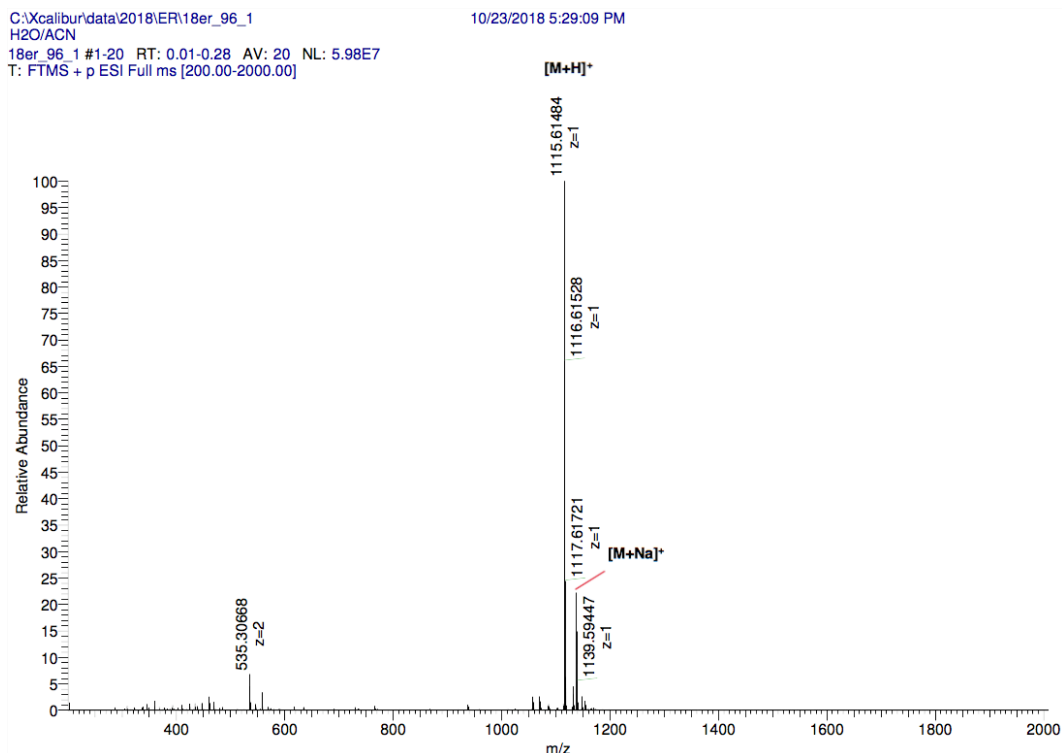
RP-HPLC-MS:  $t_r$  = 3.83 min,  $m/z$  calculated for C<sub>57</sub>H<sub>82</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1115.6, found 1115.7.

HRMS:  $m/z$  calculated for C<sub>57</sub>H<sub>82</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1115.61422, found 1115.61484;  $m/z$  calculated for [M+Na]<sup>+</sup> 1137.59605, found 1139.59447.

RP-HPLC-MS and HRMS analysis of **21**:







### III.2.2. Synthesis of compound 22

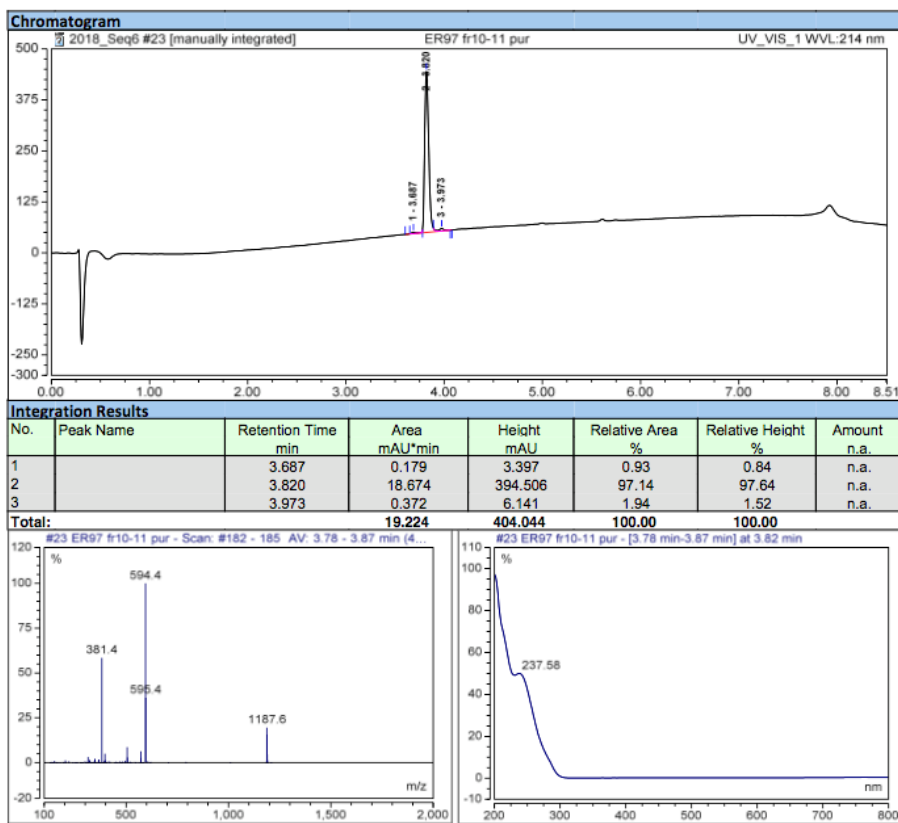
#### Compound 22, 2-((1-(4-((3-DOTAGA-aminopropyl)-(3-dimethylaminopropyl)-carbamoyl)-2-isopropylphenyl)-5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1H-pyrazole-3-carbonyl)-amino)-adamantane-2-carboxylic acid

To a solution of **20** (30 mg, 35.6  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) in anhydrous DMF (0.5 mL) was added DIPEA (12.4  $\mu\text{L}$ , 71.2  $\mu\text{mol}$ , 2 equiv.) and a solution of DOTAGA anhydride (25 mg, 53.4  $\mu\text{mol}$ , 1.5 equiv.) in anhydrous DMF (0.5 mL) with DIPEA (36.8  $\mu\text{L}$ , 0.211 mmol, 6 equiv.). The reaction mixture was stirred for 4 h at RT. The reaction medium was concentrated under vacuum and the oil was purified on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 30% of B for 5 min, 30% to 70% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product **22** was obtained as a white powder (4 TFA salt, 21.59 mg, 37%, purity: 97%).

RP-HPLC-MS:  $t_r$  = 3.82 min,  $m/z$  calculated for C<sub>60</sub>H<sub>86</sub>N<sub>10</sub>O<sub>15</sub>  $[M+H]^+$  1187.6, found 1187.6.

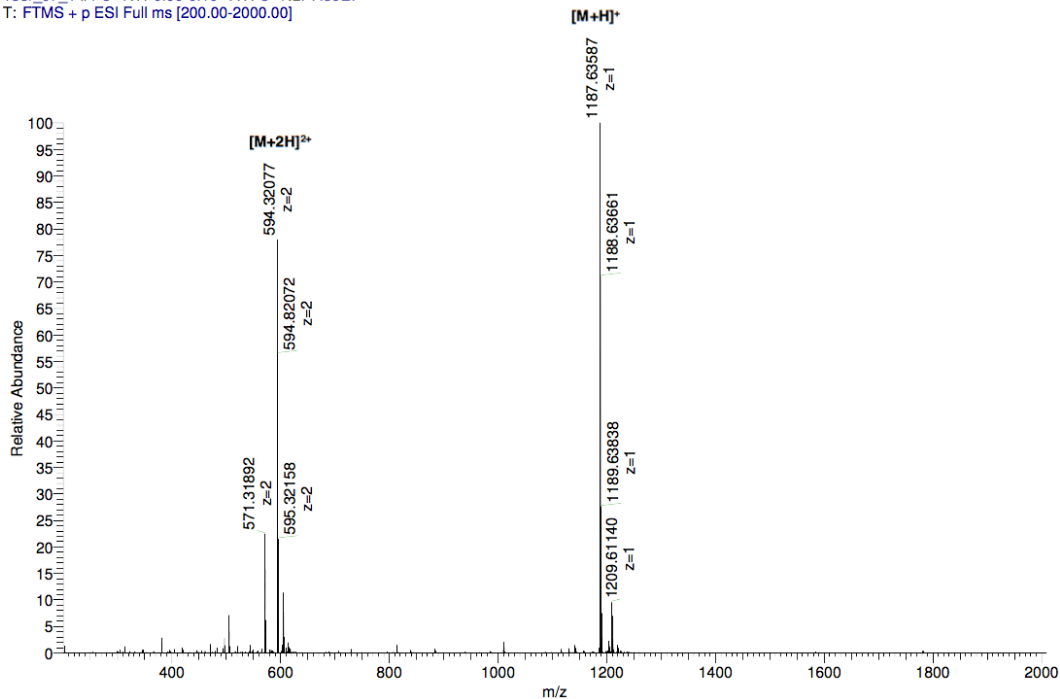
HRMS:  $m/z$  calculated for C<sub>60</sub>H<sub>86</sub>N<sub>10</sub>O<sub>15</sub>  $[M+H]^+$  1187.63535, found 1187.63587;  $m/z$  calculated for  $[M+2H]^{2+}$  594.32165, found 594.32077.

RP-HPLC-MS and HRMS analysis of **22**:



C:\Xcalibur\data\2018\ER\18er\_97\_1  
 H2O/ACN  
 18er\_97\_1 #1-8 RT: 0.00-0.10 AV: 8 NL: 7.59E7  
 T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-2000.00]

10/23/2018 5:35:21 PM

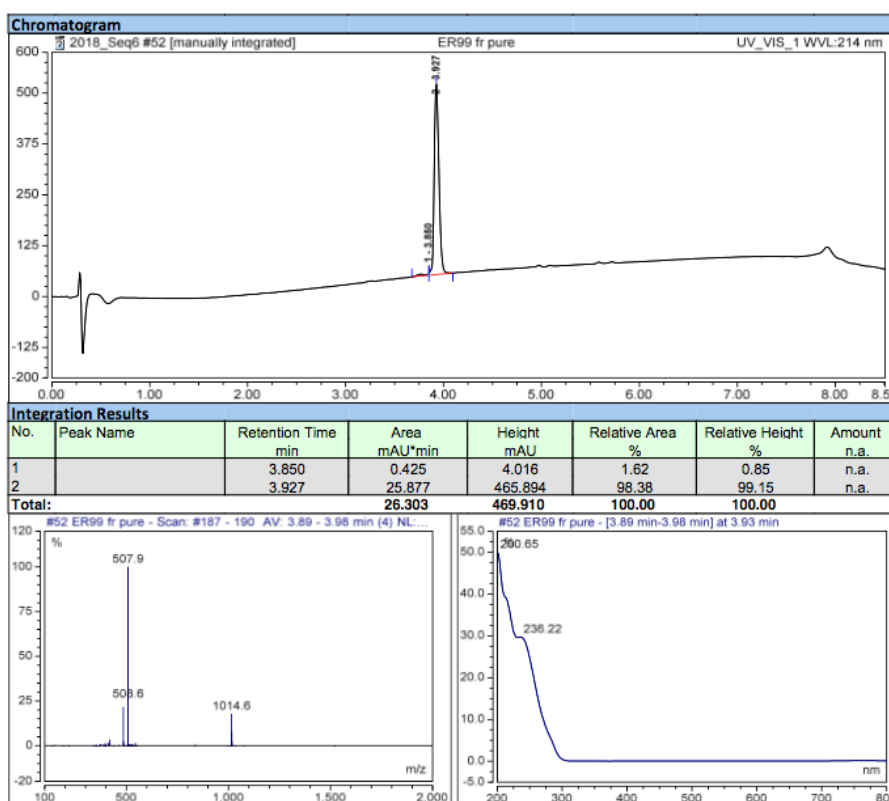


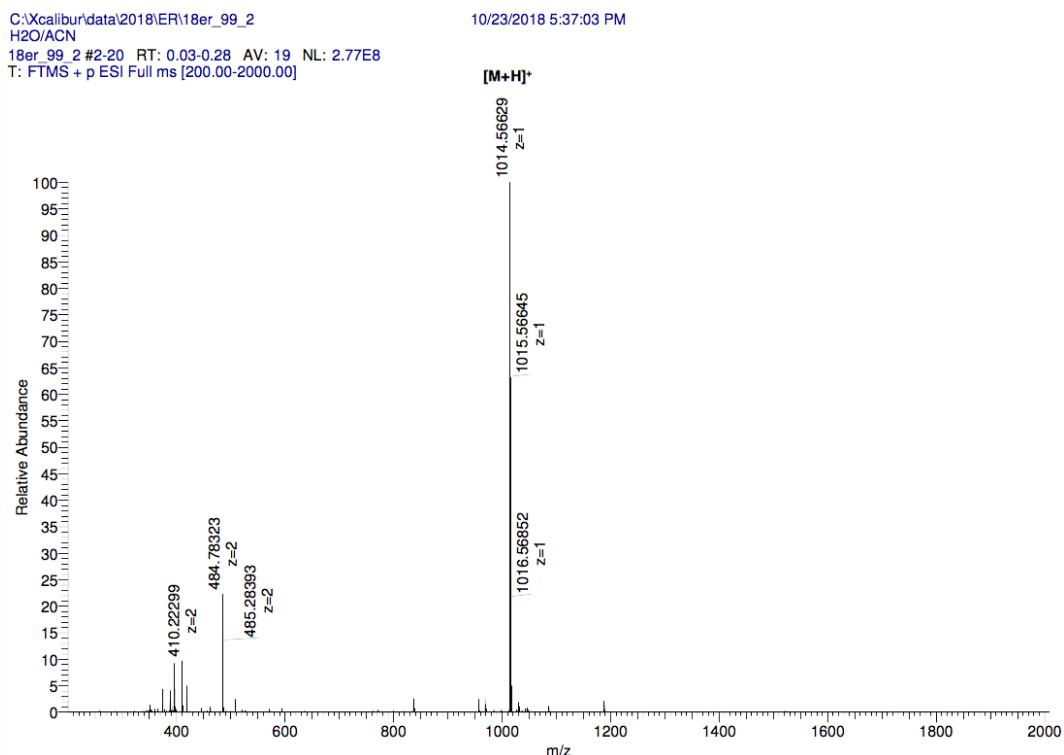
### III.2.3. Synthesis of compound **23**

#### Compound **23**, 2-((1-(4-((3-NOTA-aminopropyl)-(3-dimethylaminopropyl)-carbamoyl)-2-isopropylphenyl)-5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1H-pyrazole-3-carbonyl)-amino)-adamantane-2-carboxylic acid

To a solution of **20** (30 mg, 35.6  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) in anhydrous DMF (0.5 mL) and DIPEA (12.4  $\mu\text{L}$ , 71.2  $\mu\text{mol}$ , 2 equiv.) was added a solution of NOTA-NHS (35.3 mg, 53.4  $\mu\text{mol}$ , 1.5 equiv.) in anhydrous DMF (0.5 mL) with DIPEA (46.5  $\mu\text{L}$ , 0.267 mmol, 7.5 equiv.). The reaction mixture was stirred for 3 h at RT. The reaction medium was concentrated under vacuum and the oil was purified on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 30% of B for 5 min, 30% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product **23** was isolated as a white powder (3 TFA salt, 14.39 mg, 30%, purity: 98%).  
 RP-HPLC-MS:  $t_r$  = 3.85 min,  $m/z$  calculated for C<sub>53</sub>H<sub>75</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1014.6, found 1014.6.  
 HRMS:  $m/z$  calculated for C<sub>53</sub>H<sub>75</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1014.56654, found 1014.56629.

RP-HPLC-MS and HRMS analysis of **23**:





### III.2.4. Synthesis of compound 24

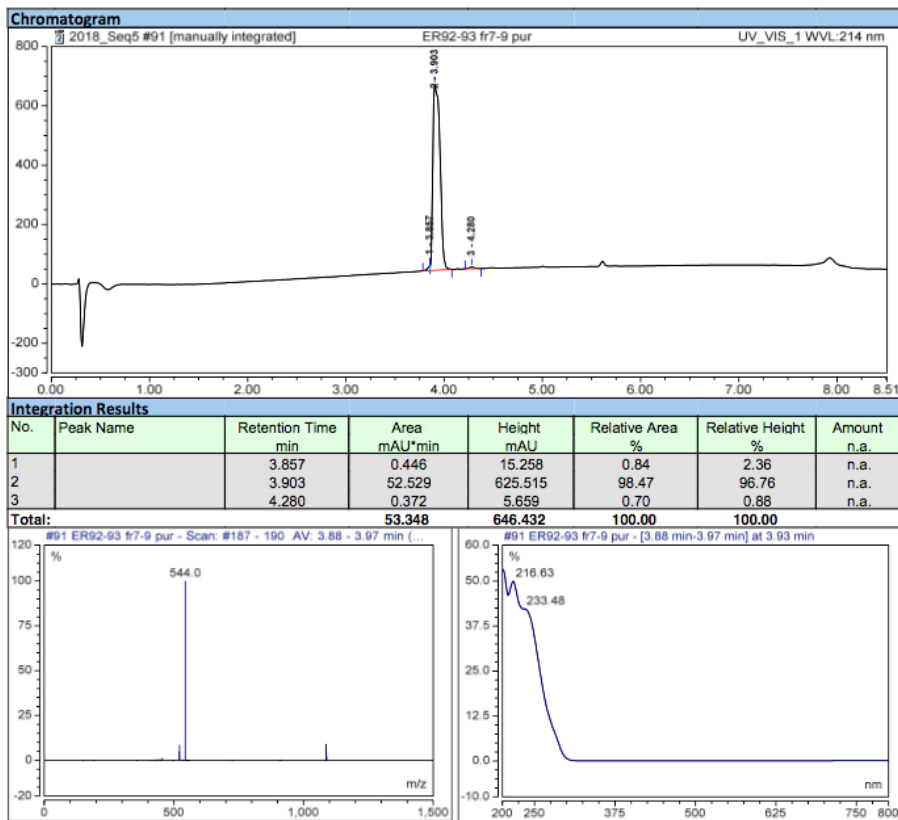
#### Compound 24, 2-((1-(4-((3-NODAGA-aminopropyl)-(3-dimethylaminopropyl)-carbamoyl)-2-isopropylphenyl)-5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1H-pyrazole-3-carbonyl)-amino)-adamantane-2-carboxylic acid

To a solution of **20** (30 mg, 35.6  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) in anhydrous DMF (0.5 mL) and DIPEA (12.4  $\mu\text{L}$ , 71.2  $\mu\text{mol}$ , 2 equiv.) was added a solution of NODAGA-NHS (39.12 mg, 53.4  $\mu\text{mol}$ , 1.5 equiv.) in anhydrous DMF (0.5 mL) and DIPEA (49.6  $\mu\text{L}$ , 0.285 mmol, 8 equiv.). The reaction mixture was stirred for 2 h at RT. The reaction medium was concentrated under vacuum and the oil was purified on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 30% of B for 5 min, 30% to 70% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product **24** was obtained as a white powder (4 TFA salt, 35.89 mg, 65%, purity: 96%).

RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.9$  min,  $m/z$  calculated for C<sub>56</sub>H<sub>79</sub>N<sub>9</sub>O<sub>13</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1086.6, found 1086.7.

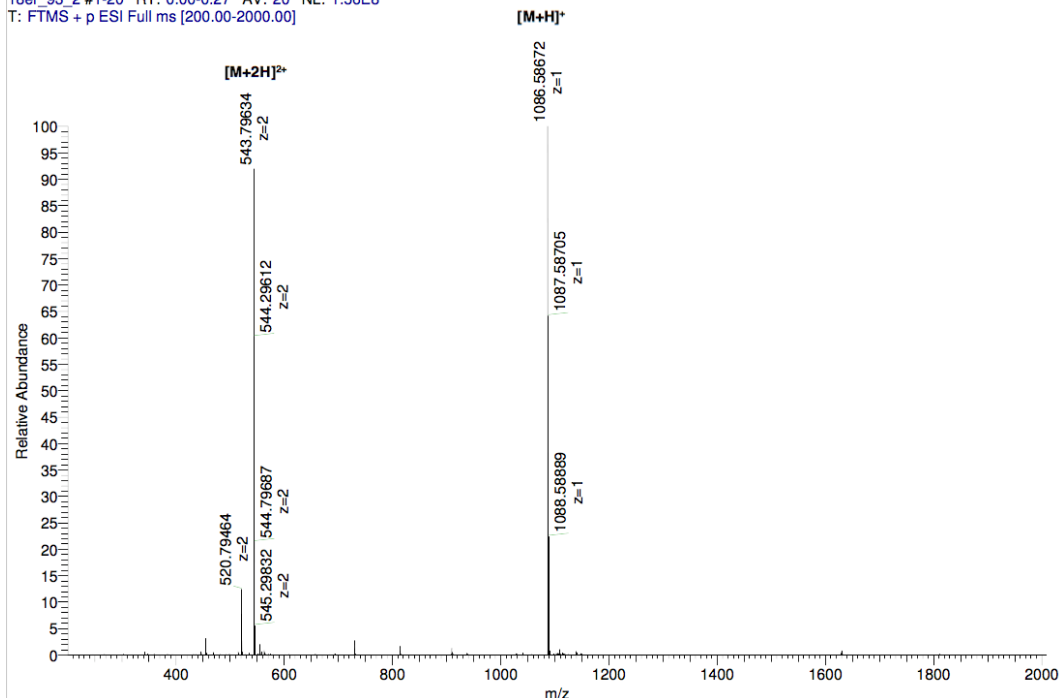
HRMS:  $m/z$  calculated for C<sub>56</sub>H<sub>79</sub>N<sub>9</sub>O<sub>13</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1086.58767, found 1086.58672;  $m/z$  calculated for [M+2H]<sup>2+</sup> 543.79781, found 543.79634.

RP-HPLC-MS and HRMS analysis of **24**:



C:\Xcalibur\data\2018\ER\18er\_93\_2  
 H2O/ACN  
 18er\_93\_2 #1-20 RT: 0.00-0.27 AV: 20 NL: 1.56E8  
 T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-2000.00]

10/23/2018 5:22:40 PM



## III.2.5. Synthesis of compound 25

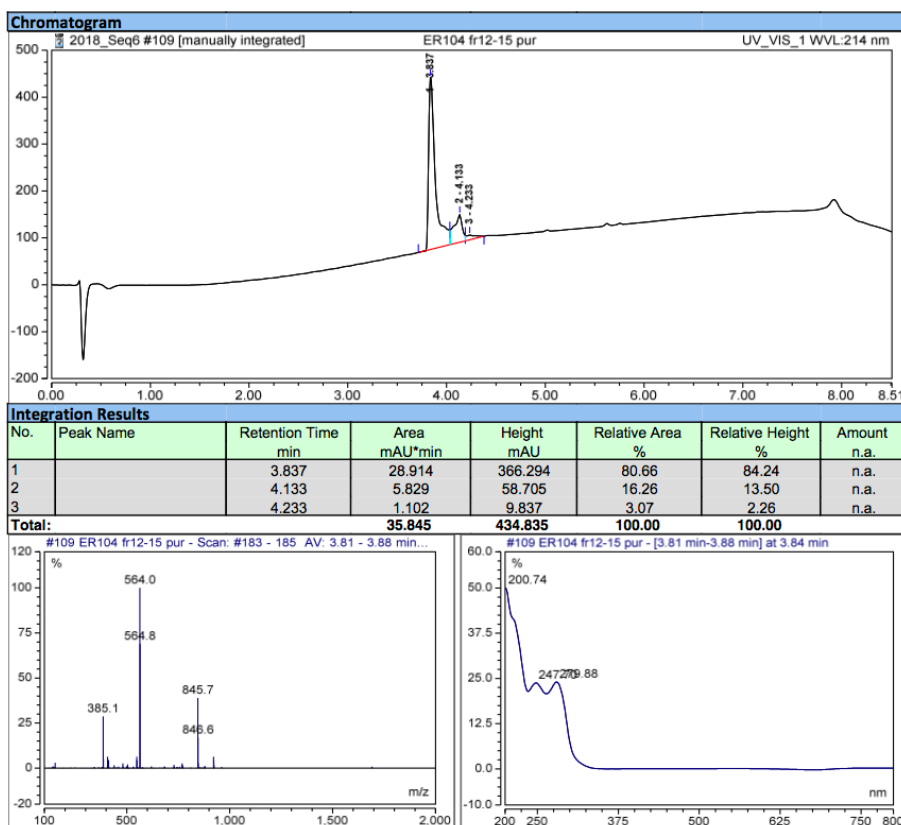
**Compound 25, 2-((1-(4-((3-THP-aminopropyl)-(3-dimethylaminopropyl)-carbamoyl)-2-isopropylphenyl)-5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1H-pyrazole-3-carbonyl)-amino)-adamantane-2-carboxylic acid**

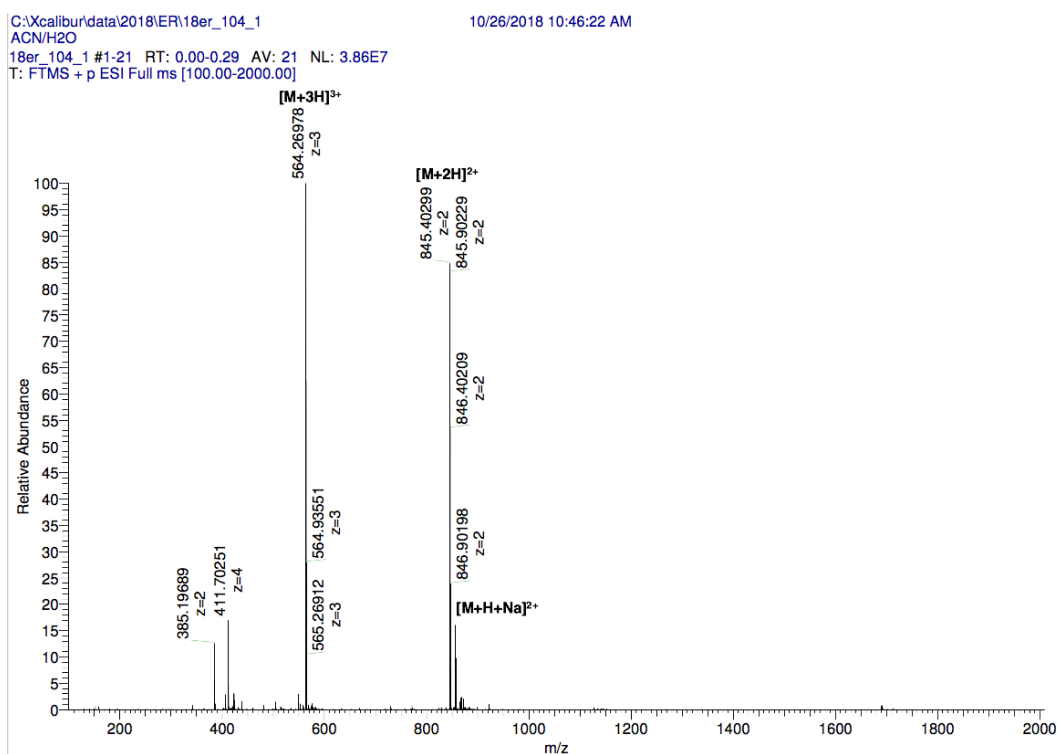
To a solution of **20** (10 mg, 11.9  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) in anhydrous DMF (0.5 mL) was added DIPEA (4.1  $\mu\text{L}$ , 23.8  $\mu\text{mol}$ , 2 equiv.) and a solution of THP-NCS (26.2 mg, 17.9  $\mu\text{mol}$ , 1.5 equiv.) in anhydrous DMF (0.5 mL) with DIPEA (18.6  $\mu\text{L}$ , 0.107 mmol, 9 equiv.). The reaction mixture was stirred for 4 h at RT. The reaction medium was concentrated under vacuum and the oil was purified on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 30% of B for 5 min, 30% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product **25** was obtained as a white powder (7 TFA salt, 13.6 mg, 46%, purity: 97%, the peak at 3.8 min corresponds to the expected compound and the peak at 4.1 min corresponds to an Fe-adduct formed during the analysis).

RP-HPLC-MS:  $t_r$  = 3.84 min,  $m/z$  calculated for C<sub>86</sub>H<sub>112</sub>N<sub>16</sub>O<sub>16</sub>S<sub>2</sub> [M+2H]<sup>2+</sup> 845.4, found 845.7.

HRMS:  $m/z$  calculated for C<sub>56</sub>H<sub>79</sub>N<sub>9</sub>O<sub>13</sub> C<sub>86</sub>H<sub>112</sub>N<sub>16</sub>O<sub>16</sub>S<sub>2</sub> [M+2H]<sup>2+</sup> 845.38630, found 845.40299;  $m/z$  calculated for [M+3H]<sup>3+</sup> 563.93739, found 564.26978.

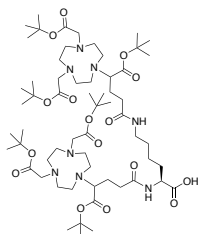
RP-HPLC-MS and HRMS analysis of **25**:





### III.2.6. Synthesis of compound 27

#### Compound 26, Lys(NODAGA(tBu)<sub>3</sub>)<sub>2</sub>



To a solution of NODAGA(tBu)<sub>3</sub> (75 mg, 0.138 mmol, 2.5 equiv.) in anhydrous DMF (1 mL) with DIPEA (47.9 μL, 0.275 mmol, 5 equiv.) was added TSTU (50 mg, 0.165 mmol, 3 equiv.). The yellow solution was stirred for 30 min at RT and a suspension of L-lysine, monochlorhydrate (10 mg, 0.055 mmol, 1 equiv.) in DMF (1 mL) and DIPEA (28.7 μL, 0.165 mmol, 3 equiv) was added to the reaction mixture. The yellow suspension was stirred overnight at RT and

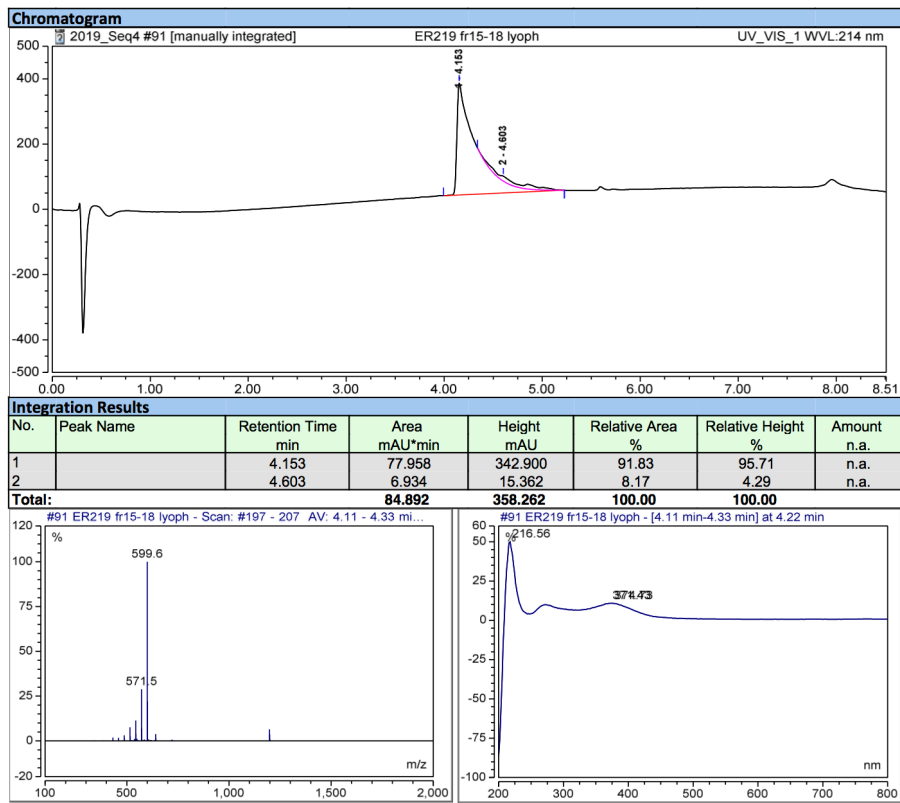
heated for 4 h at 50 °C. The reaction medium was concentrated under vacuum and purified on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 25% of B for 5 min, 25% to 75% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product was obtained as a white powder (3 TFA salt, 66.4 mg, 78%, purity: 92%).

RP-HPLC-MS:  $t_r$  = 4.15 min,  $m/z$  calculated for C<sub>60</sub>H<sub>108</sub>N<sub>8</sub>O<sub>16</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1197.8, found 1197.8;  $m/z$  calculated for [M+2H]<sup>2+</sup> 599.4, found 599.6.

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.45 (m, 64H), 1.8 (m, 2H), 2.0 (m, 2H); 2.2 (m, 2H), 2.4 (m, 4H), 2.7-3.3 (m, 27H), 3.3-4.0 (m, 10H), 4.40 (m, 1H), 7.47 (m, 1H), 7.70 (m, 1H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 22.7 (CH<sub>2</sub>), 25.2 (CH<sub>2</sub>), 25.6 (CH<sub>2</sub>), 28.1 (CH<sub>3</sub>), 30.6 (CH<sub>2</sub>), 31.9 (CH<sub>2</sub>), 32.8 (CH<sub>2</sub>), 39.0 (CH<sub>2</sub>), 50.7 (CH<sub>2</sub>), 53.1 (CH), 52.9 (CH<sub>2</sub>), 63.6 (CH), 82.8 (CH<sub>2</sub>), 116.9 (q, TFA), 160.6 (q, TFA), 171.2 (C), 172.9 (C), 173.1 (C), 174.2 (C) ppm.

HRMS:  $m/z$  calculated for C<sub>60</sub>H<sub>108</sub>N<sub>8</sub>O<sub>16</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1197.79627, found 1197.79853;  $m/z$  calculated for [M+2H]<sup>2+</sup> 599.40211, found 599.40336.

RP-HPLC-MS and HRMS analysis of **26**:

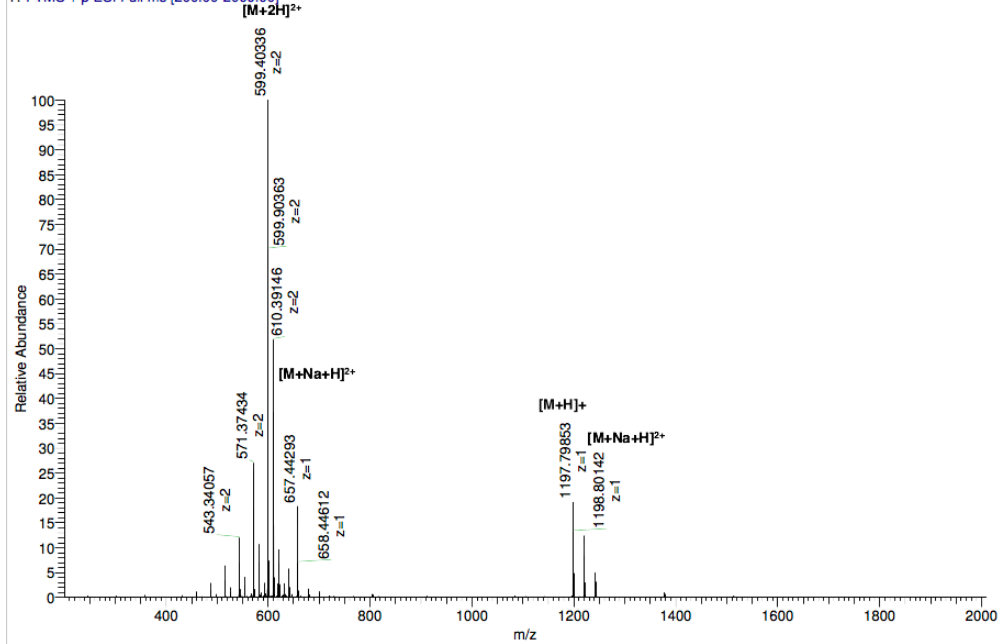


C:\Xcalibur\data\2019\er\19er\_219\_1 12/2/2019 5:28:54 PM

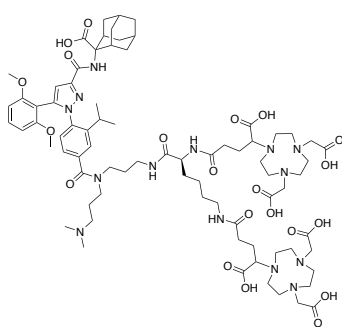
ACN/H2O

19er\_219\_1 #1-20 RT: 0.00-0.27 AV: 20 NL: 5.58E7

T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-2000.00]



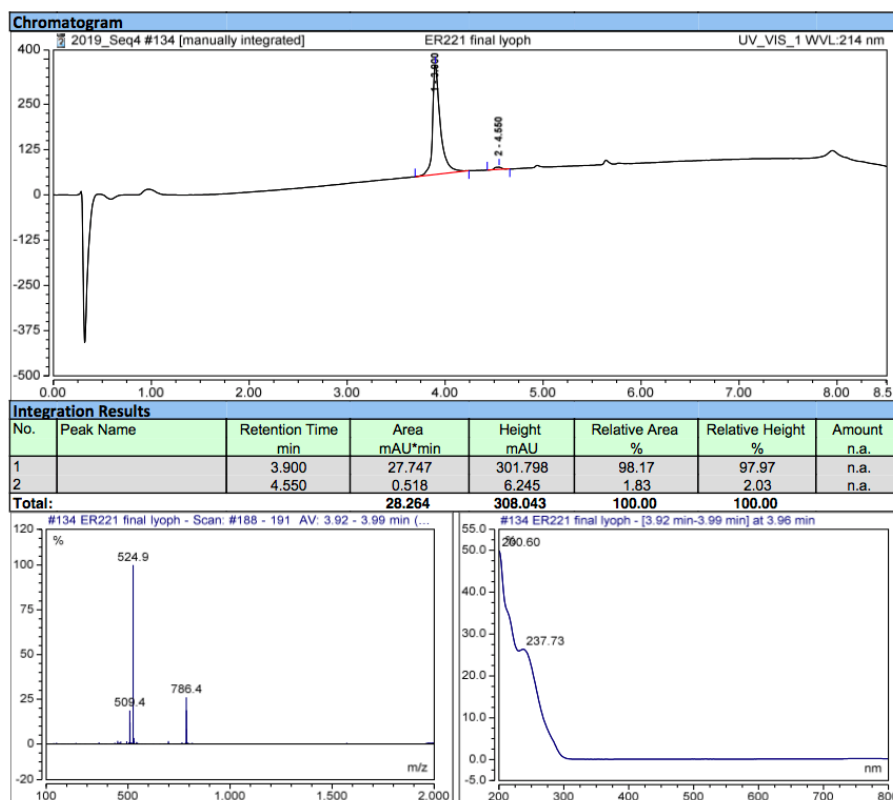


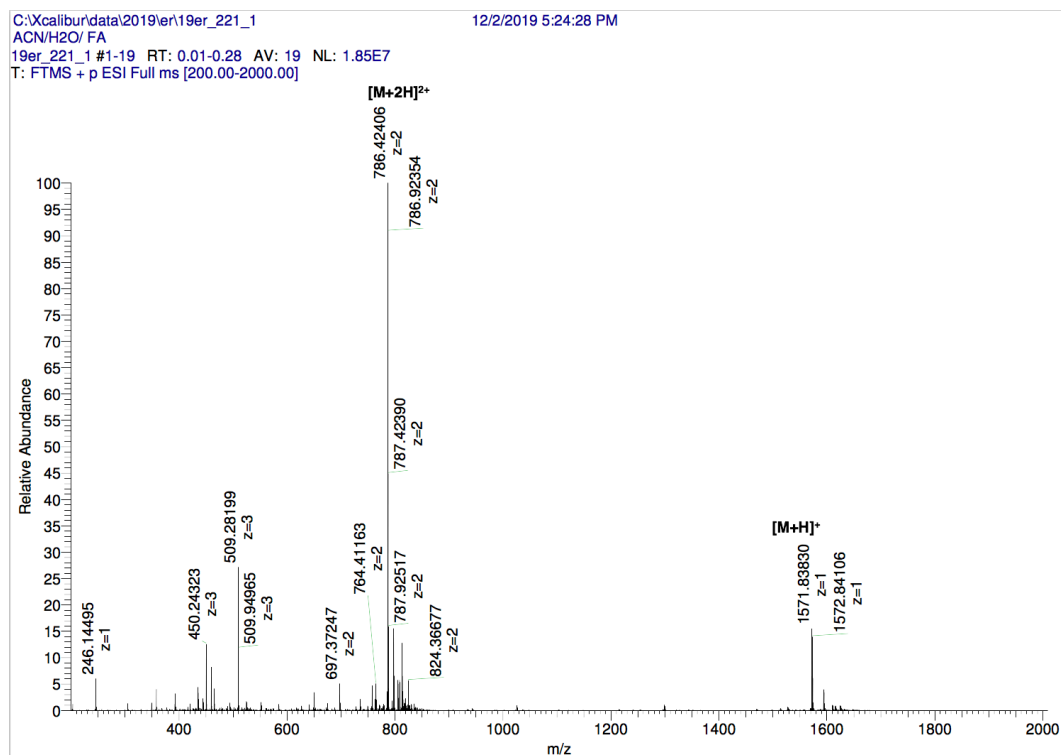
**Compound 27, bisNODAGA**

To a solution of Lys(NODAGA(tBu)<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (**26**) (15 mg, 12.5 μmol, 1 equiv.) in anhydrous DMF (0.75 mL) with DIPEA (6.5 μL, 37.5 μmol, 3 equiv.) was added HATU (4.75 mg, 12.5 μmol, 1 equiv.). The solution was stirred for 15 min at RT and a solution of **20** (10.5 mg, 12.5 μmol, 1 equiv.) in anhydrous DMF (0.75 mL) with DIPEA (8.7 μL, 50.0 μmol, 4 equiv.) was added. The reaction mixture was left stirring for 3 h at RT. The reaction medium was concentrated under vacuum and a solution of TFA:triisopropylsilane:H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5, v/v/v, 2 mL) was added. The reaction was stirred for 6 h at RT and concentrated under a flow of nitrogen gas. The residue was purified on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 20% of B for 5 min, 20% to 60% of B in 40 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product **27** was obtained as a white powder (4 TFA salt, 12.0 mg, 47%, purity: 98%).

RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.90$  min,  $m/z$  calculated for C<sub>77</sub>H<sub>114</sub>N<sub>14</sub>O<sub>21</sub> [M+2H]<sup>2+</sup> 786.4, found 786.4.

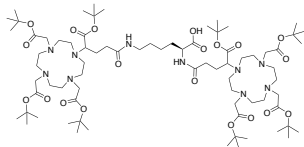
HRMS:  $m/z$  calculated for C<sub>77</sub>H<sub>114</sub>N<sub>14</sub>O<sub>21</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1571.83624, found 1571.83830;  $m/z$  calculated for [M+2H]<sup>2+</sup> 786.42209, found 786.42406.

**RP-HPLC-MS and HRMS analysis of 27:**



### III.2.7. Synthesis of compound 29

#### Compound 28, Lys(DOTAGA(tBu)<sub>4</sub>)<sub>2</sub>

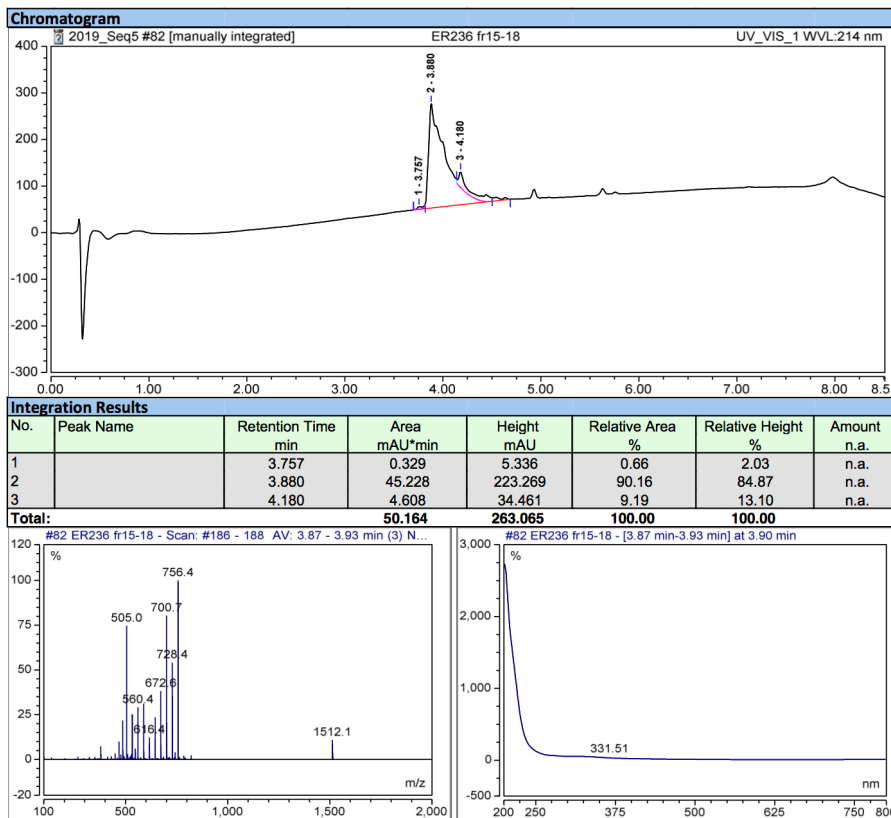


To a solution of DOTAGA(tBu)<sub>4</sub> (40 mg, 57 μmol, 1.9 equiv.) in anhydrous DMF (1 mL) with DIPEA (21 μL, 120 μmol, 4 equiv.) was added HATU (21.7 mg, 57 μmol, 1.9 equiv.). The yellow solution was stirred for 15 min at RT and DIPEA (21 μL, 120 μmol, 4 equiv.) and L-lysine, monochlorhydrate (5.5 mg, 30 mmol, 1 equiv.) were added. The reaction mixture was stirred for 4 h at RT. The reaction medium was concentrated under vacuum and purified on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 20% of B for 5 min, 20% to 80% of B in 70 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product was obtained as a white powder (4 TFA salt, 25.8 mg, 44%, purity: 90%).

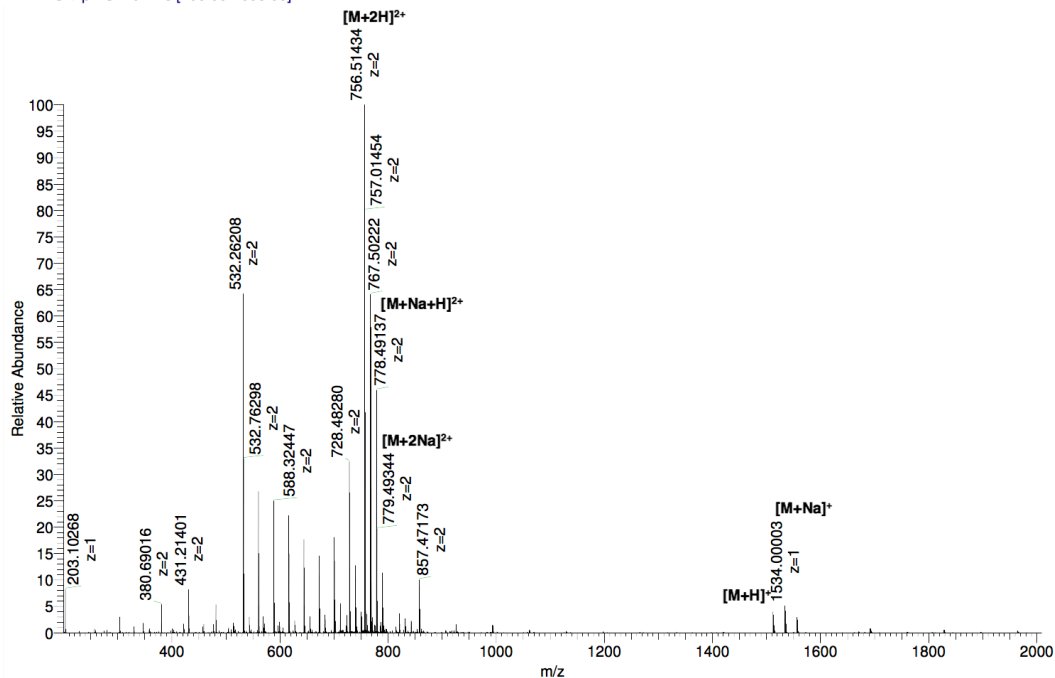
RP-HPLC-MS: *t<sub>r</sub>* = 3.88 min, *m/z* calculated for C<sub>76</sub>H<sub>138</sub>N<sub>10</sub>O<sub>20</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1512.01, found 1512.1; [M+2H]<sup>2+</sup> 756.5, found 756.4.

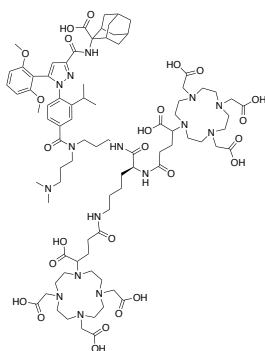
HRMS: *m/z* calculated for C<sub>76</sub>H<sub>138</sub>N<sub>10</sub>O<sub>20</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1512.01683, found 1512.01873; *m/z* calculated for [M+2H]<sup>2+</sup> 756.51239, found 756.51434.

RP-HPLC-MS and HRMS analysis of **28**:



C:\Xcalibur\data\2019\er\19er\_236\_1  
 ACN/H2O  
 19er\_236\_1 #1-20 RT: 0.01-0.28 AV: 20 NL: 1.13E8  
 T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-2000.00]



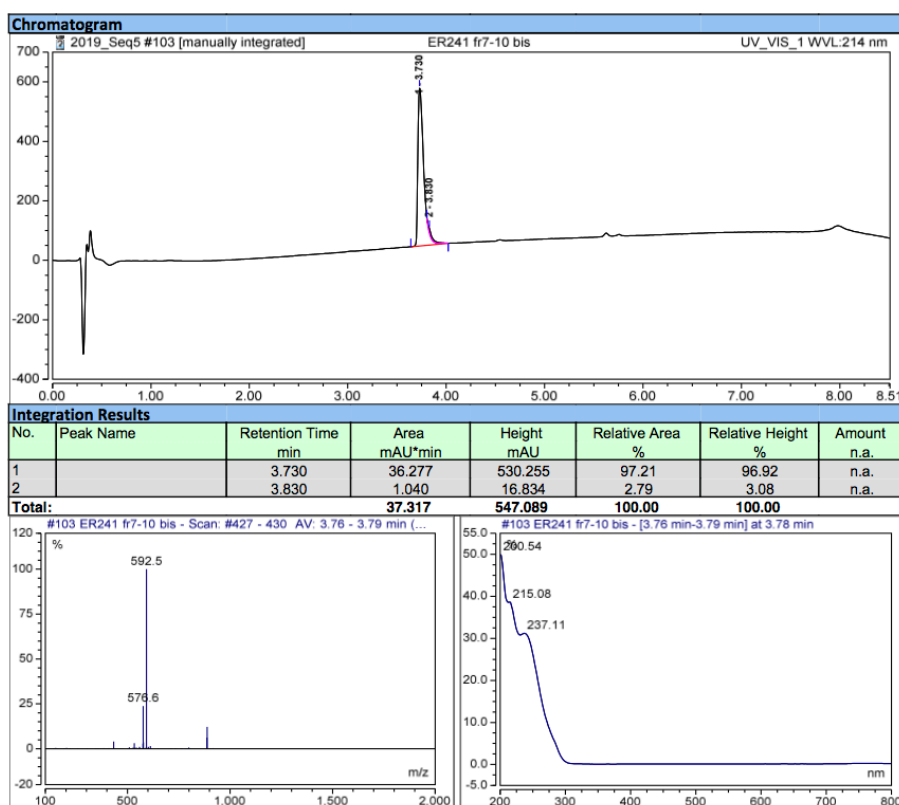
**Compound 29, bisDOTAGA**

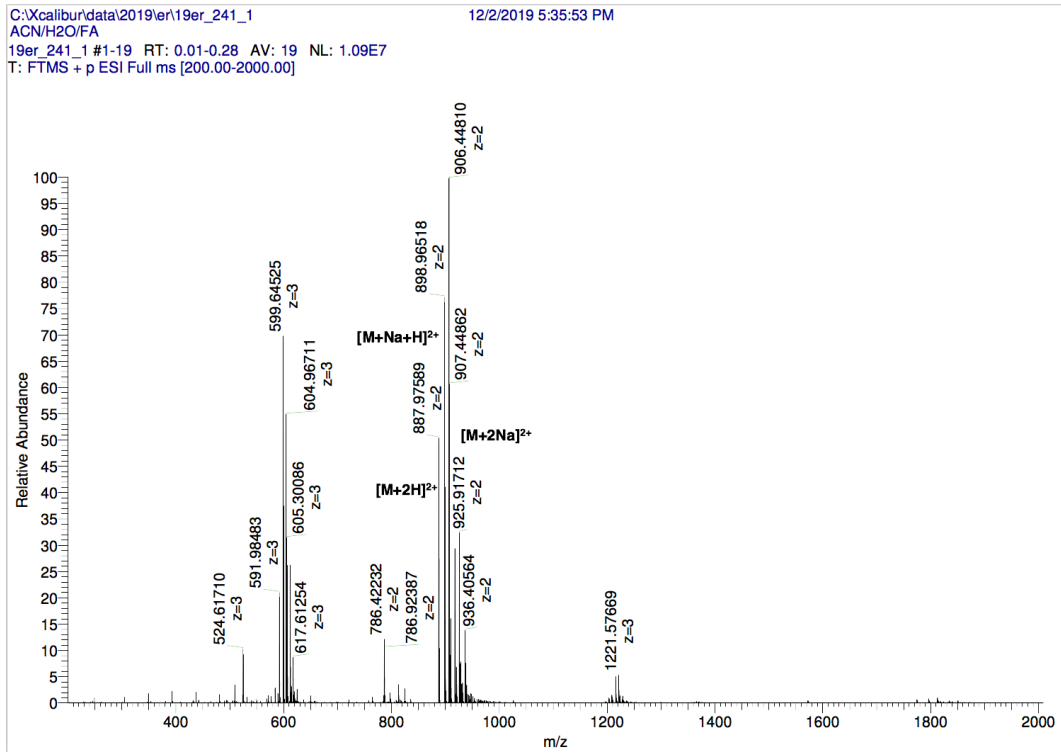
To a solution of Lys(DOTAGA(tBu)<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (**28**) (15.7 mg, 10.4 μmol, 1 equiv.) in anhydrous DMF (0.5 mL) was added DIPEA (5.4 μL, 31.2 μmol, 3 equiv.) and then HATU (3.95 mg, 10.4 μmol, 1 equiv.). The solution was stirred 15 min at RT and a solution of **20** (8.77 mg, 10.4 μmol, 1 equiv.) in anhydrous DMF (0.5 mL) with DIPEA (7.3 μL, 41.6 μmol, 4 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred 5 h at RT. The reaction medium was concentrated under vacuum and a solution of TFA:triisopropylsilane:H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5, v/v/v, 2 mL) was added. The reaction was stirred for 3 h at 45 °C and concentrated under a flow of nitrogen gas. The solution was purified on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 20% of B for 5 min, 20% to 60% of B in 60 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product **29** was obtained as a white powder (4 TFA salt, 7.94 mg, 34%, purity: 97%).

RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.73$  min,  $m/z$  calculated for C<sub>85</sub>H<sub>128</sub>N<sub>16</sub>O<sub>25</sub> [M+2H]<sup>2+</sup> 887.5, found 888.2; [M+3H]<sup>3+</sup> 592.0, found 592.5.

HRMS:  $m/z$  calculated for C<sub>85</sub>H<sub>128</sub>N<sub>16</sub>O<sub>25</sub> [M+2H]<sup>2+</sup> 887.46977, found 887.47499.

RP-HPLC-MS and HRMS analysis of **29**:

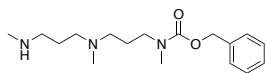




### III.3. Synthesis of compound 3BP-227

#### III.3.1. Synthesis of synthon E

##### Synthon E, benzyl methyl(3-(methyl(3-(methylamino)propyl)-amino)propyl)carbamate

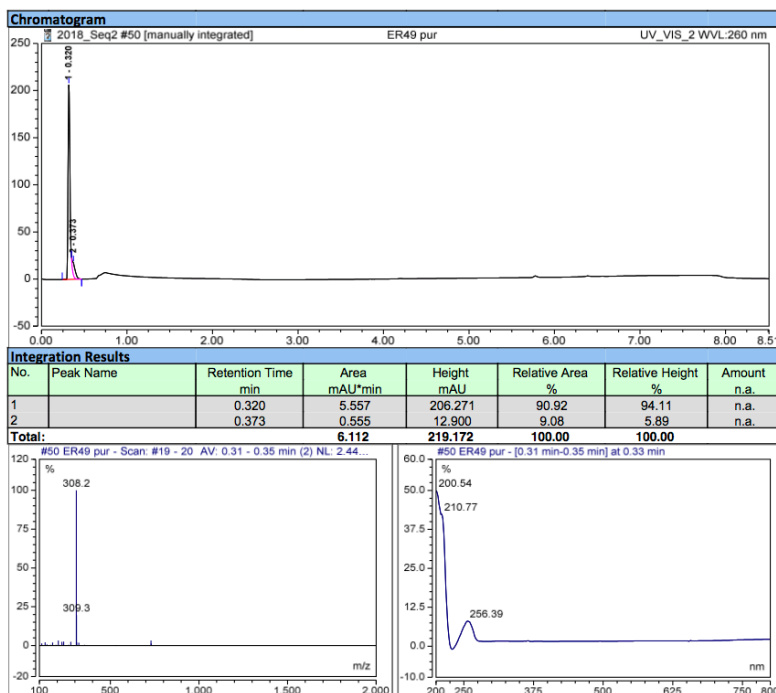


A solution of *N,N*-bis[3-(methylamino)propyl]methylamine (2 mL, 11 mmol, 5 equiv.) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 mL) was cooled to  $-78^\circ\text{C}$ . To this solution was added dropwise a solution of benzyl chloroformate (0.3 mL, 2.2 mmol, 1 equiv.) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6 mL) over 1 h. The reaction was stirred at  $-78^\circ\text{C}$  for 1.5 h before warming to room temperature and stirred for another 15 h. The white suspension obtained was washed twice with a solution of  $\text{K}_2\text{CO}_3$  5%, twice with brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated under vacuum. The colorless oil obtained was purified by semi-preparative HPLC on a BetaBasic-18 column (A:  $\text{H}_2\text{O}$  0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA; with the following gradient program: 0% of B for 10 min, 0% to 40% of B in 40 min, at a flow rate of 20 mL/min) RP-HPLC. A colorless oil (0.542 g, 80%, purity: 94%) was isolated.

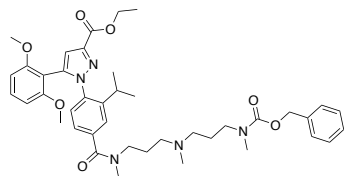
RP-HPLC-MS:  $t_r = 0.32$  min,  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  308.2, found 308.2.

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.95$  (m, 2H), 2.21 (m, 2H), 2.66 (s, 3H), 2.76 (m, 4H), 2.91 (s, 3H), 3.07 (m, 5H), 3.34 (m, 2H), 5.09 (s, 2H), 5.76 (br,  $\text{NH}_2^+$ ), 7.3-7.4 (m, 5H), 9.30 (br,  $\text{NH}^+$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 21.1$  ( $\text{CH}_2$ ), 22.4 ( $\text{CH}_2$ ), 33.3 ( $\text{CH}_3$ ), 39.8 ( $\text{CH}_3$ ), 45.9 ( $\text{CH}_3$ ), 46.2 ( $\text{CH}_2$ ), 53.1 ( $\text{CH}_2$ ), 54.3 ( $\text{CH}_2$ ), 67.6 ( $\text{CH}_2$ ), 116.0 (q, TFA), 127.6 (CH), 128.2 (CH), 128.6 (CH), 136.4 (C), 157.2 (C), 161.3 (q, TFA) ppm.

RP-HPLC-MS analysis of synthon E:



## III.3.2. Synthesis of 3BP-227

**Compound 31, ethyl 1-(4-((3-((3-((benzyloxy)carbonyl)(methyl)amino)propyl)-(methyl)amino)propyl)(methyl)carbamoyl)-2-isopropylphenyl)-5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1H-pyrazole-3-carboxylate**

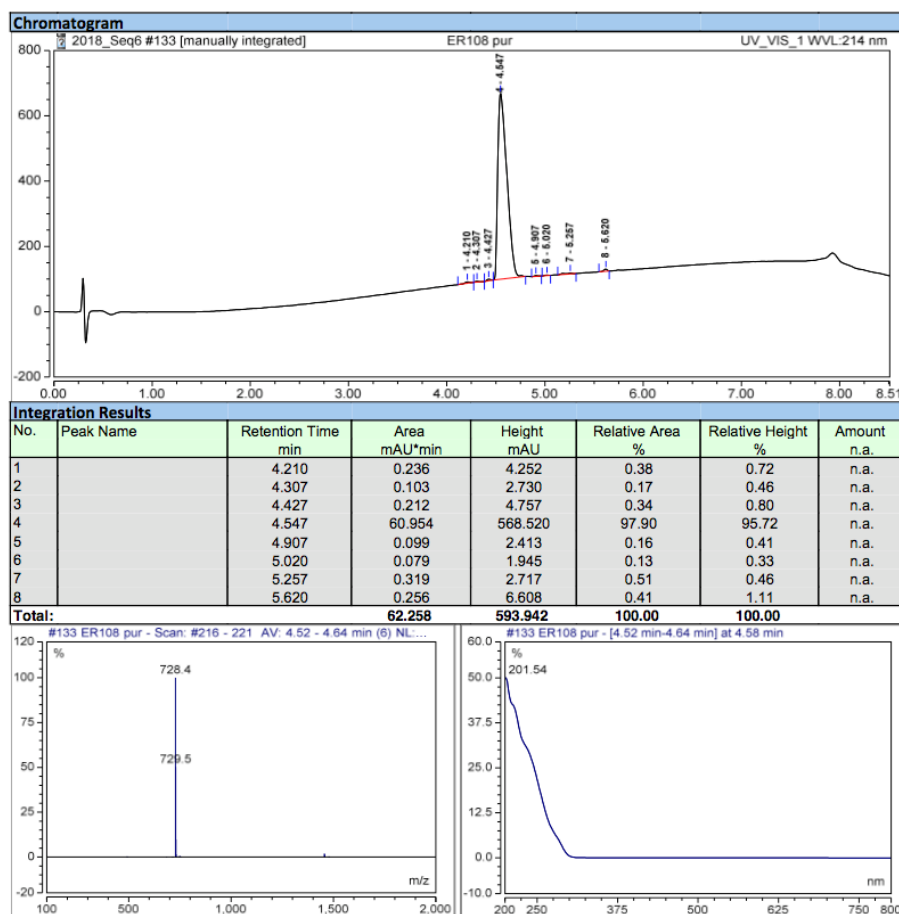
To a solution of **18** (200 mg, 0.46 mmol, 1 equiv.) in anhydrous DMF (2 mL) was added DIPEA (96  $\mu$ L, 0.55 mmol, 1.2 equiv.) and HATU (228 mg, 0.6 mmol, 1.3 equiv.). The solution was stirred 20 min at RT. A solution of benzyl methyl(3-(methyl(3-(methylamino) propyl)amino)propyl)carbamate (TFA salt)

**(Synthon E)** (169 mg, 0.55 mmol, 1.2 equiv.) in DMF (2 mL) and DIPEA (289  $\mu$ L, 1.66 mmol, 3.6 equiv.) was added to the reaction mixture. The yellow solution was stirred 7 h at RT. The reaction mixture was evaporated to obtain a brown oil which was taken up in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and washed four times with brine. The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated under vacuum. The oil was purified by flash-column chromatography (A:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , B: MeOH; with the following gradient program: 0% to 100% of B in 30 CV). An orange oil was obtained (110 mg, 33%, purity: 98%).

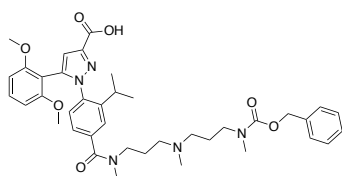
RP-HPLC-MS:  $t_r = 4.55$  min,  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{41}\text{H}_{53}\text{N}_5\text{O}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  728.9, found 728.4.

$R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 95/5) = 0.23.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.96$  (s, 6H), 1.39 (t,  $J=7.1$  Hz, 3H), 2.00 (m, 2H), 2.06 (m, 2H), 2.71 (m, 1H), 2.76 (m, 2H), 2.90 (s, 3H), 2.93 (s, 3H), 3.12 (m, 5H), 3.38 (m, 2H), 3.55 (m, 2H), 3.63 (s, 6H), 4.41 (q,  $J=7.1$  Hz, 2H), 5.10 (s, 2H), 6.44 (d,  $J=8.3$  Hz, 2H), 6.92 (s, 1H), 7.2-7.4 (m, 9H) ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 12.5$  ( $\text{CH}_3$ ), 14.4 ( $\text{CH}_3$ ), 21.8 ( $\text{CH}_2$ ), 22.6 ( $\text{CH}_2$ ), 25.4 ( $\text{CH}$ ), 27.6 ( $\text{CH}_3$ ), 34.3 ( $\text{CH}_3$ ), 37.7 ( $\text{CH}_3$ ), 39.4 ( $\text{CH}_3$ ), 43.5 ( $\text{CH}_2$ ), 44.4, 45.6 ( $\text{CH}_2$ ), 50.8 ( $\text{CH}_3$ ), 53.4, 53.8 ( $\text{CH}_2$ ), 55.5 ( $\text{CH}_3$ ), 60.9 ( $\text{CH}_2$ ), 103.5 ( $\text{CH}$ ), 106.5 (C), 111.2 ( $\text{CH}$ ), 116.6 ( $\text{CH}$ ), 124.3 ( $\text{CH}$ ), 124.9 ( $\text{CH}$ ), 127.7 ( $\text{CH}$ ), 128.2 ( $\text{CH}$ ), 128.6 ( $\text{CH}$ ), 131.6 (C), 135.8 (C), 136.5 (C), 139.1 (C), 139.4 (C), 143.9 (C), 146.7 (C), 158.3 (C), 162.8 (C), 175.0 (C) ppm.

RP-HPLC-MS analysis of **31**:

**Compound 32, 1-(4-(((3-(((benzyloxy)carbonyl)(methyl)amino)propyl)-(methyl)amino)propyl)(methyl)carbamoyl)-2-isopropylphenyl)-5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid**



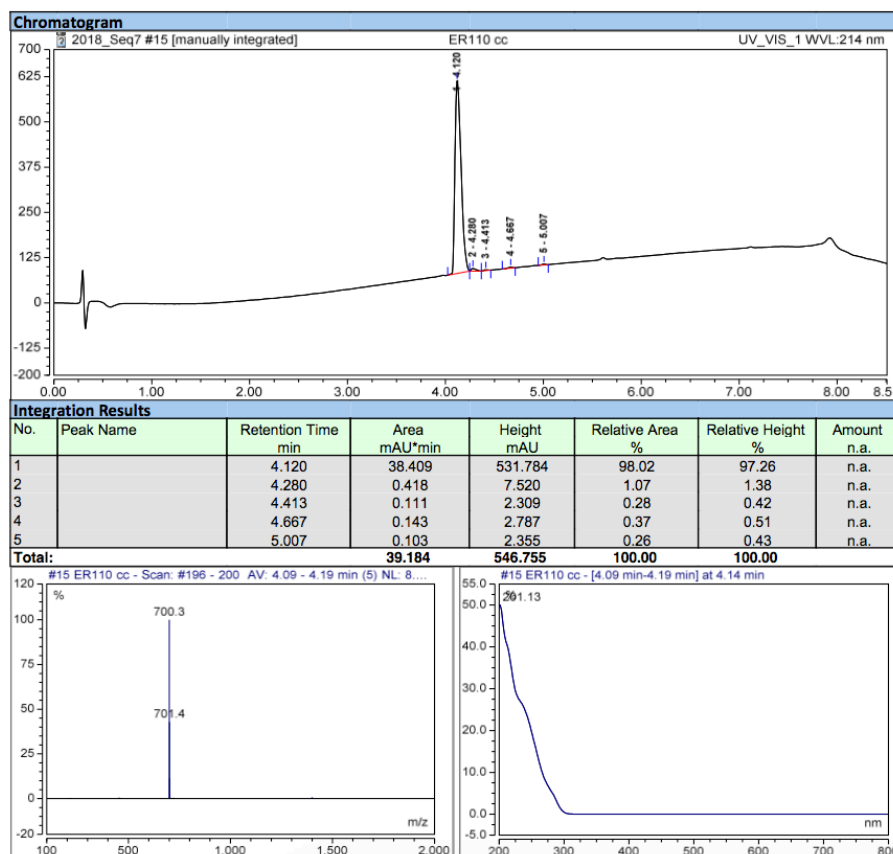
To a solution of **31** (0.1 g, 0.14 mmol, 1 equiv.) in dioxane (2 mL) was added a solution of 5M KOH (0.274 mL, 1.4 mmol, 10 equiv.). The yellow solution was stirred overnight at 40 °C.

The reaction mixture was concentrated under vacuum. The residue was dissolved in water and acidified to a pH of 2 with 1M HCl. The aqueous phase was extracted three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum to obtain a yellow oil (91 mg, 95%, purity: 98%).

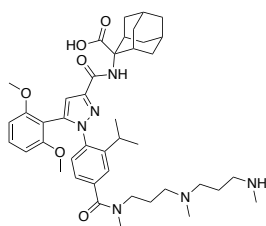
RP-HPLC-MS:  $t_r = 4.12$  min,  $m/z$  calculated for C<sub>39</sub>H<sub>49</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> 700.3, found 700.3.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 0.96$  (m, 6H), 2.03 (m, 4H), 2.69 (m, 1H), 2.77 (m, 2H), 2.90 (s, 3H), 2.93 (s, 3H), 3.0-3.2 (m, 5H), 3.4 (m, 2H), 3.5 (m, 2H), 3.6 (s, 6H), 5.11 (s, 2H), 6.44 (d,  $J=8.3$  Hz, 2H), 6.95 (s, 1H), 7.2-7.4 (m, 9H) ppm.



RP-HPLC-MS analysis of **32**:

**Compound 33, 2-(5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1-(2-isopropyl-4-(methyl-(3-(methyl-(3-(methylamino)-propyl)-amino)-propyl)-carbamoyl)-phenyl)-1H-pyrazole-3-carboxamido)-adamantane-2-carboxylic acid**



To a solution of **32** (75 mg, 0.11 mmol, 1 equiv.) in DMF (2 mL) was added  $\text{NEt}_3$  (45  $\mu\text{L}$ , 3.21 mmol, 3 equiv.) and HATU (44.9 mg, 0.12 mmol, 1.1 equiv.). The yellowish solution was stirred 20 min at RT. A solution of *tert*-butyl-2-aminoadamantane-2-carboxylate (**Synthon D**) (29.7 mg, 0.12 mmol, 1.1 equiv.) in DMF (1 mL) and  $\text{NEt}_3$  (29.8  $\mu\text{L}$ , 0.21 mmol, 2 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred for 4 h at RT. The reaction mixture was concentrated under vacuum to obtain an orange oil.

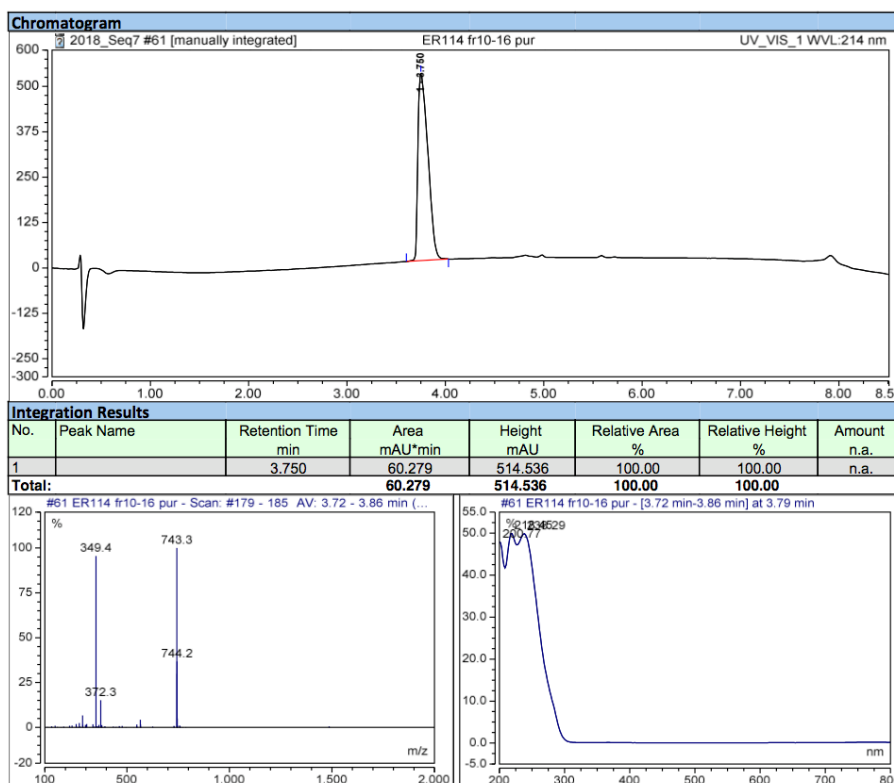
The intermediate was hydrogenated in EtOH (10 mL) and Pd/C 10% under an atmospheric pressure of  $\text{H}_2$ . The suspension was stirred at RT for 2 days. The reaction mixture was filtered on celite, and concentrated under vacuum to give an oil. Finally,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 mL), TFA (1 mL) and  $\text{H}_2\text{O}$  (0.1 mL) were added. The yellow solution was stirred at RT for 1.5 h. The reaction mixture was concentrated under vacuum and purified by semi-preparative RP-HPLC on a BetaBasic-18 column (A:  $\text{H}_2\text{O}$  0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 30% of B for 5 min, 30% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min) to obtain the product as a white powder (2 TFA salt, 29 mg, 27%, purity >99%).

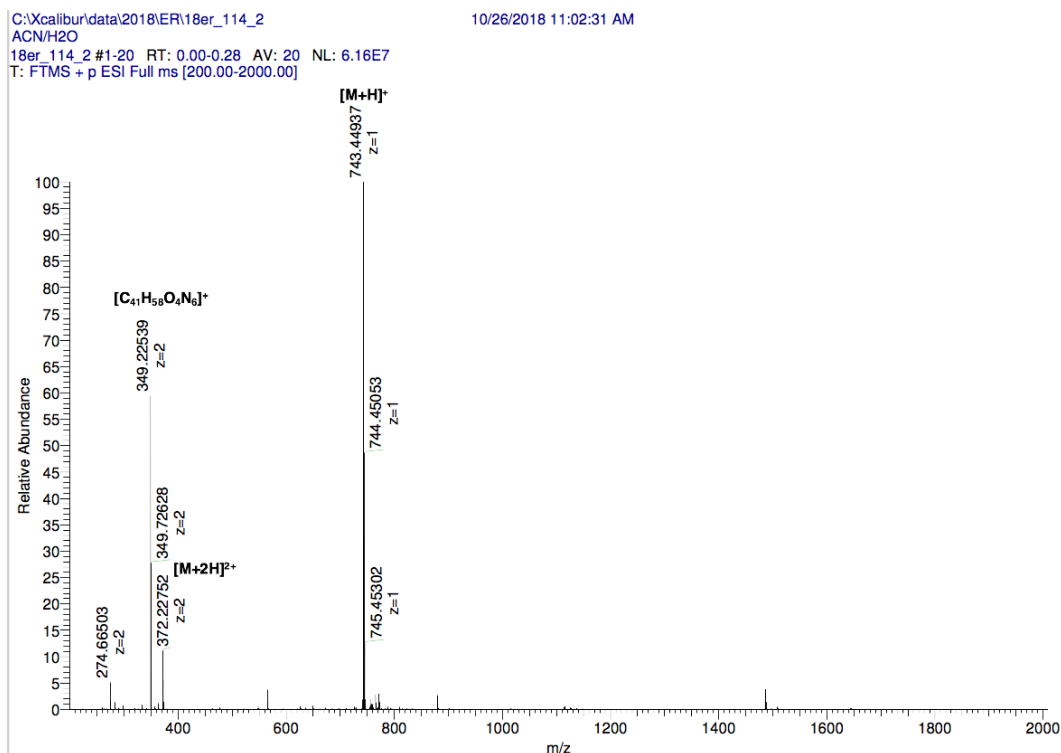
RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.75$  min,  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{N}_6\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  743.4, found 743.3.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 1.10 (s, 6H), 1.65-1.90 (m, 9H), 2.0-2.25 (m, 9H), 2.64 (m, 2H), 2.73 (s, 3H), 2.80 (m, 1H), 2.94 (s, 3H), 2.97 (s, 3H), 3.12 (m, 4H), 3.27 (m, 2H), 3.68 (s, 6H), 6.57 (d,  $J=8.5$  Hz, 2H), 6.79 (s, 1H), 7.28 (t,  $J=8.5$  Hz, 1H), 7.37 (d,  $J=8.1$  Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.57 (s, 1H) ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 18.4 ( $\text{CH}_3$ ), 23.1 ( $\text{CH}_2$ ), 23.9 ( $\text{CH}_2$ ), 29.0 ( $\text{CH}_2$ ), 29.3 ( $\text{CH}_2$ ), 29.9 (CH), 34.5 ( $\text{CH}_2$ ), 34.9 ( $\text{CH}_2$ ), 35.0 ( $\text{CH}_2$ ), 35.8 ( $\text{CH}_3$ ), 39.0 ( $\text{CH}_2$ ), 39.8 ( $\text{CH}_3$ ), 41.2 ( $\text{CH}_3$ ), 55.2 ( $\text{CH}_3$ ), 57.1 ( $\text{CH}_2$ ), 65.5 ( $\text{CH}_2$ ), 106.6 (C), 110.8 (CH), 126.2 (CH), 127.1 (CH), 130.2 (CH), 133.8 (C), 138.8 (C), 148.3 (C), 160.7 (C), 176.3 (C) ppm.

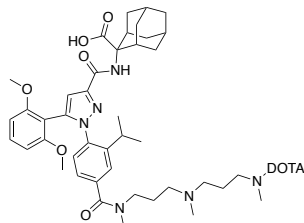
HRMS:  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{N}_6\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  743.44972, found 743.44937;  $m/z$  calculated for  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  372.22883, found 372.22752.

RP-HPLC-MS and HRMS analysis of **33**:





**Compound 3BP-227, 2-((1-(4-((3-((3-(DOTA-methylamino)-propyl)-methylamino)-propyl)-methyl-carbamoyl)-2-isopropylphenyl)-5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1H-pyrazole-3-carbonyl)-amino)-adamantane-2-carboxylic acid**

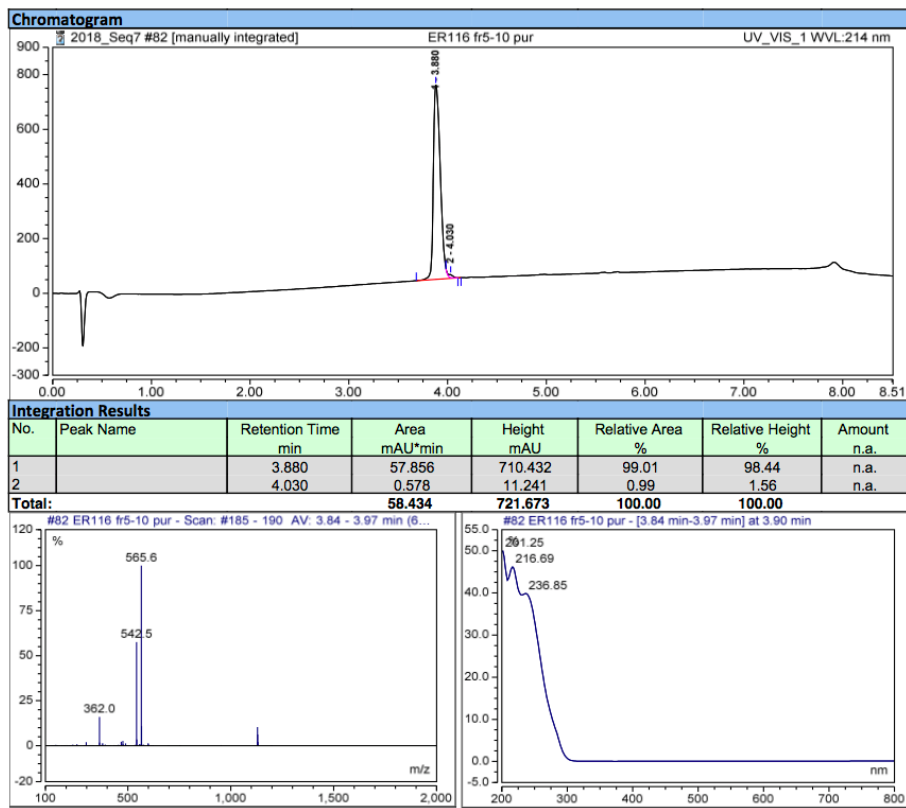


To a solution of **33** (TFA salt) (17 mg, 19.8  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) in anhydrous DMF (1 mL) and DIPEA (10.3  $\mu\text{L}$ , 59.4  $\mu\text{mol}$ , 3 equiv.) was added a solution of DOTA-NHS (30.16 mg, 39.6  $\mu\text{mol}$ , 2 equiv.) in anhydrous DMF (1 mL) with DIPEA (41.5  $\mu\text{L}$ , 0.24 mmol, 12 equiv.).

The reaction mixture was stirred overnight at RT. The reaction medium was concentrated under vacuum and the resulting oil was purified on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 30% of B for 5 min, 30% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product **3BP-227** was obtained as a white powder (4 TFA salt, 22.8 mg, 73%, purity: 99%). RP-HPLC-MS:  $t_r$  = 3.88 min,  $m/z$  calculated for C<sub>58</sub>H<sub>84</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1129.6, found 1129.8.

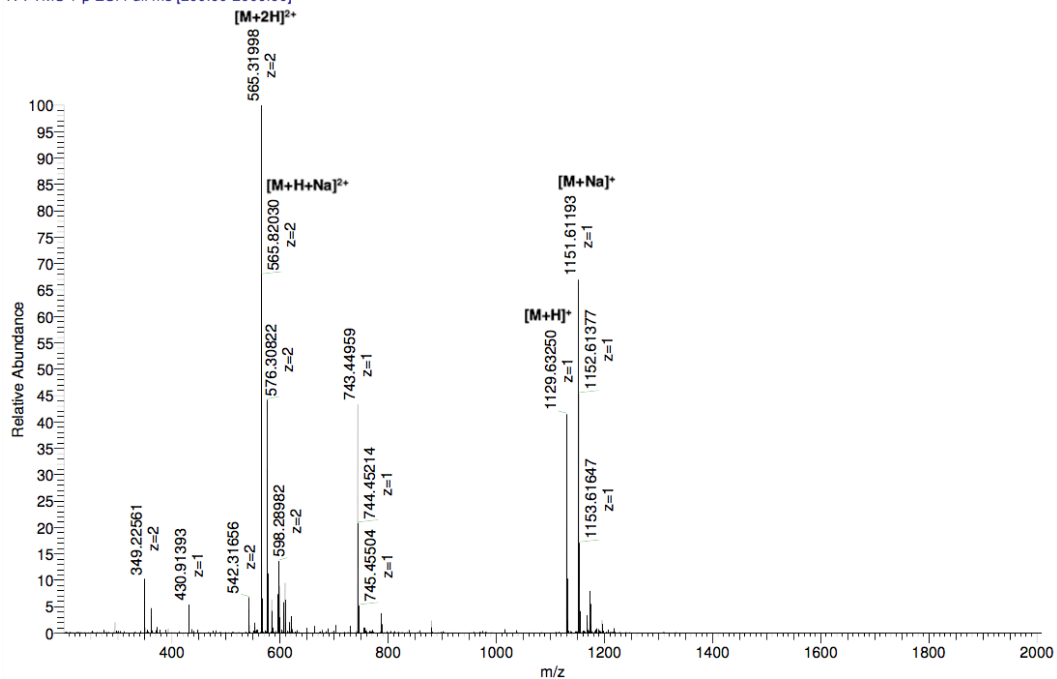
HRMS:  $m/z$  calculated for C<sub>58</sub>H<sub>84</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1129.62987, found 1129.63250;  $m/z$  calculated for [M+2H]<sup>2+</sup> 565.30309, found 565.31998.

RP-HPLC-MS and HRMS analysis of **3BP-227**:



C:\Xcalibur\data\2018\ER\18er\_116\_1  
 ACN/H2O  
 18er\_116\_1 #1-20 RT: 0.00-0.29 AV: 20 NL: 1.18E7  
 T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-2000.00]

10/26/2018 11:10:00 AM



### III.4. Metalation of peptides with $^{nat}\text{Ga}$

#### **General procedure**

The compounds were dissolved in acetate buffer (0.5 mL, 0.1 M, pH 3.48). A solution of  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  (1.5 equiv. for 3BP-227, DOTA-**20** (**21**), DOTAGA-**20** (**22**), NOTA-**20** (**23**), NODAGA-**20** (**24**) and THP-**20** (**25**) and 4 equiv. for bisNODAGA-**20** (**27**) and bisDOTAGA-**20** (**29**)) in acetate buffer (0.5 mL) was then added. The reaction mixture was stirred for 5 h at 40 °C. The excess of free gallium was removed by semi-preparative RP-HPLC.

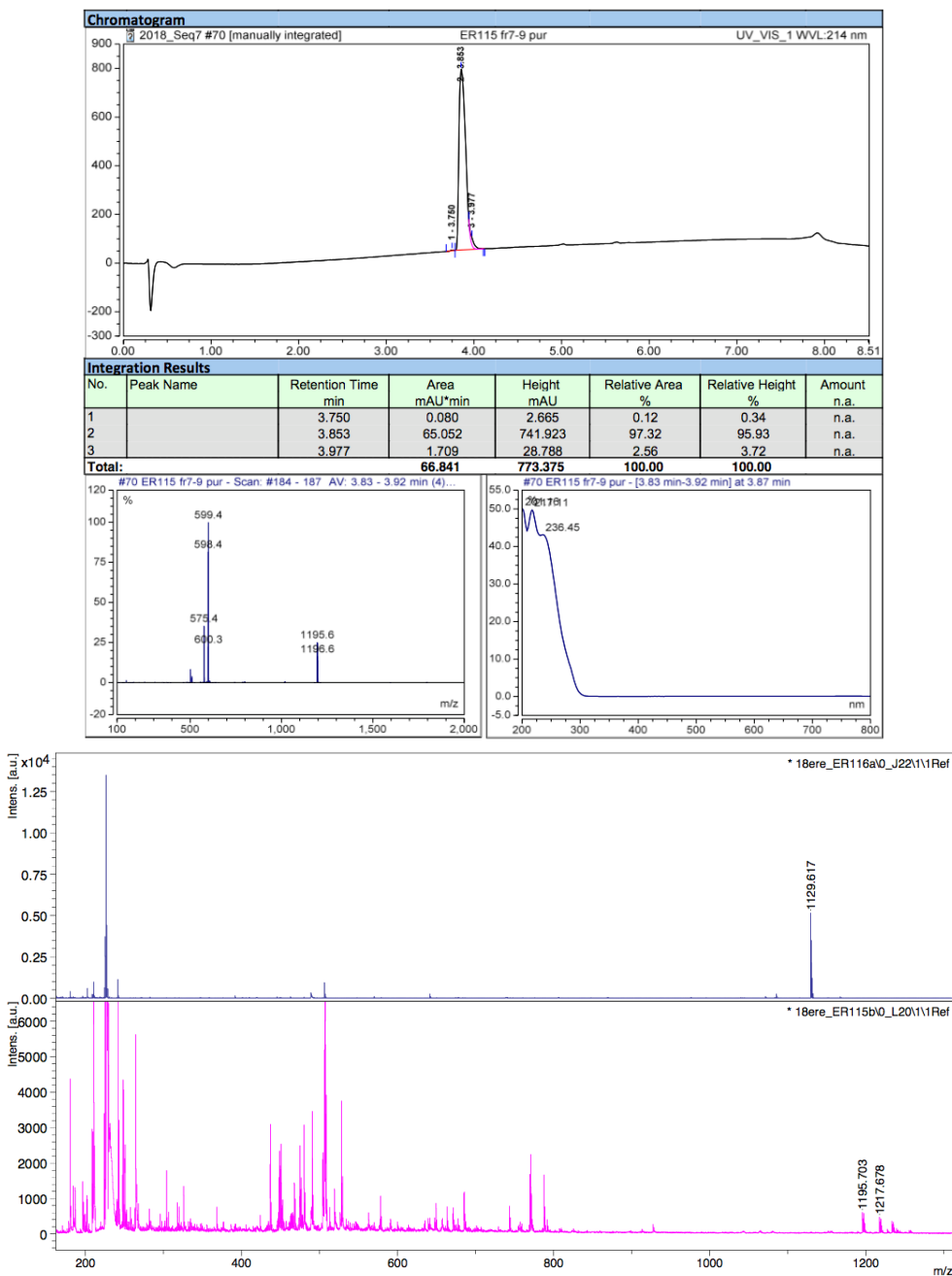
### Compound [<sup>nat</sup>Ga]Ga-3BP-227

Purification on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 30% of B for 5 min, 30% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min).

The product was obtained as a white powder (5 TFA salt, 5.8 mg, 49%, purity: 97%).

RP-HPLC-MS: *t<sub>r</sub>* = 3.85 min. MALDI-TOF: *m/z* calculated for C<sub>58</sub>H<sub>81</sub>GaN<sub>10</sub>O<sub>13</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1195.532, found 1195.703.

RP-HPLC-MS analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-3BP-227 and MALDI-TOF analysis of 3BP-227 (top) and [<sup>nat</sup>Ga]Ga-3BP-227 (bottom):



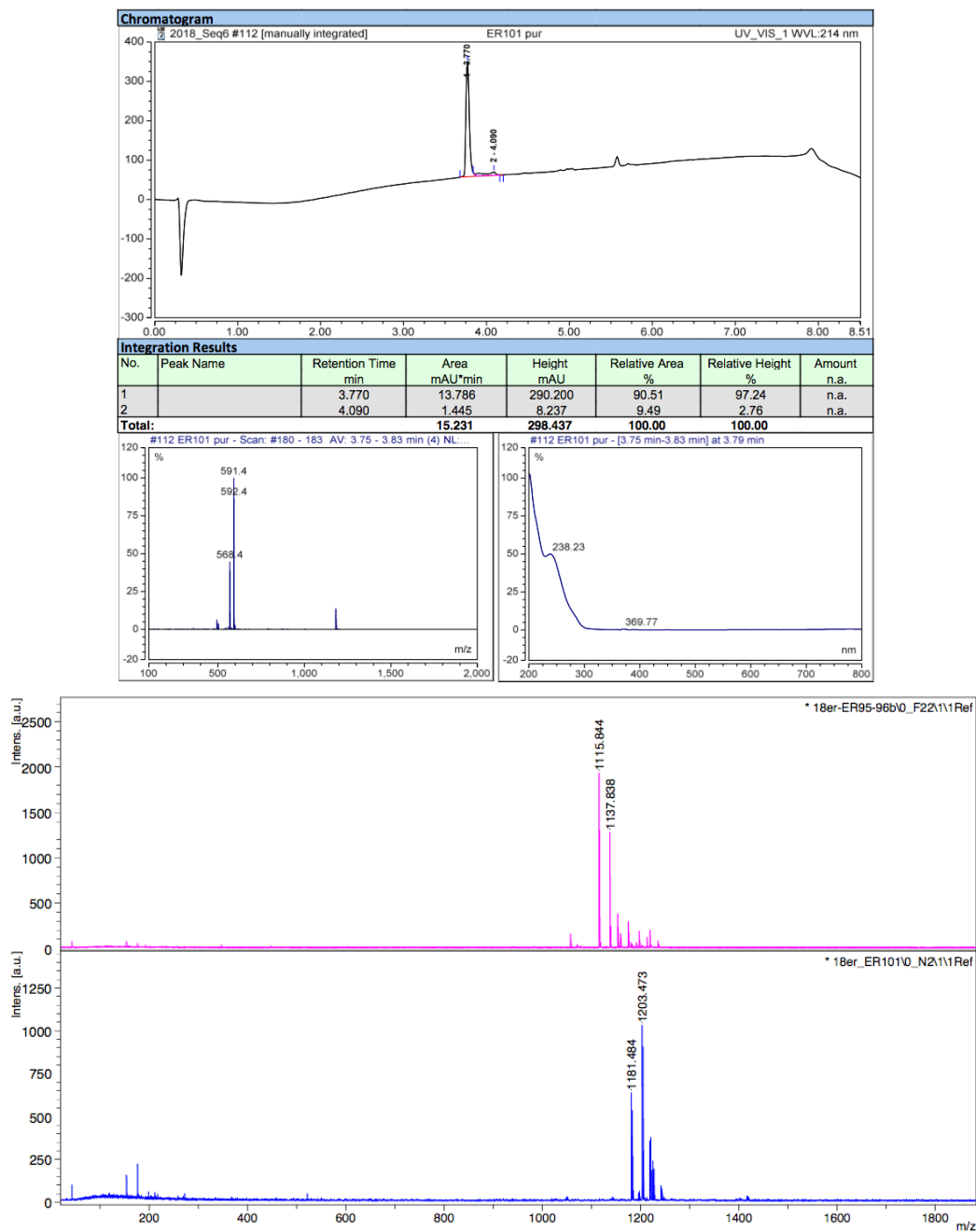
**Compound [<sup>nat</sup>Ga]Ga-21**

Purification on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 30% of B for 5 min, 30% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min).

The product was obtained as a white powder (3 TFA salt, 8.7 mg, 70%, purity: 97%).

RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.77$  min. MALDI-TOF:  $m/z$  calculated for C<sub>57</sub>H<sub>79</sub>GaN<sub>10</sub>O<sub>13</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1181.516, found 1181.844.

RP-HPLC-MS analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-21 and MALDI-TOF analysis of **21** (top) and [<sup>nat</sup>Ga]Ga-21 (bottom):



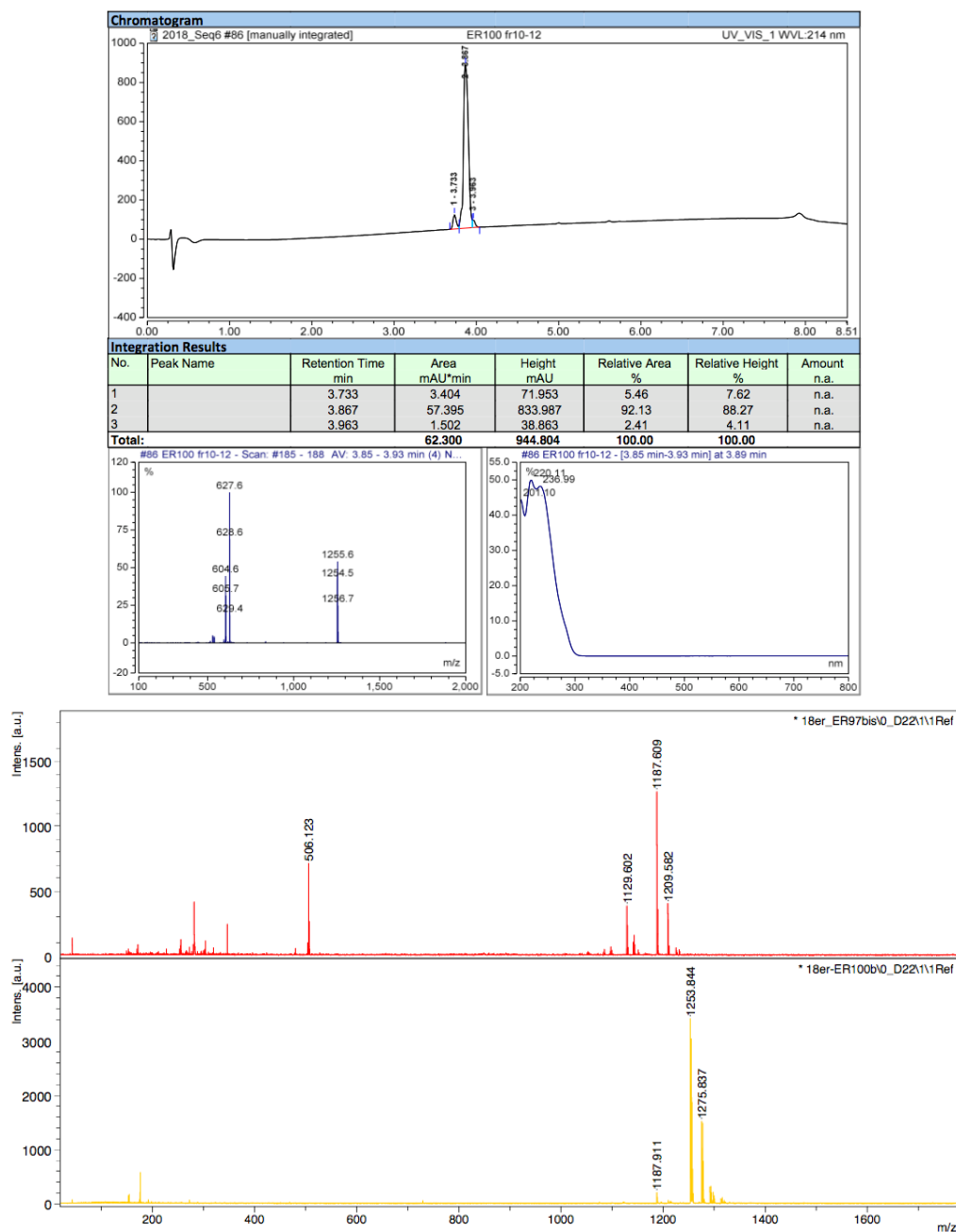
**Compound [<sup>nat</sup>Ga]Ga-22**

Purification on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 30% of B for 5 min, 30% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min).

The product was obtained as a white powder (5 TFA salt, 7.1 mg, 51%, purity: 92%).

RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.87$  min. MALDI-TOF:  $m/z$  calculated for C<sub>60</sub>H<sub>82</sub>GaN<sub>10</sub>O<sub>15</sub><sup>-</sup> [M+H]<sup>+</sup> 1252.530, found 1253.844.

RP-HPLC-MS analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-22 and MALDI-TOF analysis of **22** (top) and [<sup>nat</sup>Ga]Ga-22 (bottom):





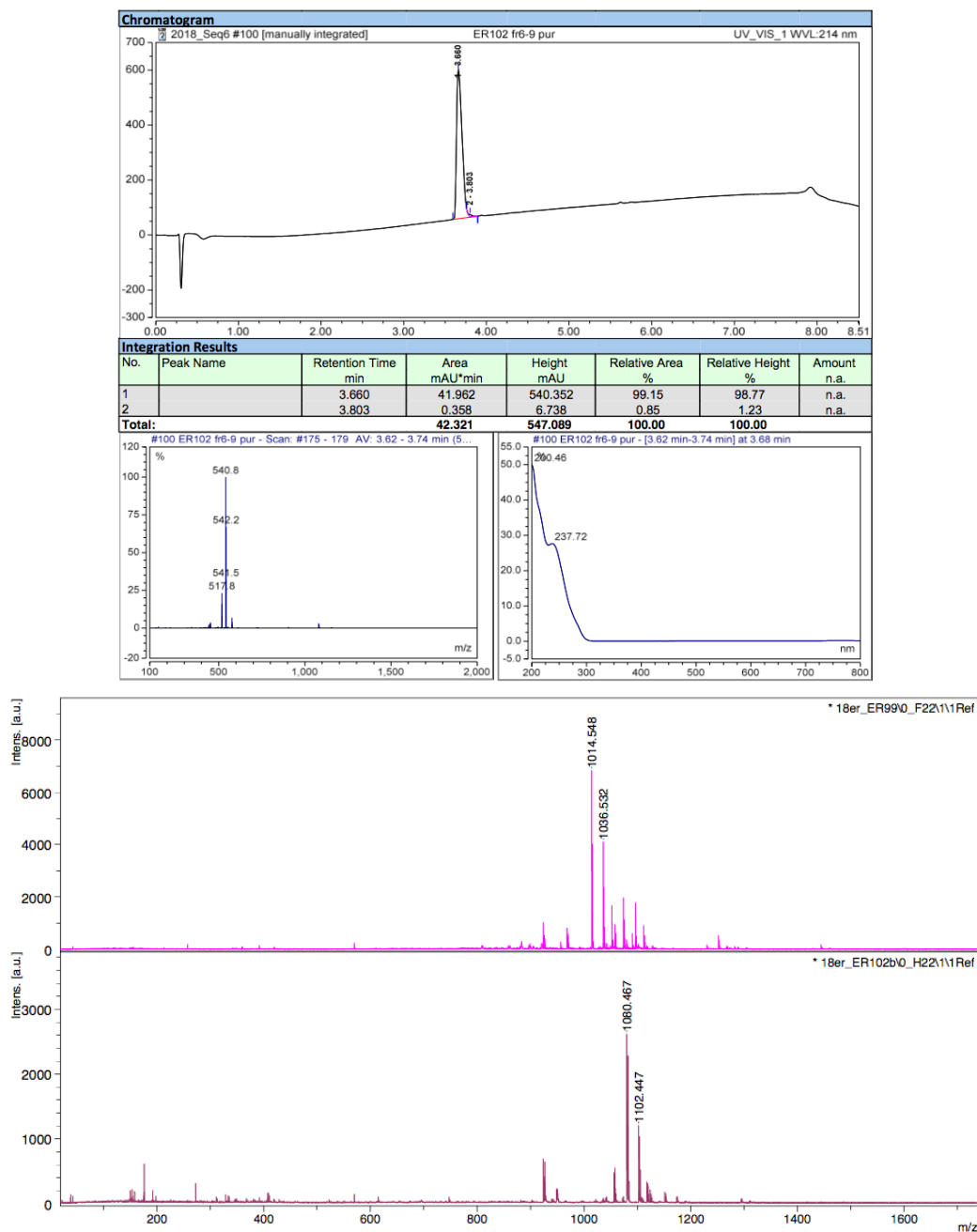
**Compound [<sup>nat</sup>Ga]Ga-23**

Purification on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 25% of B for 5 min, 25% to 50% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min).

The product was obtained as a white powder (3 TFA salt, 10.6 mg, 84%, purity: 99%).

RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.66$  min. MALDI-TOF:  $m/z$  calculated for C<sub>53</sub>H<sub>73</sub>GaN<sub>9</sub>O<sub>11</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 1081.476, found 1080.467.

RP-HPLC-MS analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-**23** and MALDI-TOF analysis of **23** (top) and [<sup>nat</sup>Ga]Ga-**23** (bottom):



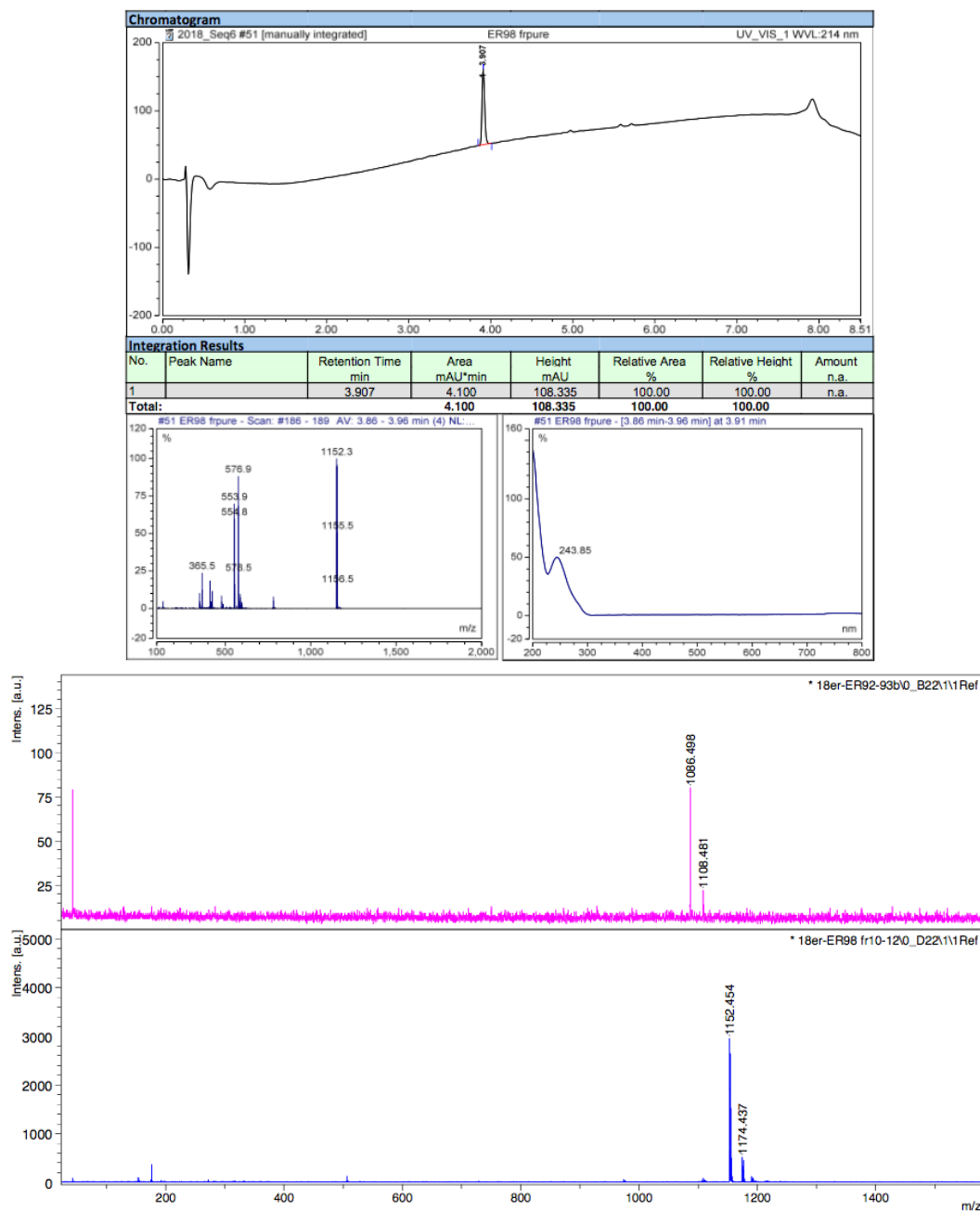
**Compound [<sup>nat</sup>Ga]Ga-24**

Purification on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 30% of B for 5 min, 30% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min).

The compound was obtained as a white powder (3 TFA salt, 4.35 mg, 35%, purity >99%).

RP-HPLC-MS: *t<sub>r</sub>* = 3.9 min. MALDI-TOF: *m/z* calculated for C<sub>56</sub>H<sub>76</sub>GaN<sub>9</sub>O<sub>13</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1152.490, found 1152.454.

RP-HPLC-MS analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-24 and MALDI-TOF analysis of **24** (top) and [<sup>nat</sup>Ga]Ga-24 (bottom):



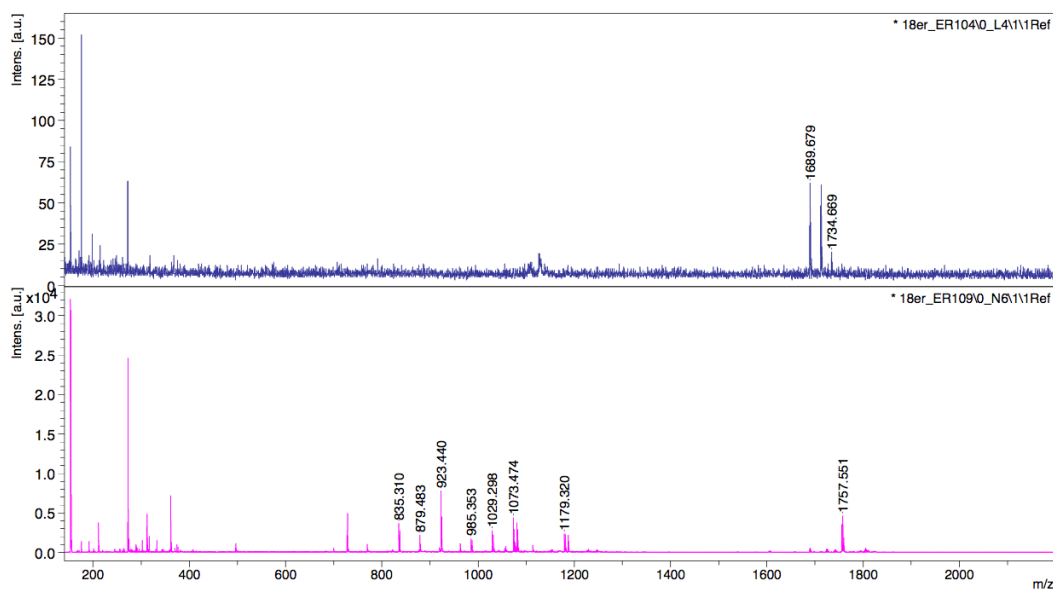
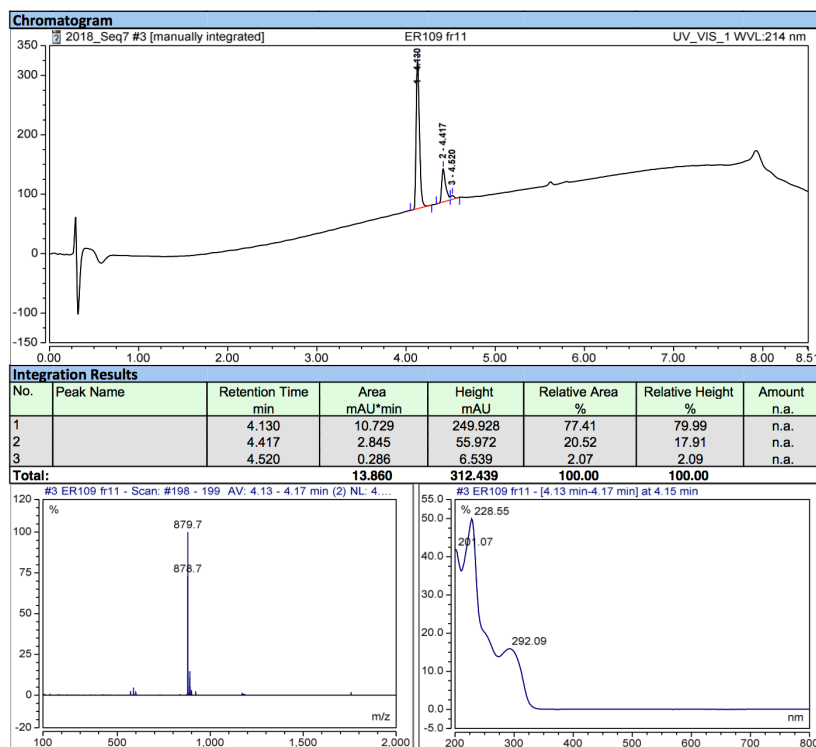
**Compound [<sup>nat</sup>Ga]Ga-25**

Purification on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 35% of B for 5 min, 35% to 60% of B in 40 min, at a flow rate of 20 mL/min).

The product was obtained as a white powder (9 TFA salt, 6 mg, 53%, purity: 77+20%).

RP-HPLC-MS:  $t_r = 4.2$  min. MALDI-TOF:  $m/z$  calculated for C<sub>86</sub>H<sub>109</sub>GaN<sub>16</sub>O<sub>16</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1755.698, found 1757.551.

RP-HPLC-MS analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-25 and MALDI-TOF analysis of **25** (top) and [<sup>nat</sup>Ga]Ga-25 (bottom):



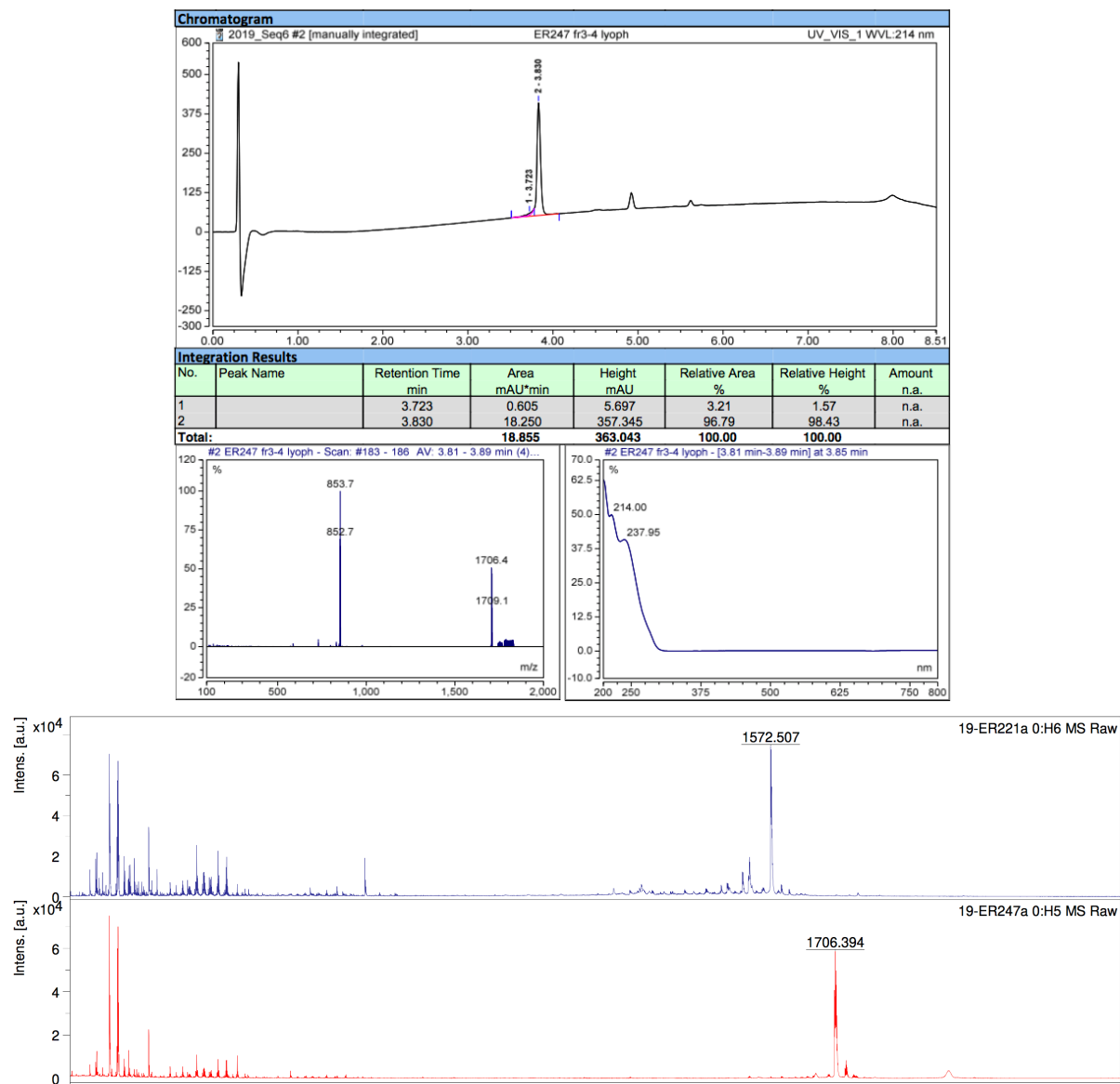
**Compound [<sup>nat</sup>Ga]Ga-27**

Purification on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 20% of B for 5 min, 20% to 60% of B in 40 min, at a flow rate of 20 mL/min).

The product was obtained as a white powder (3 TFA salt, 5.33 mg, 78%, purity: 96%).

RP-HPLC-MS: *t<sub>r</sub>* = 3.72 min. MALDI-TOF: *m/z* calculated for C<sub>77</sub>H<sub>108</sub>Ga<sub>2</sub>N<sub>14</sub>O<sub>21</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1706.643, found 1706.394.

RP-HPLC-MS analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-27 and MALDI-TOF analysis of **27** (top) and [<sup>nat</sup>Ga]Ga-27 (bottom):



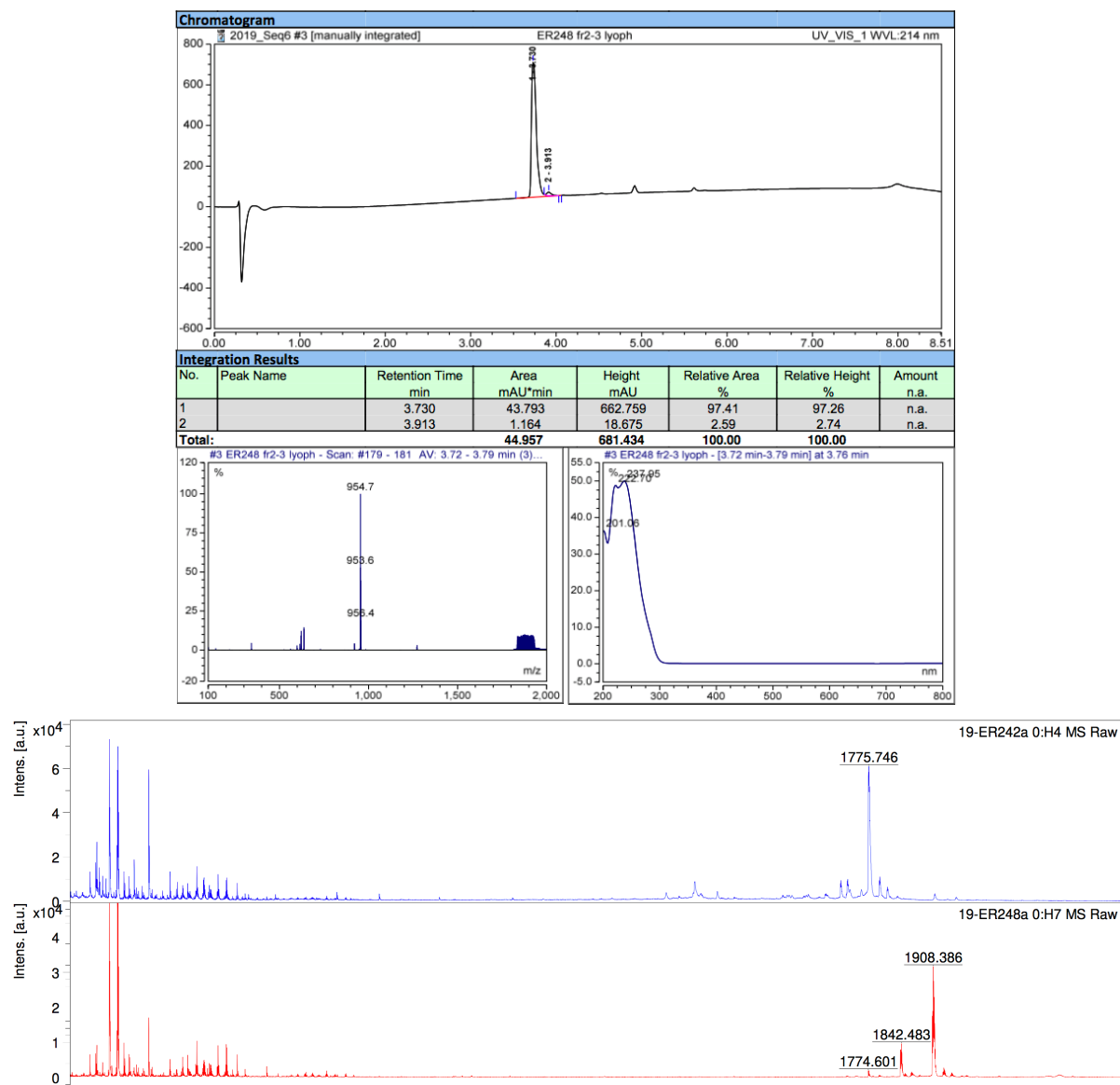
**Compound [<sup>nat</sup>Ga]Ga-29**

Purification on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 20% of B for 5 min, 20% to 60% of B in 40 min, at a flow rate of 20 mL/min).

The product was obtained as a white powder (3 TFA salt, 5.44 mg, 77%, purity: 97%).

RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.73$  min. MALDI-TOF:  $m/z$  calculated for C<sub>85</sub>H<sub>122</sub>Ga<sub>2</sub>N<sub>16</sub>O<sub>25</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1907.735, found 1908.386.

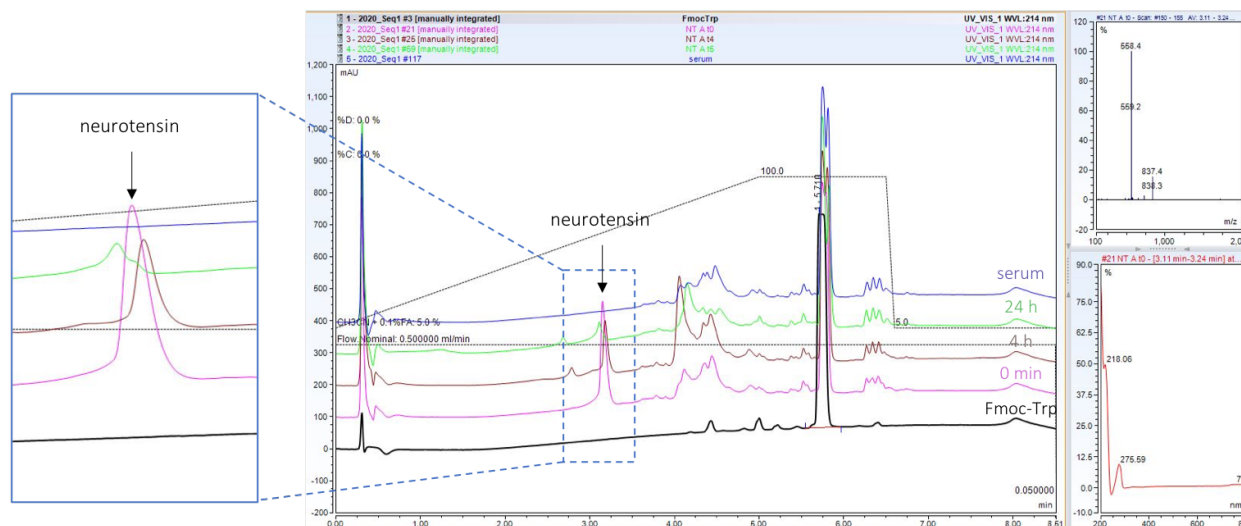
RP-HPLC-MS analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-29 and MALDI-TOF analysis of **29** (top) and [<sup>nat</sup>Ga]Ga-29 (bottom):



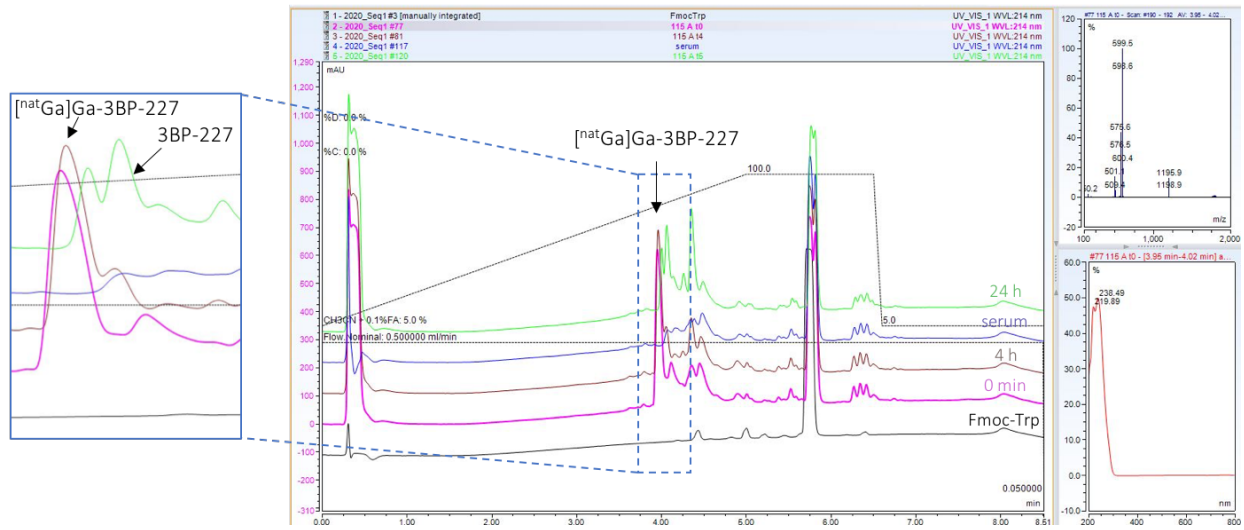
### III.5. *In vitro* stability

15  $\mu\text{L}$  of a 5 mM stock solution of compound in DMSO 50% (v/v) were stirred in a thermomixer (900 rpm, 37  $^{\circ}\text{C}$ , dark) with 135  $\mu\text{L}$  of mouse serum (Sigma Aldrich, M5905, batch SLBT4412). The final concentration in peptide was 0.5 mM. After 0 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h and 24 h, a sample (15  $\mu\text{L}$ ) of solution was collected and diluted with 60  $\mu\text{L}$  of ethanol 99%. 15  $\mu\text{L}$  of a 1 mM stock solution of Fmoc-Trp(tBu)-OH was added to the suspension for internal calibration. Samples were vortexed and centrifuged (10000 rpm, 10 minutes) to remove precipitated proteins. The supernatant was analyzed by RP-HPLC-MS at a wavelength of 260 nm on a RP Kinetex<sup>™</sup> column (Phenomenex) (2.6  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 50  $\times$  2.1 mm) with ultrapure water and HPLC-grade MeCN (A: H<sub>2</sub>O 0.1% FA and B: MeCN 0.1% FA). Analyses were performed with the following gradient program: 5% to 100% of B in 5 min, 100% B for 1.5 min, 100% to 5% B in 0.1 min and 5% B for 1.9 min, at a flow rate of 0.5 mL/min.

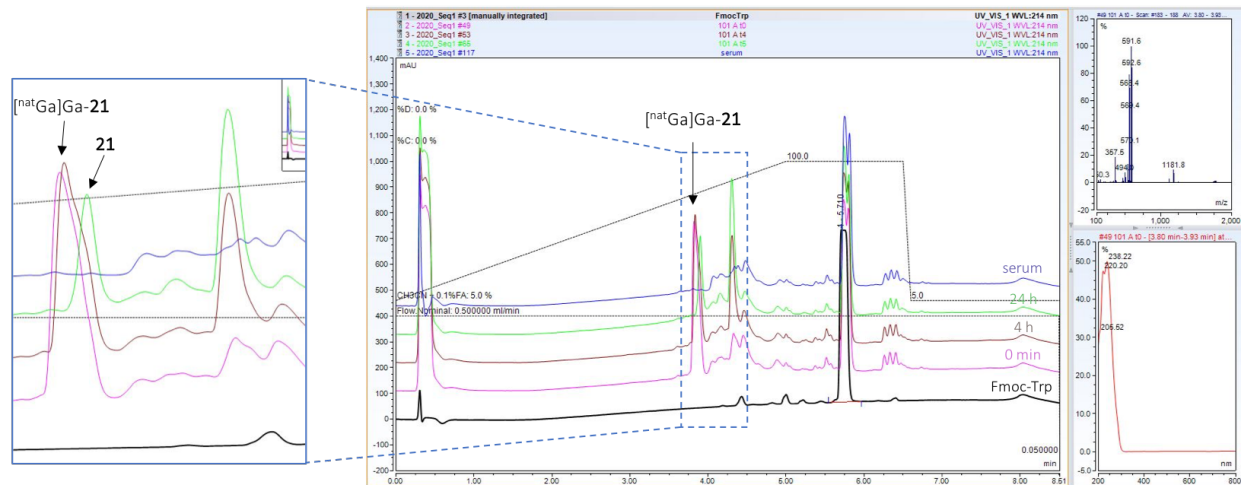
RP-HPLC-MS analysis of neurotensin after 0 min and 4 h and 24 h of incubation in mouse serum:



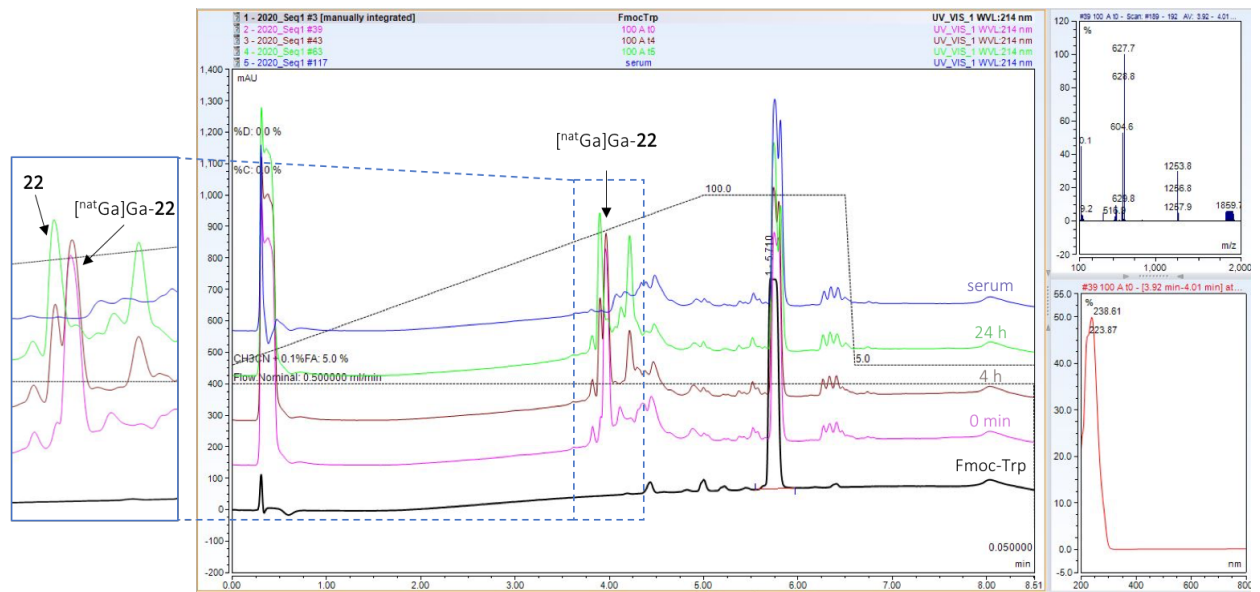
RP-HPLC-MS analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-3BP-227 after 0 min, 4 h and 24 h of incubation in mouse serum:



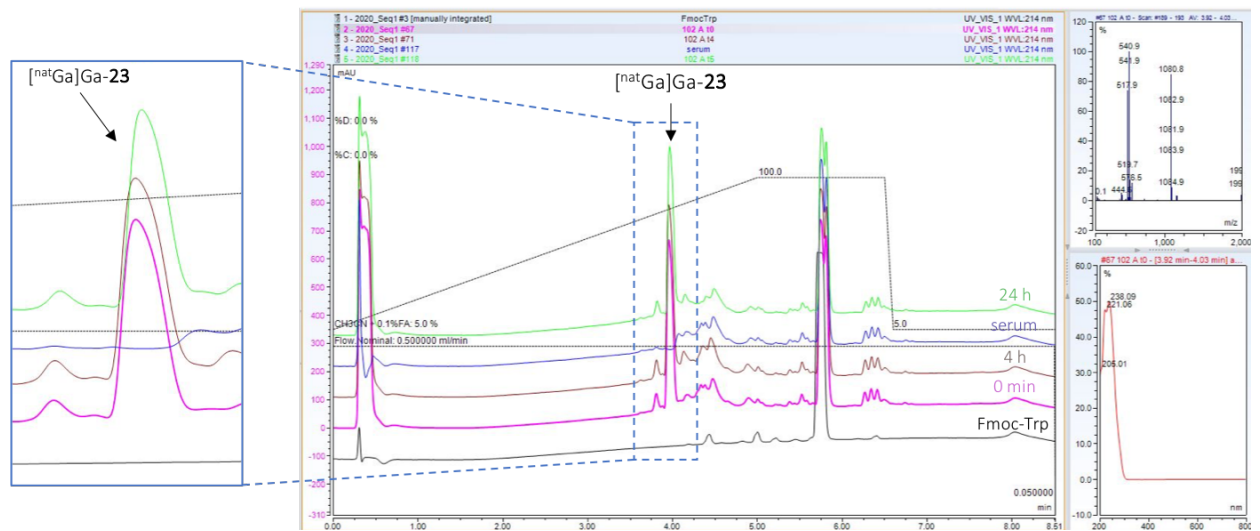
RP-HPLC-MS analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-21 after 0 min, 4 h and 24 h of incubation in mouse serum:



RP-HPLC-MS analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-22 after 0 min, 4 h and 24 h of incubation in mouse serum:

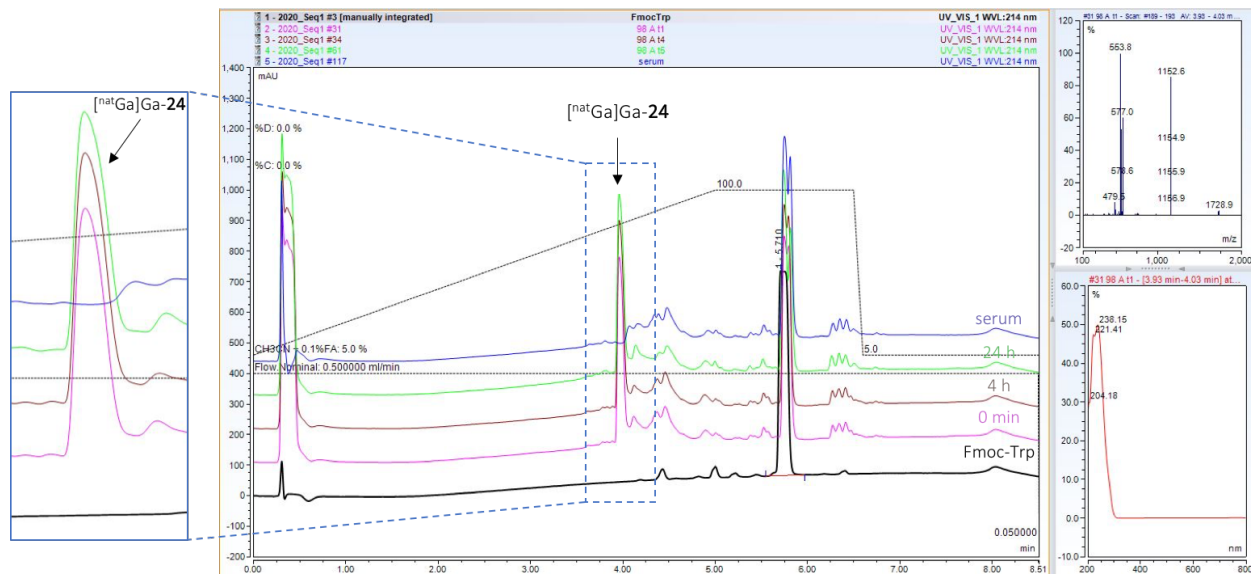


RP-HPLC-MS analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-23 after 0 min, 4 h and 24 h of incubation in mouse serum:

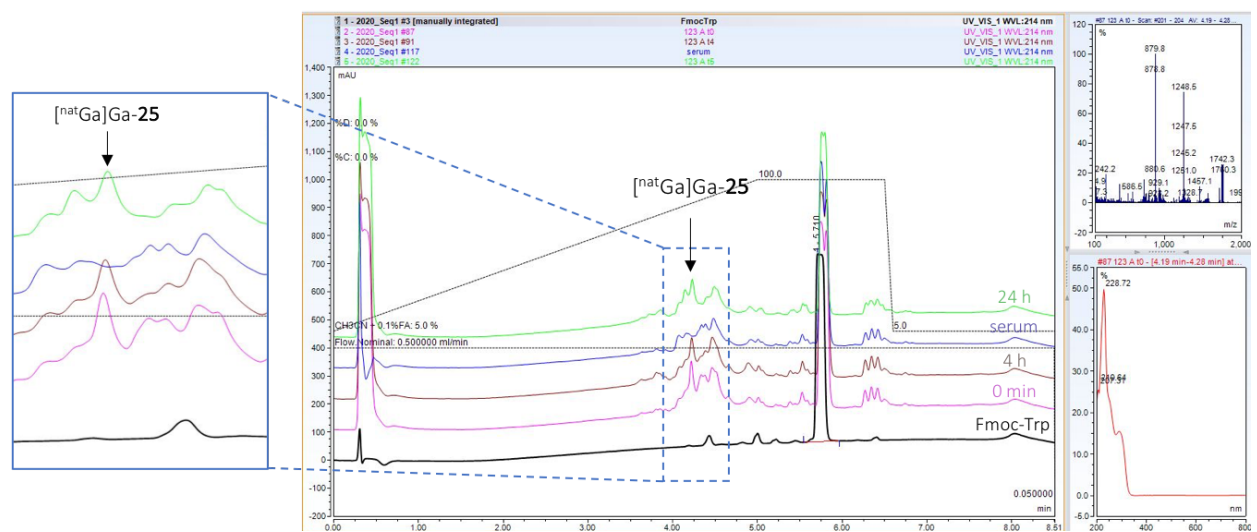




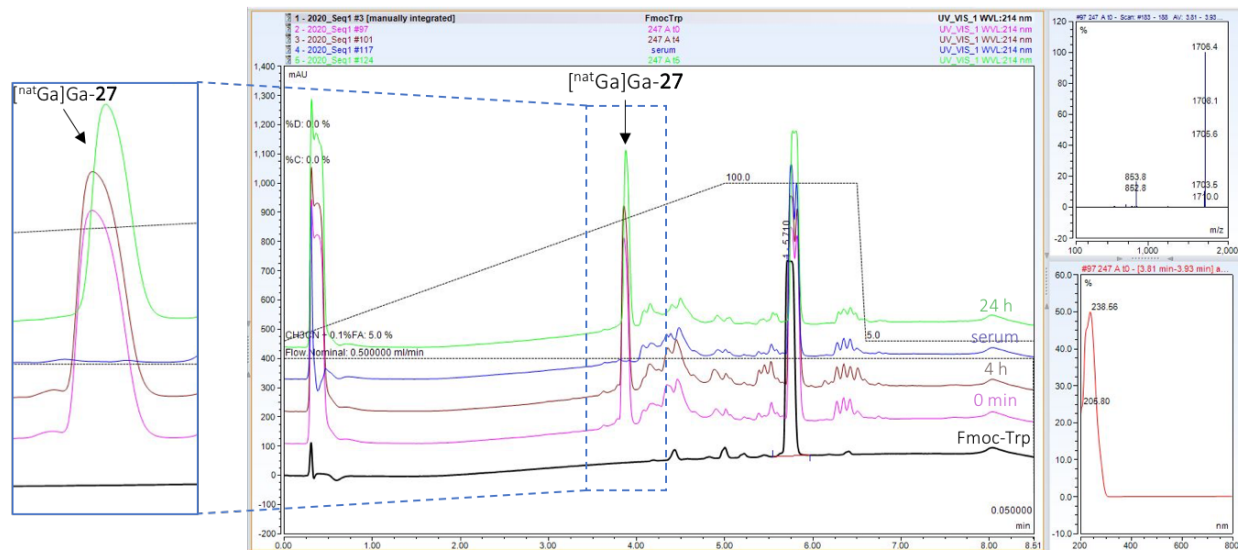
RP-HPLC-MS analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-24 after 0 min, 4 h and 24 h of incubation in mouse serum:



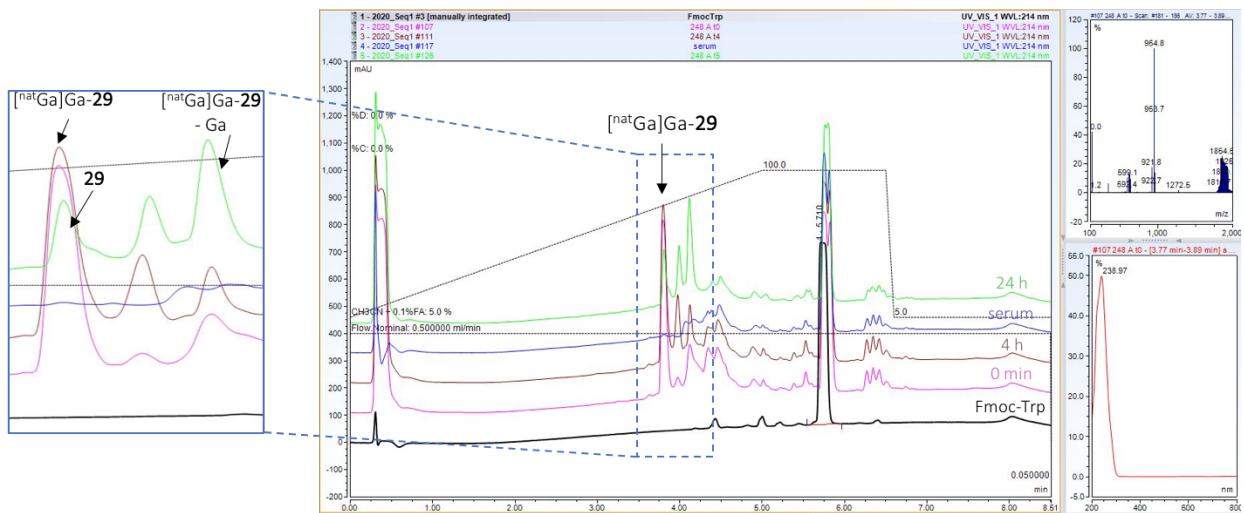
RP-HPLC-MS analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-25 after 0 min, 4 h and 24 h of incubation in mouse serum:



RP-HPLC-MS analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-27 after 0 min, 4 h and 24 h of incubation in mouse serum:



RP-HPLC-MS analysis of [<sup>nat</sup>Ga]Ga-29 after 0 min, 4 h and 24 h of incubation in mouse serum:



### III.6. *In vitro* binding affinity

The affinity of each compound [<sup>nat</sup>Ga]Ga-3BP-227, [<sup>nat</sup>Ga]Ga-**21**, [<sup>nat</sup>Ga]Ga-**22**, [<sup>nat</sup>Ga]Ga-**23**, [<sup>nat</sup>Ga]Ga-**24**, [<sup>nat</sup>Ga]Ga-**25**, [<sup>nat</sup>Ga]Ga-**27** and [<sup>nat</sup>Ga]Ga-**29** for NTS1 was determined on a competitive binding assay on human recombinant CHO cells overexpressing NTS<sub>1</sub>, using [<sup>125</sup>I]-Tyr<sup>3</sup>-neurotensin (0.05 nM;  $K_d = 0.22$  nM) as the radioligand (Eurofins). Non-specific binding was measured in presence of an excess of neurotensin (1  $\mu$ M). Experiments were performed in duplicate. Data was fitted by non-linear regression, using GraphPadPrism, 6.0 software. The minimum was set to 0. IC<sub>50</sub> values were converted into inhibition constants ( $K_i$ ) using the Cheng–Prusoff equation.

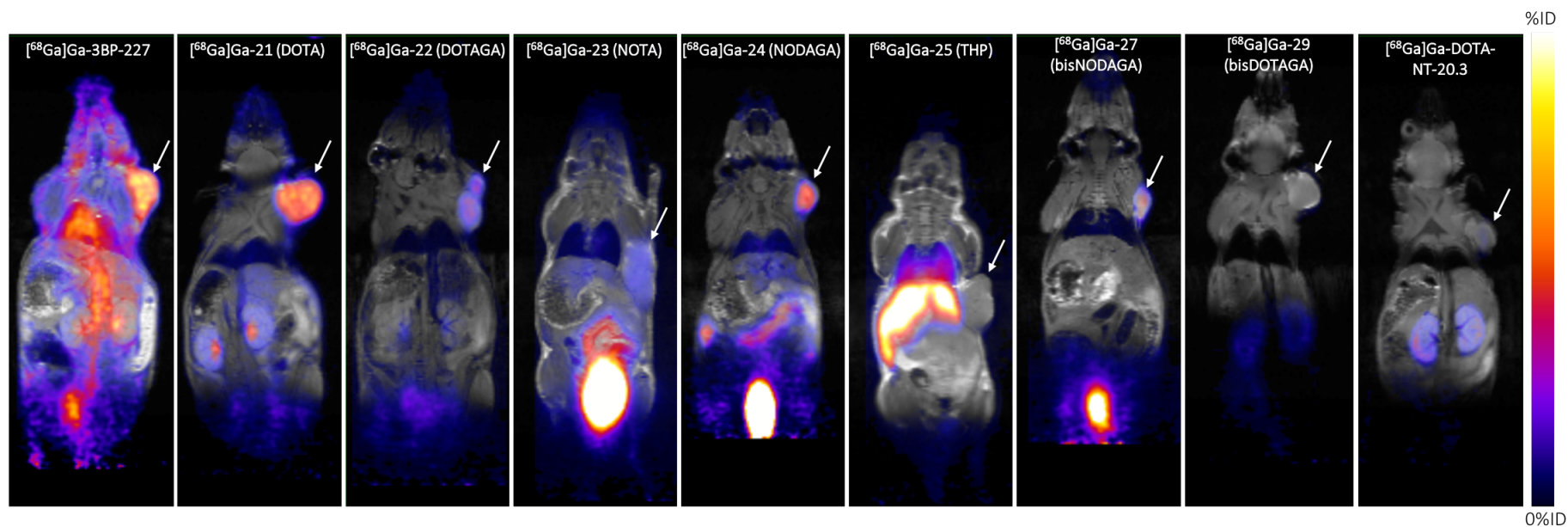
### III.7. Radiolabeling of compounds with <sup>68</sup>Ga

Compounds were radiolabeled using a Modular-Lab PharmTracer (Eckert & Ziegler). Fractional elution of the <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator gave a solution (1.5 mL, 90 MBq) which was added to a solution of 2.99 nmol of each compound in 150  $\mu$ L of EtOH (to limit radiolysis) and ammonium acetate buffer (1 M, pH 6.88) to adjust the pH to 3.5. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 5 min for the NOTA-, NODAGA- and THP-based compounds, and at 95 °C for 10 min for the DOTA- and DOTAGA-based compounds. The products were purified on a C<sub>18</sub> Sep-Pack cartridge (Waters, Milford, MA), eluted using 1000  $\mu$ L of 80% ethanol in the second reactor, and subsequently evaporated at 70 °C for 10 min under an argon flow. The final products were diluted with 0.9% sodium chloride (NaCl). HPLC quality control was performed using a HPLC system LC-2000 analytical series (Jasco) equipped with a Flowcount radioactivity detector (Bioscan). Separation was achieved using an RP Kinetex™ column (Phenomenex) (2.6  $\mu$ m, 100 Å, 50  $\times$  2.1 mm) with ultrapure water and HPLC-grade MeCN (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA and B: MeCN 0.1% TFA). Analyses were performed with the following gradient program: 5% to 95% of B in 5 min, 95% B for 1.5 min, at a flow rate of 0.5 mL/min. The quantity of colloids was evaluated using a system of two instant thin layer chromatography (iTLC) using citrate sodium and NH<sub>4</sub>Ac/MeOH as mobile phase.

### III.8. Small animal PET imaging and biodistribution studies

HT-29 tumor bearing mice (8 weeks old,  $10 \times 10^6$  cells per mouse injected subcutaneously in the right flank) were intravenously injected in the tail vein with 3 to 8 MBq of each radiotracer based on a consistent number of picomoles being injected (500 pmol). Static PET and MRI images were simultaneously recorded 90 min p.i. for 30 min. The mice were awakened between the administration of the tracer and imaging times. Images were recorded in a dual-ring SiPM microPET fully integrated in a 7T preclinical MRI (MR Solutions, Guilford, UK). The animals were kept under anesthesia using 2% isoflurane in oxygen and positioned in a dedicated heating cradle during imaging. Respiratory gating was performed with abdominal pressure sensor and dedicated software (PC Sam, SAIL, Stony Brook, US). List-mode data were collected in the PET system during 30 min. Coronal T1 weighted fast spin echo MR images were acquired with respiratory gating and the following parameters: 16 slices with a time of repetition (TR) of 1000 ms, time of echo (TE) of 11 ms. 3 signal averages, 1 mm slice thickness, field of view (FOV) of 70 mm and 256x256 pixels matrix. Images were reconstructed with the 3D ordered subset expectation maximization (OSEM) algorithm implemented in the system using 2 iterations, 32 subsets and an isotropic voxel size of 0.28 mm. An energy window of 250-750 keV and a coincidence time window of 8 ns were applied to the list-mode data. The algorithm takes into account normalization, random and decay corrections. No attenuation correction was applied. Two hours post-injection, mice were sacrificed and the main organs and tissues were dissected, weighed, and  $\gamma$ -counted (1480 Wizard 3, PerkinElmer). Blocking experiments were performed by co-injecting an excess (100 equivalents) of SR142948A. Tumor or tissue uptake are expressed as mean  $\pm$  SD percentage injected dose per gram (%ID/g), corrected for radionuclide decay.

PET-MRI images between 1.5 h and 2 h p.i. of all compounds evaluated in this study ; the coronal slices have been centered on tumor, the white arrow shows the tumor:





*Ex vivo* biodistribution of all compounds of this chapter ; values are expressed as the percentage of injected dose per gram of tissue (%ID/g  $\pm$  SD):

	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-3BP-227	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-21	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-22	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-23	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-24	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-25	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-27	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-29	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-DOTA-NT20.3
Uptake (%ID/g)	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4
Blood	9.155 $\pm$ 0.705	1.083 $\pm$ 0.222	0.658 $\pm$ 0.039	1.330 $\pm$ 0.654	1.915 $\pm$ 0.526	2.058 $\pm$ 0.681	0.393 $\pm$ 0.108	0.135 $\pm$ 0.031	0.088 $\pm$ 0.017
Liver	3.725 $\pm$ 2.181	0.908 $\pm$ 0.129	0.523 $\pm$ 0.025	1.183 $\pm$ 0.325	1.005 $\pm$ 0.211	41.978 $\pm$ 8.060	0.387 $\pm$ 0.072	0.250 $\pm$ 0.057	0.103 $\pm$ 0.022
Gallbladder	4.240 $\pm$ 1.786	3.347 $\pm$ 3.208	2.803 $\pm$ 1.062	-	10.610 $\pm$ 12.404	-	1.363 $\pm$ 0.993	0.367 $\pm$ 0.040	0.108 $\pm$ 0.071
Kidneys	4.775 $\pm$ 1.055	2.525 $\pm$ 0.641	1.943 $\pm$ 0.525	2.540 $\pm$ 0.713	3.775 $\pm$ 1.811	3.418 $\pm$ 1.838	3.377 $\pm$ 0.425	3.353 $\pm$ 0.523	5.705 $\pm$ 1.457
Spleen	1.610 $\pm$ 0.147	0.408 $\pm$ 0.085	0.310 $\pm$ 0.174	0.445 $\pm$ 0.177	0.448 $\pm$ 0.141	46.390 $\pm$ 9.291	0.207 $\pm$ 0.025	0.118 $\pm$ 0.019	0.113 $\pm$ 0.026
Heart	3.518 $\pm$ 0.843	0.555 $\pm$ 0.102	0.335 $\pm$ 0.019	0.518 $\pm$ 0.205	0.750 $\pm$ 0.249	0.963 $\pm$ 0.275	0.167 $\pm$ 0.038	0.103 $\pm$ 0.021	0.053 $\pm$ 0.019
Lungs	4.675 $\pm$ 0.429	1.060 $\pm$ 0.164	0.678 $\pm$ 0.194	1.165 $\pm$ 0.527	1.285 $\pm$ 0.452	12.680 $\pm$ 4.081	0.437 $\pm$ 0.071	0.255 $\pm$ 0.031	0.173 $\pm$ 0.036
Muscle	0.985 $\pm$ 0.114	0.348 $\pm$ 0.345	0.205 $\pm$ 0.044	0.413 $\pm$ 0.114	1.475 $\pm$ 0.997	0.500 $\pm$ 0.156	0.210 $\pm$ 0.061	0.138 $\pm$ 0.083	0.025 $\pm$ 0.010
Intestine	2.018 $\pm$ 0.497	1.093 $\pm$ 2.507	0.678 $\pm$ 0.127	4.080 $\pm$ 1.272	4.293 $\pm$ 0.483	0.475 $\pm$ 0.151	0.267 $\pm$ 0.097	0.183 $\pm$ 0.083	0.405 $\pm$ 0.072
Carcass	4.253 $\pm$ 0.621	1.125 $\pm$ 0.098	1.043 $\pm$ 0.474	1.225 $\pm$ 0.513	1.603 $\pm$ 0.496	1.718 $\pm$ 0.465	0.610 $\pm$ 0.154	0.313 $\pm$ 0.036	0.160 $\pm$ 0.022
Tumor	11.238 $\pm$ 1.704	7.825 $\pm$ 0.560	3.978 $\pm$ 0.564	3.140 $\pm$ 0.286	8.148 $\pm$ 1.038	1.328 $\pm$ 0.350	4.917 $\pm$ 0.776	1.305 $\pm$ 0.062	1.655 $\pm$ 0.497

Tumor-to-organ ratios from the *ex vivo* biodistribution ; values are expressed as means  $\pm$  SD:

	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-3BP-227	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-21	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-22	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-23	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-24	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-25	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-27	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-29	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-DOTA-NT20.3
Tumor-to-organ ratios	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4
Blood	1.243 $\pm$ 0.279	7.540 $\pm$ 2.938	6.093 $\pm$ 1.173	2.788 $\pm$ 1.172	4.468 $\pm$ 1.085	0.670 $\pm$ 0.152	13.190 $\pm$ 4.216	10.028 $\pm$ 2.189	19.083 $\pm$ 5.778
Liver	3.638 $\pm$ 1.627	8.493 $\pm$ 1.681	6.355 $\pm$ 3.481	2.763 $\pm$ 0.534	8.225 $\pm$ 0.815	0.030 $\pm$ 0.047	12.767 $\pm$ 0.485	5.443 $\pm$ 1.342	16.455 $\pm$ 5.499
Gallbladder	3.008 $\pm$ 1.152	3.075 $\pm$ 2.966	1.533 $\pm$ 0.442	-	1.755 $\pm$ 2.381	-	5.907 $\pm$ 4.996	3.590 $\pm$ 0.426	12.337 $\pm$ 4.645
Kidneys	2.393 $\pm$ 0.346	3.125 $\pm$ 0.695	2.158 $\pm$ 0.655	1.288 $\pm$ 0.244	2.555 $\pm$ 1.116	0.468 $\pm$ 0.202	1.450 $\pm$ 0.053	0.393 $\pm$ 0.051	0.300 $\pm$ 0.110
Spleen	7.058 $\pm$ 1.426	19.360 $\pm$ 5.319	15.683 $\pm$ 6.892	7.770 $\pm$ 2.449	19.230 $\pm$ 4.444	0.028 $\pm$ 0.005	23.893 $\pm$ 3.485	11.355 $\pm$ 2.131	15.255 $\pm$ 6.235
Heart	3.408 $\pm$ 1.355	14.640 $\pm$ 5.641	11.965 $\pm$ 2.251	6.683 $\pm$ 2.103	11.543 $\pm$ 2.797	1.390 $\pm$ 0.116	29.800 $\pm$ 2.376	13.123 $\pm$ 2.672	26.483 $\pm$ 2.214
Lungs	2.438 $\pm$ 0.542	7.480 $\pm$ 2.430	6.300 $\pm$ 2.023	3.000 $\pm$ 0.896	6.718 $\pm$ 1.469	0.113 $\pm$ 0.034	11.280 $\pm$ 0.520	5.205 $\pm$ 0.962	9.903 $\pm$ 3.965
Muscle	11.588 $\pm$ 2.478	33.675 $\pm$ 19.096	20.353 $\pm$ 6.295	8.080 $\pm$ 2.482	4.814 $\pm$ 2.069	2.753 $\pm$ 0.640	24.940 $\pm$ 8.603	12.058 $\pm$ 6.012	57.500 $\pm$ 10.037
Intestine	5.665 $\pm$ 0.527	7.145 $\pm$ 2.064	6.125 $\pm$ 2.026	0.808 $\pm$ 0.167	1.900 $\pm$ 0.177	2.843 $\pm$ 0.257	19.747 $\pm$ 5.633	8.843 $\pm$ 5.184	4.290 $\pm$ 1.899
Carcass	2.645 $\pm$ 0.207	7.548 $\pm$ 2.582	4.233 $\pm$ 1.444	2.840 $\pm$ 0.898	5.345 $\pm$ 1.351	0.778 $\pm$ 0.074	8.250 $\pm$ 1.533	4.220 $\pm$ 0.528	10.290 $\pm$ 2.606

*Ex vivo* biodistribution of blocking experiment of [<sup>68</sup>Ga]Ga-**21** (DOTA), [<sup>68</sup>Ga]Ga-**22** (DOTAGA) and [<sup>68</sup>Ga]Ga-**27** (bisNODAGA) ; values are expressed as the percentage of injected dose per gram of tissue (%ID/g ± SD):

	[ <sup>68</sup> Ga]Ga- <b>21</b>	[ <sup>68</sup> Ga]Ga- <b>21</b> blocked	[ <sup>68</sup> Ga]Ga- <b>22</b>	[ <sup>68</sup> Ga]Ga- <b>22</b> blocked	[ <sup>68</sup> Ga]Ga- <b>27</b>	[ <sup>68</sup> Ga]Ga- <b>27</b> blocked
Uptake (%ID/g)	n = 4	n = 4	n = 4	n = 4	n = 4	n = 4
Blood	1.083 ± 0.222	1.160 ± 0.285	0.658 ± 0.039	0.750 ± 0.175	0.393 ± 0.108	0.315 ± 0.201
Liver	0.908 ± 0.129	0.883 ± 0.064	0.523 ± 0.025	0.393 ± 0.043	0.387 ± 0.072	0.453 ± 0.175
Gallbladder	3.347 ± 3.208	2.033 ± 0.753	2.803 ± 1.062	0.750 ± 0.225	1.363 ± 0.993	1.013 ± 0.866
Kidneys	2.525 ± 0.641	2.163 ± 0.374	1.943 ± 0.525	2.375 ± 0.394	3.377 ± 0.425	3.048 ± 0.473
Spleen	0.408 ± 0.085	0.430 ± 0.074	0.310 ± 0.174	0.295 ± 0.073	0.207 ± 0.025	0.243 ± 0.192
Heart	0.555 ± 0.102	0.513 ± 0.103	0.335 ± 0.019	0.365 ± 0.060	0.167 ± 0.038	0.195 ± 0.091
Lungs	1.060 ± 0.164	0.970 ± 0.122	0.678 ± 0.194	0.728 ± 0.155	0.437 ± 0.071	0.488 ± 0.199
Muscle	0.348 ± 0.345	0.940 ± 0.546	0.205 ± 0.044	0.387 ± 0.101	0.210 ± 0.061	0.350 ± 0.279
Intestine	1.093 ± 2.507	0.773 ± 0.087	0.678 ± 0.127	0.695 ± 0.243	0.267 ± 0.097	0.435 ± 0.492
Carcass	1.125 ± 0.098	1.208 ± 0.225	1.043 ± 0.474	0.880 ± 0.183	0.610 ± 0.154	0.803 ± 0.711
Tumor	<b>7.825 ± 0.560</b>	<b>2.338 ± 0.267</b>	<b>3.978 ± 0.564</b>	<b>1.780 ± 0.282</b>	<b>4.917 ± 0.776</b>	<b>0.985 ± 0.261</b>

## IV. Chapter 3 – Experimental part

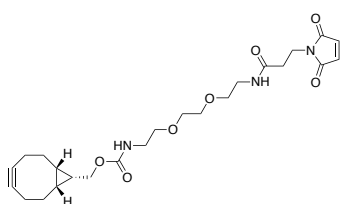
### IV.1. Production and characterization of 7D12

The cDNA encoding the sequences of V<sub>H</sub>H 7D12 was cloned into the vector pHENIX-C-LPETG-His<sub>8</sub>-Vsv, resulting in 7D12-C-LPETG-His<sub>8</sub>-Vsv, the cysteine providing a handle for maleimide conjugation, LPETG being a sortase A consensus recognition sequence and the His<sub>8</sub>-Vsv tag allowing Ni-based purification and Vsv-based detection. ER2566 E.Coli cells were transformed with these plasmids and were grown in 2xTY medium, and V<sub>H</sub>H expression was induced with 1 mM IPTG for 4 hours at 30 °C. Subsequently the periplasmic fraction was collected, and V<sub>H</sub>Hs were purified by incubating the supernatant with Ni-NTA sepharose beads (IBA, Goettingen, Germany) in 50 mM phosphate pH 7.4/500 mM NaCl for 1 h at 4 °C. After washing, His<sub>6</sub>-tagged sortase A was eluted from the beads with 500 mM imidazole. The eluate was dialyzed against 50 mM Tris pH 7.5/150 mM NaCl in a 3.5 kDa dialysis membrane. Purity and size were characterized with sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing conditions and a coomassie brilliant blue staining (CBB). The concentration of the 7D12 in g/L was calculated by UV spectrophotometry by using the extinction coefficient of 7D12 at 280 nm (35535 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>).

### IV.2. Synthesis and characterization

#### IV.1.1. Synthesis of BCN-PEG<sub>2</sub>-maleimide 34

##### Compound 34, BCN-PEG<sub>2</sub>-maleimide



To a solution of BCN-PEG<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (15 mg, 46 μmol, 1 equiv.) in DMF (0.5 mL) and DIPEA (16.1 μL, 92 μmol, 2 equiv.) was added a solution of maleimide-NHS (13.5 mg, 50.1 μmol, 1.1 equiv.) in DMF (0.5 mL). The resulting yellowish solution was stirred at RT. After 1 h, the reaction mixture was concentrated under vacuum and purified by semi-preparative HPLC on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% FA, B: MeCN 0.1% FA; with the following gradient program: 15% of B for 5 min, 15% to 65% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min) to give a colorless oil (9.1 mg, 41%, purity: 87%).

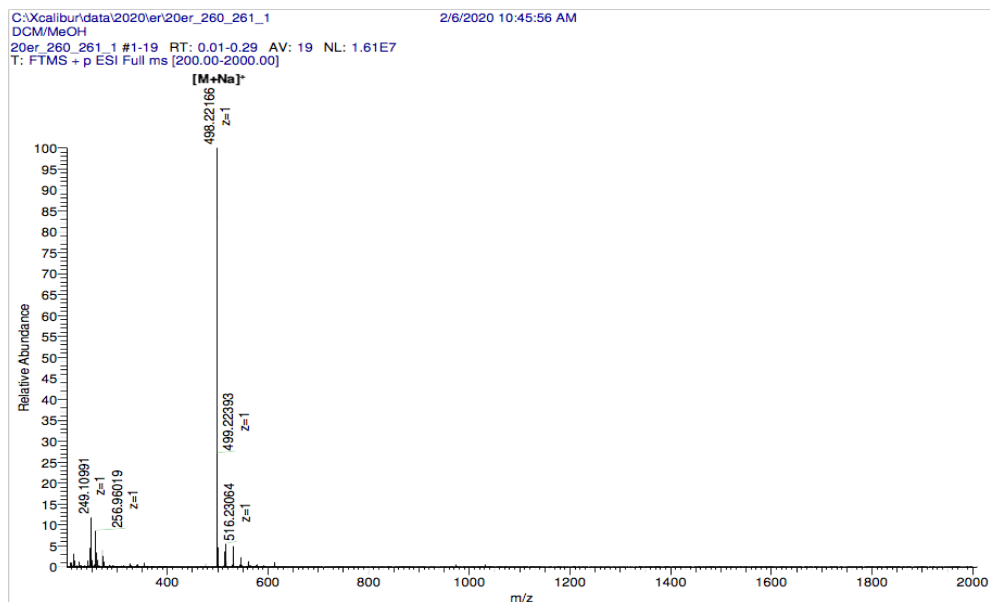
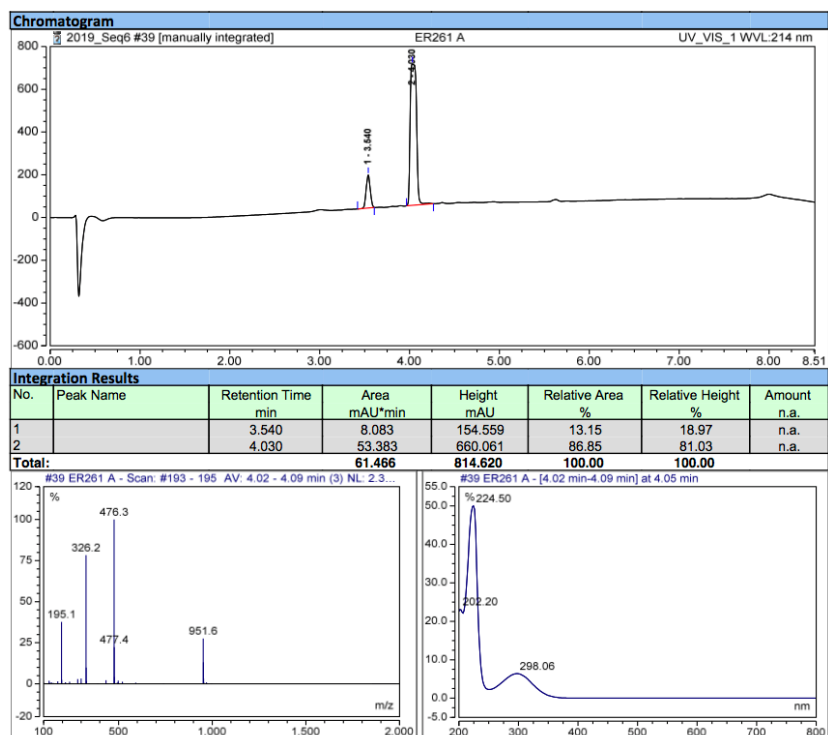
Note: this compound proved to be unstable, giving rise to unidentified products over time, even when stored at -80 °C. It was aliquoted as a 20 mM solution in DMSO and kept at -20 °C. RP-HPLC-MS: t<sub>r</sub> = 4 min, m/z calculated for C<sub>24</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> 476.2, found 476.3.



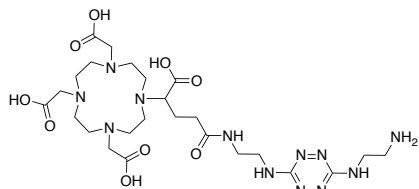
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.8-1.0 (m, 3H), 1.25 (m, 4H), 2.1-2.3 (m, 4H), 2.53 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H), 3.3-3.7 (m, 10H), 3.84 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H), 4.1 (m, 2H), 5.22 (br, 1H), 6.12 (br, 1H), 6.70 (d, 2H) ppm.

HRMS:  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  476.23185, found 498.22166.

RP-HPLC-MS and HRMS analysis of compound **34**:



## IV.1.2. Synthesis of disubstituted tetrazine with amine groups 37

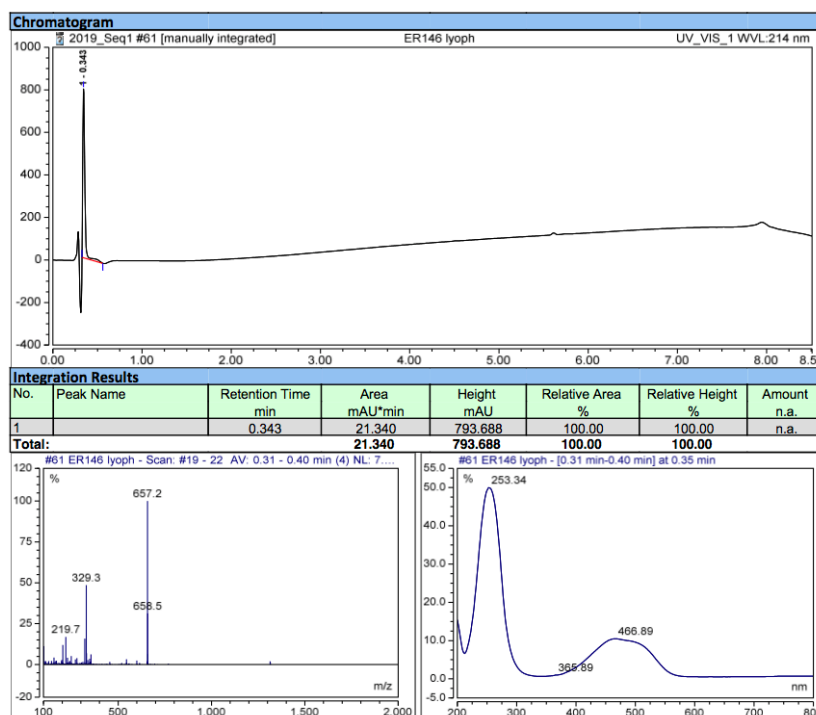
**Compound 36, DOTAGA-NH-Tz-NH<sub>2</sub>, 2,2',2''-(10-(4-((2-((6-((2-aminoethyl)amino)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)amino)ethyl)amino)-1-carboxy-4-oxobutyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid**

To a solution of DOTAGA-NH-Tz-Cl<sup>1</sup> (10 mg, 8.3 μmol, 1 equiv.) in borate buffer pH 8.6 (1 mL) was added ethylenediamine (16.7 μL, 249 μmol, 30 equiv.). The resulting orange solution was stirred at 75 °C. After 1 h, the mixture was purified on semi-preparative HPLC on a

BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA; with the following gradient program: 0% of B for 15 min, 0% to 30% of B in 30 min, at a flow rate of 20 mL/min) to obtain an orange powder 2 TFA salt (4.8 mg, 65%).

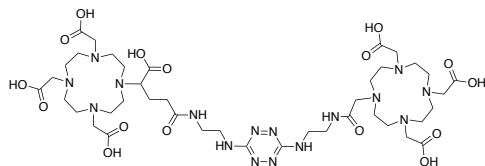
RP-HPLC-MS:  $t_r = 0.34$  min,  $m/z$  calculated for C<sub>25</sub>H<sub>44</sub>N<sub>12</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup> 657.3, found 657.2.

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 2.00 (m, 2H), 2.49 (m, 2H), 2.9-3.7 (m, 15H), 3.79 (m, 4H), 3.94 (m, 4H) ppm.

**RP-HPLC-MS analysis of compound 36:**

<sup>1</sup> Thèse de Coline Canovas - Développement de stratégies de bioconjugaison innovantes : Application à l'élaboration d'agents d'imagerie moléculaire - 2018

**Compound 37, DOTAGA-NH-Tz-NH-DOTA, 2,2',2''-(10-(2-((2-((6-((2-(4-carboxy-4-(4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)butanamido)ethyl)amino)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)amino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid**



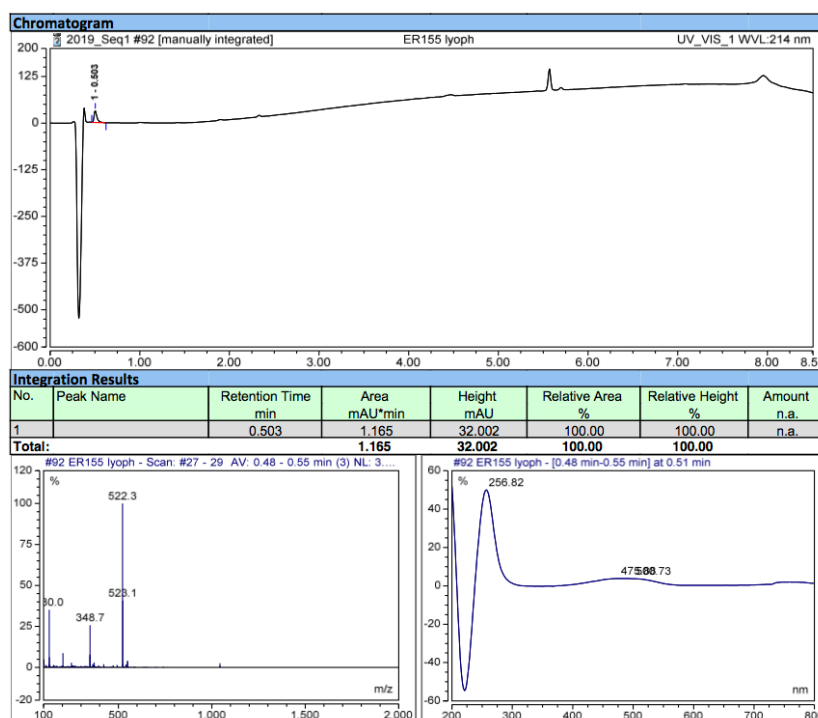
To a solution of DOTAGA-NH-Tz-NH<sub>2</sub> **36** (4 mg, 4.44 μmol, 1 equiv.) in DMF (200 μL) and DIPEA (4.5 μL, 26 μmol, 6 equiv.) was added a solution of DOTA-NHS (11.6 mg, 15.6 μmol, 3.5 equiv.) in DMF (200 μL), H<sub>2</sub>O

(100 μL) and DIPEA (9 μL, 52 μmol, 12 equiv.). The resulting orange solution was stirred at room temperature for 3 h. The mixture was then purified on semi-preparative HPLC on an Hypersil column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA; with the following gradient program: 0% of B for 15 min, 0% to 30% of B in 30 min, at a flow rate of 3.5 mL/min) to obtain an orange powder 2 TFA salt (3.1 mg, 55%).

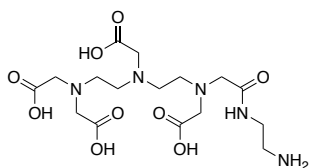
RP-HPLC-MS:  $t_r = 0.50$  min,  $m/z$  calculated for C<sub>41</sub>H<sub>70</sub>N<sub>16</sub>O<sub>16</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1043.5, found 1043.7 ;  $m/z$  calculated for [M+2H]<sup>2+</sup> 522.3, found 522.3.

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 1.90 (m, 4H), 2.39 (m, 2H), 2.49 (m, 2H), 2.9-3.3 (m, 16H), 3.3-3.5 (m, 16H), 3.5-3.7 (m, 10H), 3.74 (m, 3H), 3.84 (m, 7H) ppm ; <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 37.3 (CH<sub>2</sub>), 38.3 (CH<sub>2</sub>), 38.6 (CH<sub>2</sub>), 40.2 (CH<sub>2</sub>), 42.6 (CH<sub>2</sub>), 48.2 (CH<sub>2</sub>), 48.4 (CH<sub>2</sub>), 49.8 (CH<sub>2</sub>), 50.7 (CH<sub>2</sub>), 51.6 (CH<sub>2</sub>), 54.4 (CH<sub>2</sub>), 55.8 (CH<sub>2</sub>), 56.4 (CH<sub>2</sub>), 62.4 (CH), 116.9 (q, TFA), 158.3 (C), 160 (q, TFA), 164.6 (C), 165.5 (C), 166.4 (C), 167.2 (C), 168.3 (C), 169.5 (C), 170.8 (C) ppm.

**RP-HPLC-MS analysis of compound 37:**



## IV.1.3. Synthesis of the bimodal probe 49

Compound 46, DTPA-NH<sub>2</sub>

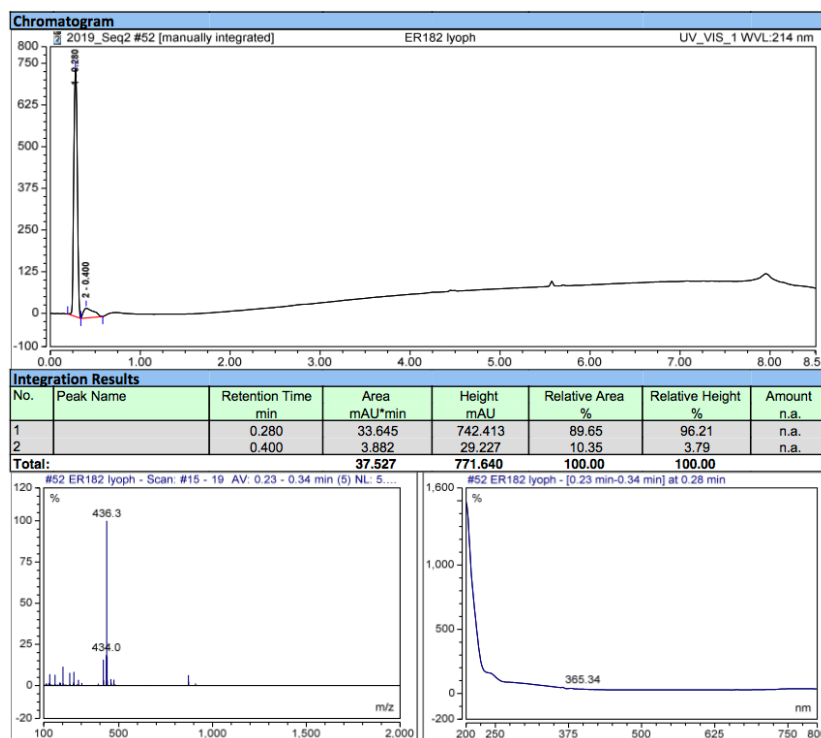
To a solution of DTPA(tBu)<sub>4</sub> ester (207 mg, 0.335 mmol, 1 equiv.) in DMF (2 mL) with NEt<sub>3</sub> (140 μL, 1.005 mmol, 3 equiv.) was added TSTU (121 mg, 0.402 mmol, 1.2 equiv.). The solution was stirred at room temperature for 1 h. Ethylenediamine (224 μL, 3.35 mmol, 10 equiv.) was then added to the activated ester and the reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature to give a white suspension. This mixture was concentrated under vacuum and purified on semi-preparative HPLC on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA; with the following gradient program: 5% of B for 10 min, 5% to 70% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min) to obtain a white solid. Concentrated HCl (6 mL) was added to the solid and the mixture was concentrated under vacuum. After lyophilization, the expected compound (brown solid) was obtained as a hydrochloride (3 HCl) salt (134.4 mg, 74%).

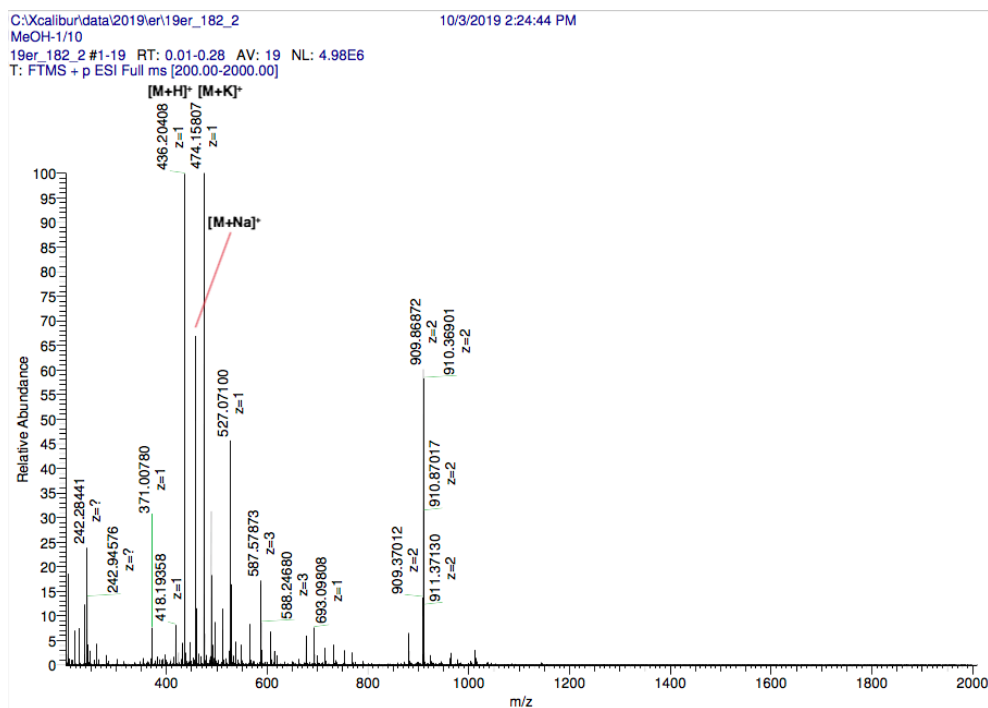
RP-HPLC-MS:  $t_r$  = injection peak,  $m/z$  calculated for C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup> 436.2, found 436.3.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 3.1-3.25 (m, 6H), 3.45-3.6 (m, 6H), 3.68 (s, 2H), 4.14 (s, 4H), 4.19 (s, 4H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 37.0 (CH<sub>2</sub>), 38.8 (CH<sub>2</sub>), 49.6 (CH<sub>2</sub>), 49.9 (CH<sub>2</sub>), 52.9 (CH<sub>2</sub>), 53.9 (CH<sub>2</sub>), 55.4 (CH<sub>2</sub>), 56.2 (CH<sub>2</sub>), 167.5 (C), 169.2 (C), 169.4 (C), 173.3 (C) ppm.

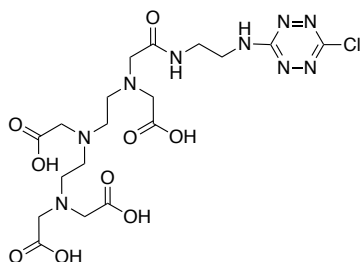
HRMS:  $m/z$  calculated for C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup> 436.20447, found 436.20408.

RP-HPLC-MS and HRMS analysis of compound 46:





### Compound 47, DTPA-NH-Tz-Cl



To a solution of DTPA-NH<sub>2</sub> (134.4 mg, 0.248 mmol, 1 equiv.) in 0.1 M borate buffer pH 8.0 (4 mL) was added a solution of 3,6-dichloro-1,2,4,5-tetrazine (44.9 mg, 0.298 mmol, 1.2 equiv.) in acetonitrile (1 mL). The resulting orange solution was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was concentrated under vacuum and purified by semi-preparative HPLC on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA; with the following gradient program: 2% of B for 10 min, 2% to 40% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min) to give an orange powder (98 mg, 60%).

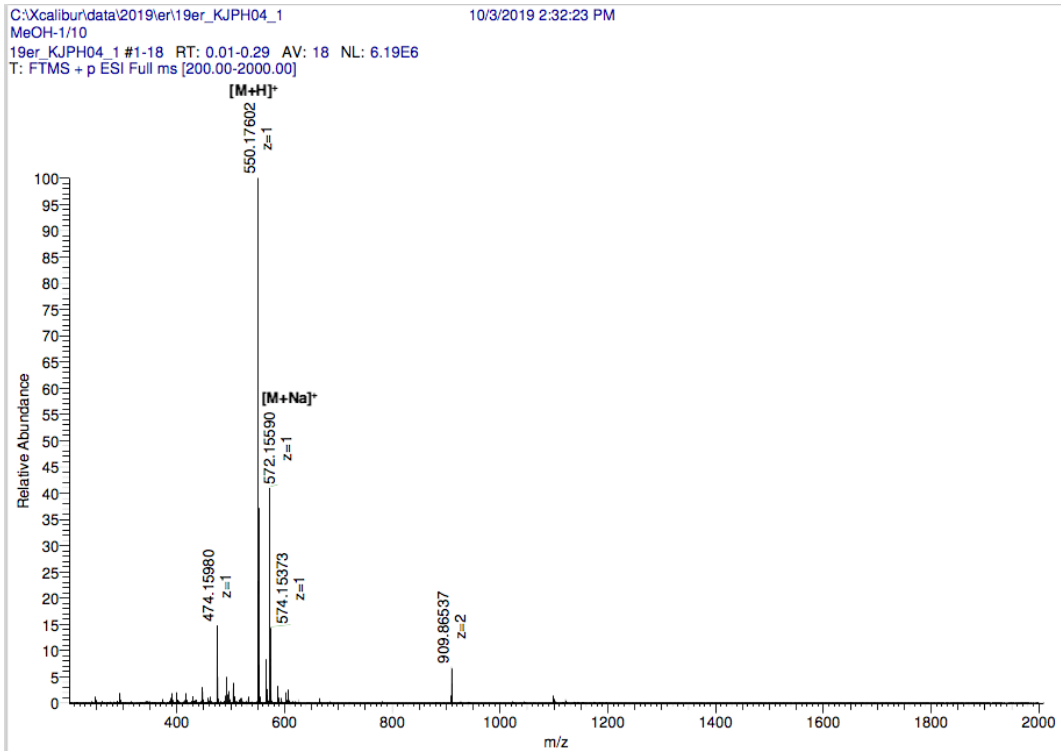
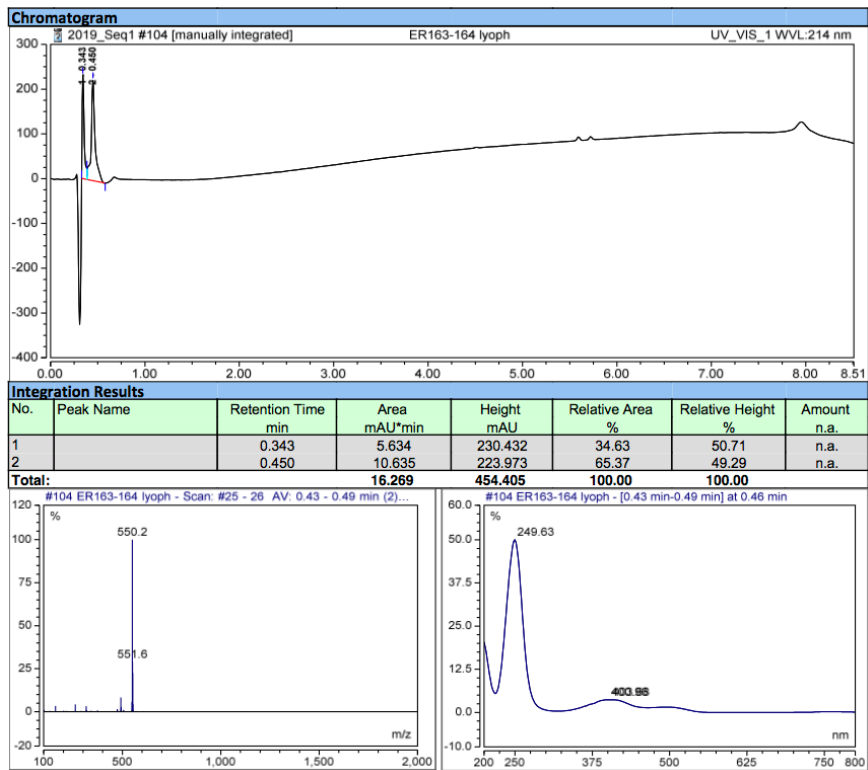
Ionic chromatography: 1 TFA salt.

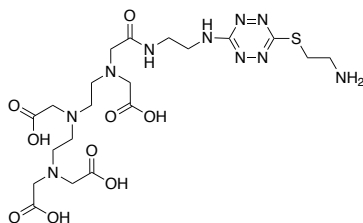
RP-HPLC-MS: tr = 0.45 min, m/z calculated for C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>9</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup> 550.2, found 550.2.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 3.26 (t, J=5.8 Hz, 2H), 3.30 (t, J=6.0 Hz, 2H), 3.43 (t, J=5.8 Hz, 2H), 3.53 (t, J=6.1 Hz, 2H), 3.59 (t, J=5.4 Hz, 2H), 3.73 (t, J=5.5 Hz, 2H), 3.77 (s, 2H), 3.92 (s, 2H), 3.97 (s, 2H), 4.05 (s, 4H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 38.4 (CH<sub>2</sub>), 40.1 (CH<sub>2</sub>), 50.3 (CH<sub>2</sub>), 50.6 (CH<sub>2</sub>), 52.2 (CH<sub>2</sub>), 54.0 (CH<sub>2</sub>), 55.8 (CH<sub>2</sub>), 56.0 (CH<sub>2</sub>), 56.4 (CH<sub>2</sub>), 158.7 (C), 161.6 (C), 168.1 (C), 170.5 (C), 170.8 (C), 172.6 (C) ppm.

HRMS: m/z calculated for C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>9</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup> 550.17779, found 550.17602.

RP-HPLC-MS and HRMS analysis of compound **47**:



**Compound 48, DTPA-NH-Tz-NH<sub>2</sub>**

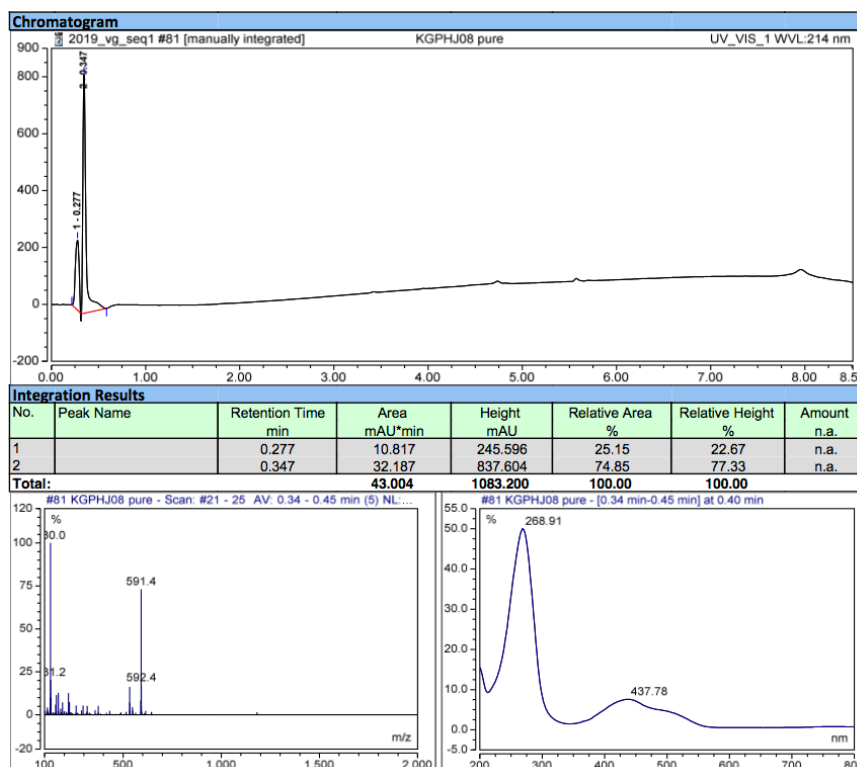
To a solution of DTPA-NH-Tz-Cl (50 mg, 75.3  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) in DMF (2 mL) and DIPEA (104.5  $\mu\text{L}$ , 602  $\mu\text{mol}$ , 8 equiv.) was added a solution of tert-butyl (2-mercaptoethyl)carbamate (14.9 mg, 84.1  $\mu\text{mol}$ , 1.2 equiv.) in DMF (2 mL). The resulting orange solution was stirred at 75 °C. After 2 h, the solvent was removed under vacuum. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) and TFA (2 mL) were added and the resulting solution was stirred at room temperature for 2 h. After concentration under vacuum the mixture was purified by semi-preparative HPLC on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA; with the following gradient program: 2% of B for 10 min, 2% to 40% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min) to afford an orange powder (43.8 mg, 71%).

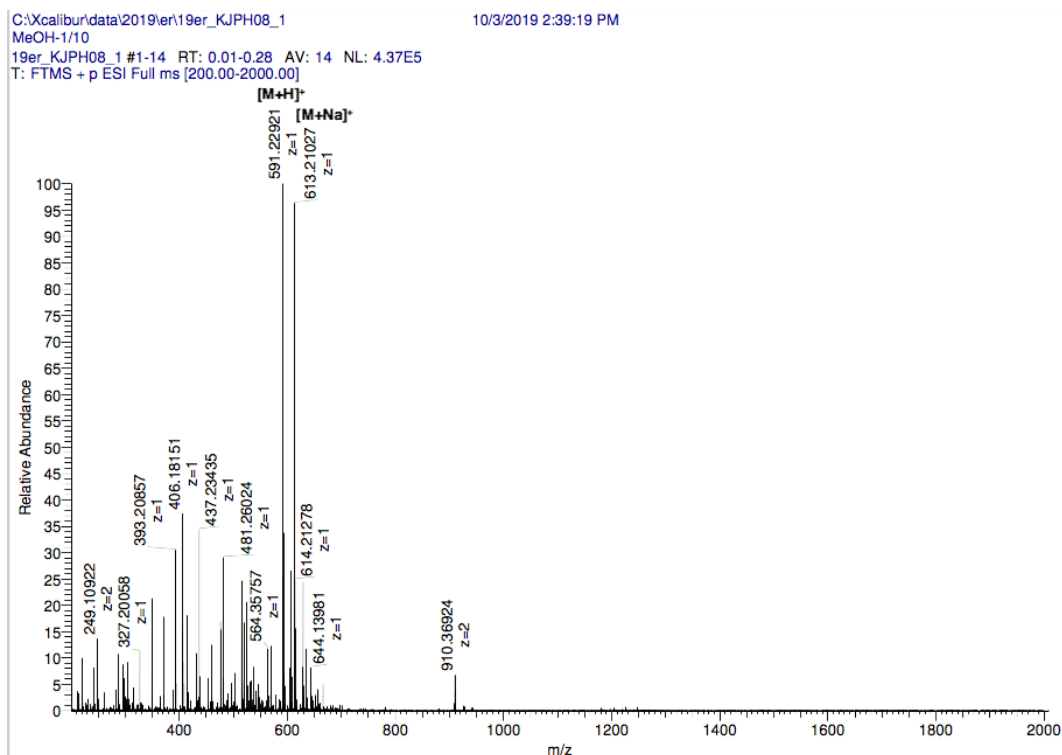
Ionic chromatography: 2 TFA salt.

RP-HPLC-MS:  $t_r$  = 0.35 min,  $m/z$  calculated for C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>N<sub>10</sub>O<sub>9</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 591.2, found 591.4.

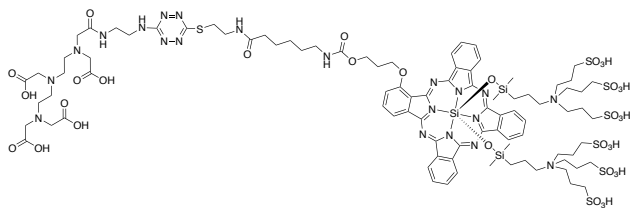
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 3.27 (m, 4H), 3.43 (m, 4H), 3.55 (m, 6H), 3.70 (m, 2H), 3.76 (s, 2H), 3.91 (s, 2H), 3.98 (s, 2H), 4.05 (s, 4H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 27.8 (CH<sub>2</sub>), 38.3 (CH<sub>2</sub>), 38.8 (CH<sub>2</sub>), 39.9 (CH<sub>2</sub>), 50.3 (CH<sub>2</sub>), 50.6 (CH<sub>2</sub>), 52.2 (CH<sub>2</sub>), 54.0 (CH<sub>2</sub>), 55.8 (CH<sub>2</sub>), 56.0 (CH<sub>2</sub>), 56.4 (CH<sub>2</sub>), 161.0 (C), 163.9 (C), 168.1 (C), 170.4 (C), 170.7 (C), 172.6 (C), ppm.

HRMS:  $m/z$  calculated for C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>N<sub>10</sub>O<sub>9</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 591.23103, found 591.22921.

**RP-HPLC-MS and HRMS analysis of compound 48:**



### Compound 49, DTPA-NH-Tz-S-IRDye700DX (ER255)

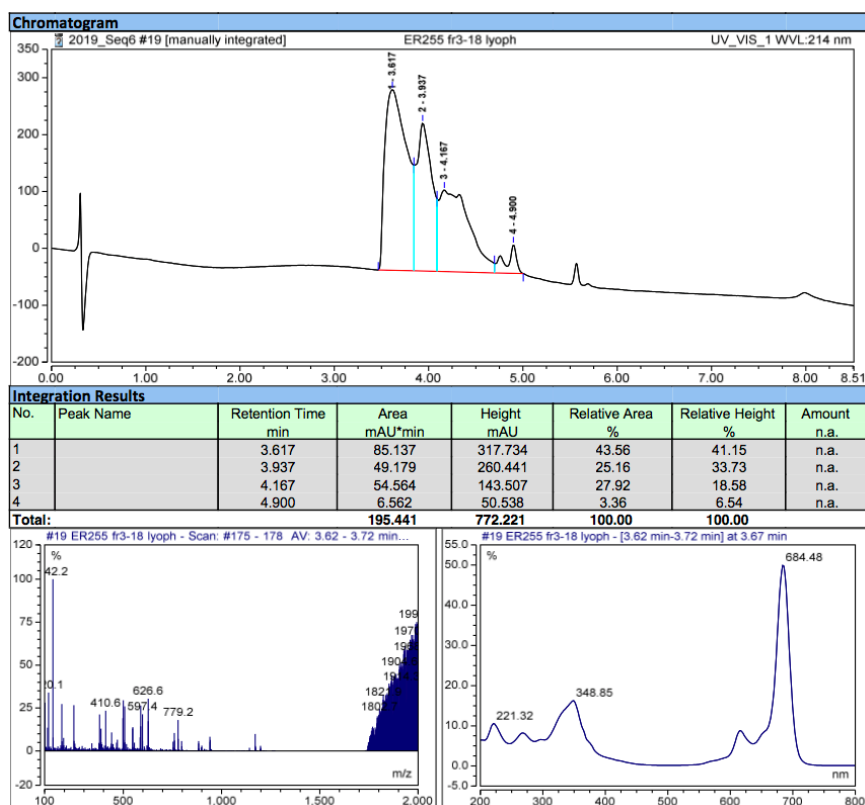
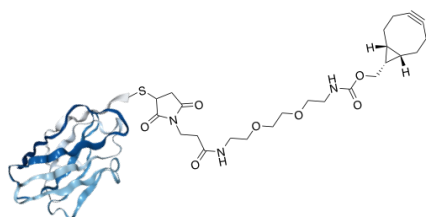


To a suspension of DTPA-NH-Tz-NH<sub>2</sub> (3.43 mg, 4.19 μmol, 1.3 equiv.) in DMF (1 mL) with DIPEA (8 μL, 45.9 μmol, 14 equiv.) was added IRDye700DX (6.3 mg, 3.22 μmol, 1 equiv.) in DMF (1 mL) with DIPEA (8 μL, 45.9 μmol, 14 equiv.). The green

solution was stirred at RT overnight. After concentration under vacuum, the mixture was purified by semi-preparative HPLC on an Hypersil column (A: TEAB 50 mM, B: MeCN with the following gradient program: 20% of B for 5 min, 20% to 60% of B in 60 min, at a flow rate of 3.5 mL/min) to give a blue/green powder (4.4 mg, 58%).

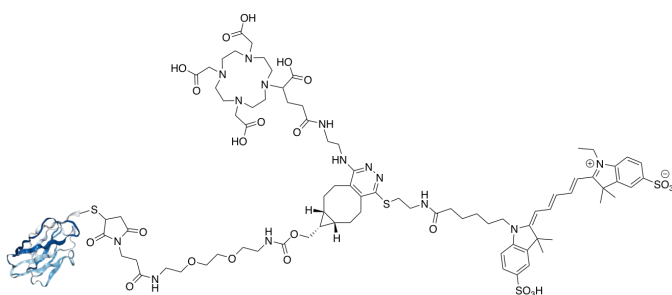
RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.6$  min.,  $m/z$  calculated for C<sub>90</sub>H<sub>129</sub>N<sub>21</sub>O<sub>33</sub>S<sub>7</sub>Si<sub>3</sub> [M+2H]<sup>2+</sup> 1170.8, found 1171.4,  $m/z$  calculated for [M+3H]<sup>3+</sup> 780.9, found 779.2.



RP-HPLC-MS analysis of compound **49**:IV.2.4. Synthesis of conjugates **35**, **39**, **40**, **42**, **43**Compound **35**, **7D12-BCN**

To a 7.24 g/L solution of V<sub>H</sub>H 7D12 in PBS (2 mg, 110 nmol) was added a 20 mM solution of TCEP in PBS (637 μg, 2.24 μmol, 20 equiv.) and a 20 mM solution of BCN-PEG<sub>2</sub>-maleimide in DMSO (1.06 mg, 2.24 μmol, 20 equiv.). The solution was stirred at 37 °C in a thermomixer (900 rpm) for 7 h. An additional amount of TCEP (318.5 μg, 1.12 μmol, 10 equiv.) and BCN-PEG<sub>2</sub>-maleimide in DMSO (795 μg, 1.68 μmol, 15 equiv.) were added and the solution was stirred (900 rpm, 37 °C) overnight. Excess of TCEP and BCN was removed by ultrafiltration on an Amicon Ultra Ultracel 3 kDa. This ultrafiltration step allowed us to concentrate the product and eliminate DMSO. The V<sub>H</sub>H 7D12-BCN was obtained as a 3.69 g/L solution in PBS (1.48 mg, protein recovery = 74%)\*. The degree of labeling was determined to be 1 by MALDI-TOF and HPLC-MS analyses.

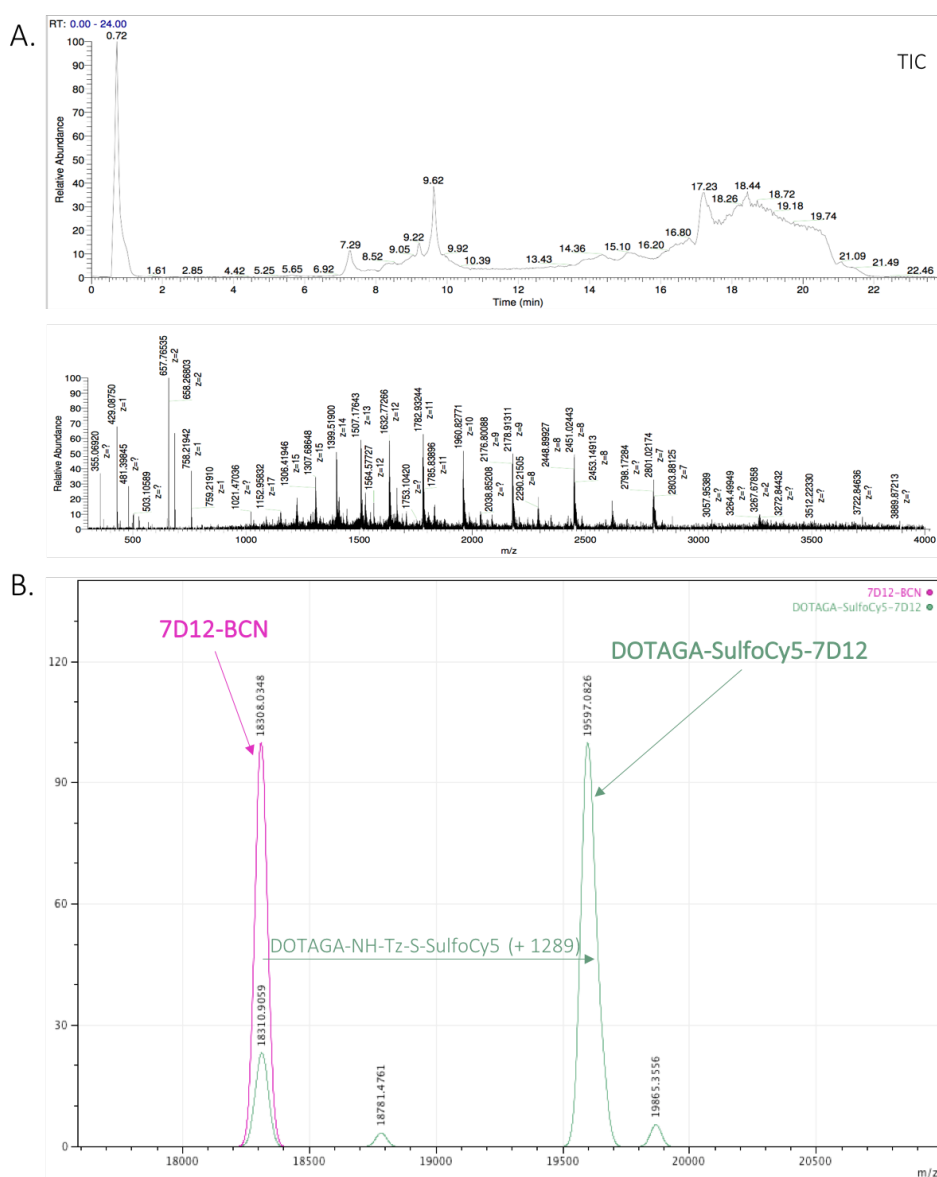
\*The concentration of the V<sub>H</sub>H 7D12 in g/L was calculated by UV spectrophotometry by using the extinction coefficient of 7D12 at 280 nm (35535 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>).

**Compound 39, 7D12-BCN-Tz-NH-DOTAGA-S-Cy5**

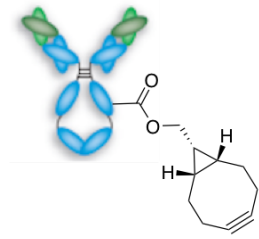
To 7  $\mu\text{L}$  of the 1.48 mg/mL stock solution of  $V_{\text{H}}\text{H}$  7D12-BCN in PBS (10  $\mu\text{g}$ , 0.57 nmol) was added 1.13  $\mu\text{L}$  of a 5 mM stock solution of DOTAGA-NH-Tz-S-Cy5<sup>2</sup> in H<sub>2</sub>O (7.43  $\mu\text{g}$ , 5.66 nmol, 10 equiv.) and 2.23  $\mu\text{L}$  of PBS. The solution was stirred in a thermomixer (750 rpm, 37 °C) overnight.

The degree of labeling was determined to be 1 by HPLC-MS analyses.

A. (Top) RP-HPLC chromatogram (total ion chromatogram) of **39**, (Bottom) Total mass spectrum of **39**; B. Deconvolved mass spectra of 7D12-BCN and conjugate **39**:



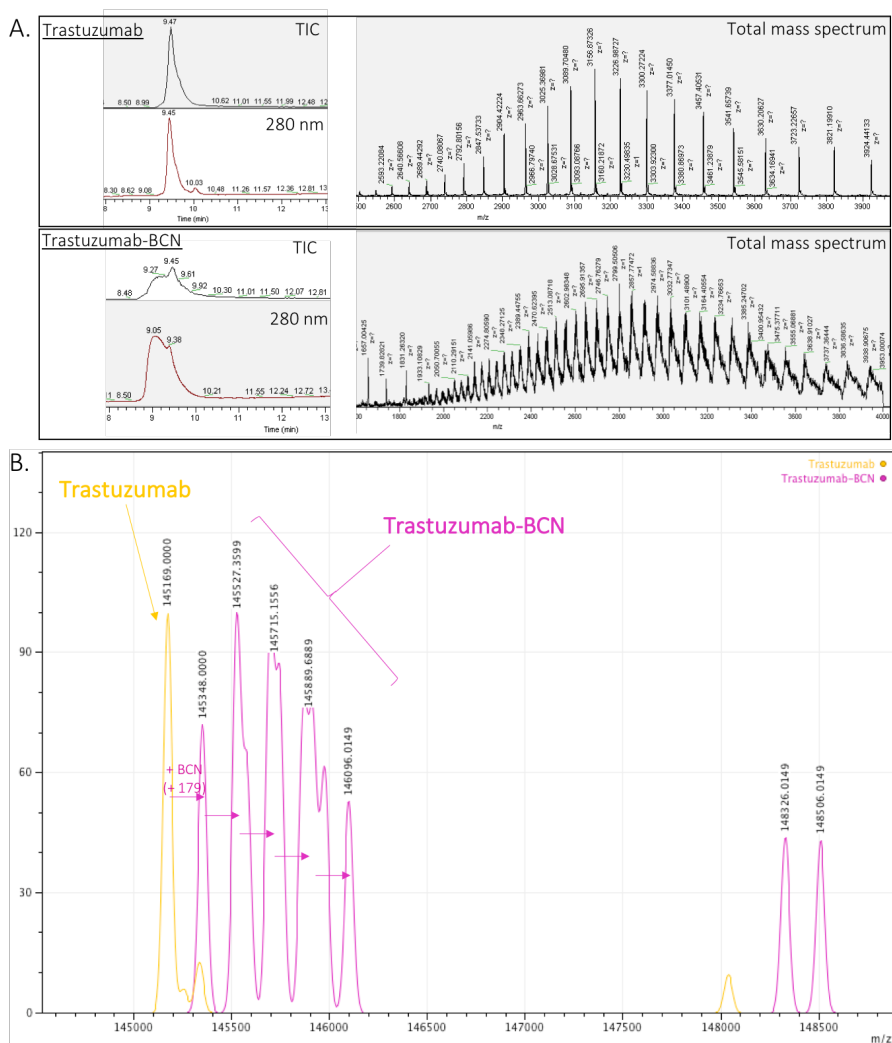
<sup>2</sup> Canovas, C.; Moreau, M.; Vrigneaud, J.-M.; Bellaye, P.-S.; Collin, B.; Denat, F.; Goncalves, V. Modular Assembly of Multimodal Imaging Agents through an Inverse Electron Demand Diels–Alder Reaction. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30* (3), 888–897. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00017>.

**Compound 40, Trastuzumab-BCN**

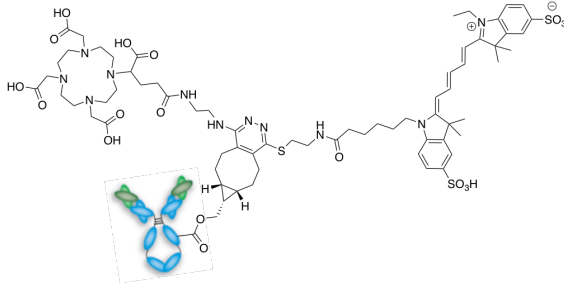
To 862.1  $\mu\text{L}$  of the 2.32 mg/mL stock solution of trastuzumab in borate buffer pH 8.5 (2 mg, 13.5 nmol) was added 8.12  $\mu\text{L}$  of a 10 mM stock solution of BCN-(*p*-NPC) in DMSO (25.6  $\mu\text{g}$ , 81.2 nmol, 6 equiv.). The solution was stirred in a thermomixer (750 rpm, 25 °C) overnight. Excess of BCN was removed by ultrafiltration on an Amicon Ultra Ultracel 30 kDa. This ultrafiltration step allowed us to concentrate the product and eliminate the DMSO. The pure BCN-modified trastuzumab was obtained as a 19.9 mg/mL solution in PBS (protein recovery = 83 %)\*. For the deglycosylation, a solution containing 17  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{O}$ , 2  $\mu\text{L}$  of glycobuffer 10X and 2  $\mu\text{L}$  of PNGase was prepared. 20  $\mu\text{g}$  of trastuzumab-BCN were added to this solution and the resulted solution was stirred at 25 °C for 24 h.

\*The concentration of the trastuzumab in mg/mL was calculated by UV spectrophotometry by using the extinction coefficient of trastuzumab at 280 nm ( $1.49 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

A. (Top) RP-HPLC chromatogram (total ion chromatogram, 280 nm) and total mass spectrum of deglycosylated trastuzumab (Bottom) RP-HPLC chromatogram (total ion chromatogram, 280 nm) and total mass spectrum of deglycosylated **40**; B. Deconvolved mass spectra of deglycosylated trastuzumab and deglycosylated **40**:



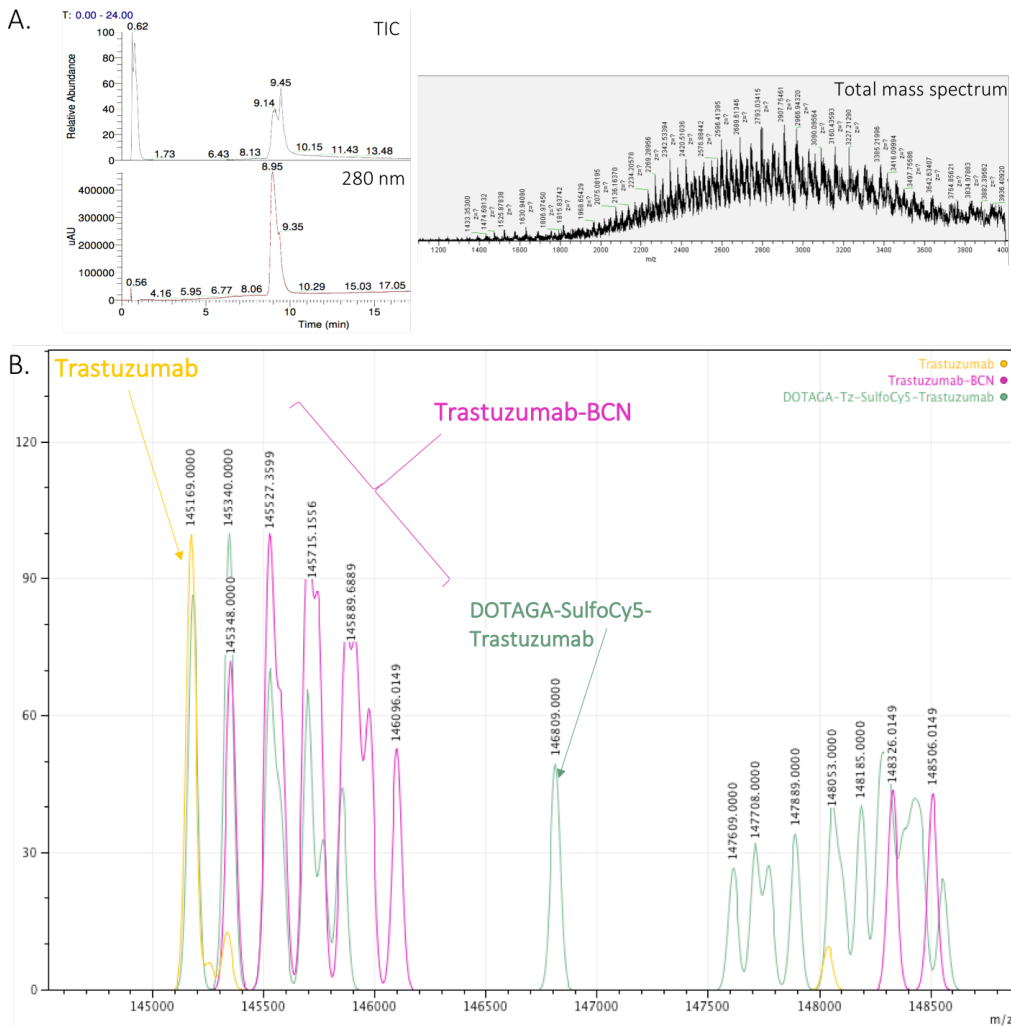
**Compound 42, Trastuzumab-BCN-Tz-NH-DOTAGA-S-Cy5**

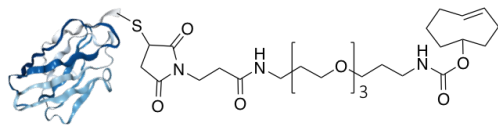


To 10  $\mu\text{L}$  of the 19.9 mg/mL stock solution of trastuzumab-BCN in PBS (0.2 mg, 1.34 nmol) was added 4.03  $\mu\text{L}$  of a 5 mM stock solution of DOTAGA-NH-Tz-S-Cy5 in  $\text{H}_2\text{O}$  (26.46  $\mu\text{g}$ , 20.2 nmol, 15 equiv.) and 85.47  $\mu\text{L}$  of PBS. The solution was stirred in a thermomixer (750 rpm, 25  $^\circ\text{C}$ ) overnight. Excess of probe was removed

by ultrafiltration on an Amicon Ultra Ultracel 30 kDa. This ultrafiltration step allowed us to concentrate the product. The bioconjugate trastuzumab was obtained as a 8.64 mg/mL solution in PBS (protein recovery = 95 %). For the deglycosylation, a solution containing 15.5  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{O}$ , 2  $\mu\text{L}$  of glycobuffer 10X and 2  $\mu\text{L}$  of PNGase was prepared. 20  $\mu\text{g}$  of trastuzumab-BCN were added to this solution and the resulted solution was stirred at 25  $^\circ\text{C}$  for 24 h.

A. RP-HPLC chromatogram (total ion chromatogram, 280 nm) and total mass spectrum of deglycosylated of **42**; B. Deconvolved mass spectra of deglycosylated trastuzumab, deglycosylated **40** and deglycosylated of **42**:

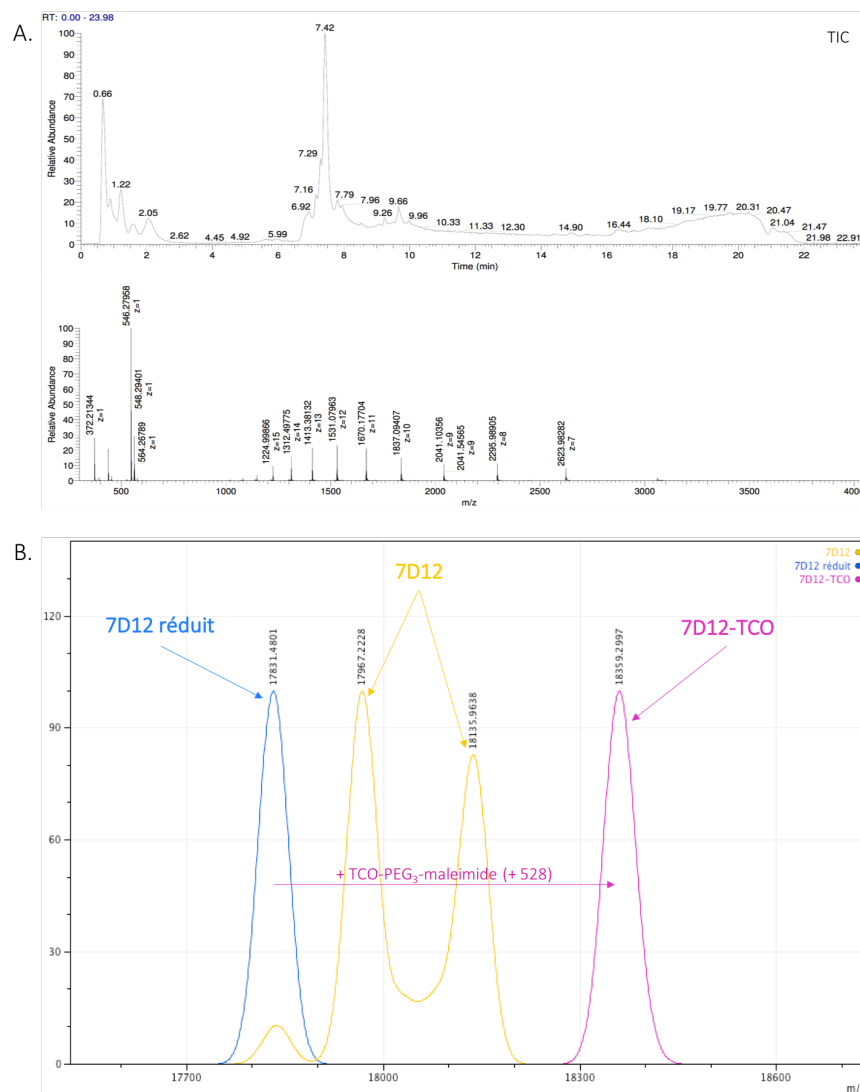


**Compound 43, 7D12-TCO**

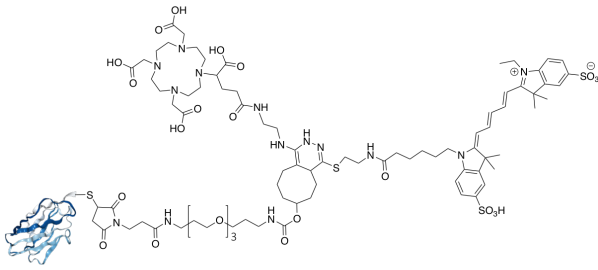
To 85.11  $\mu\text{L}$  of the 0.47 mg/mL stock solution of VHH 7D12 in PBS (40  $\mu\text{g}$ , 2.22 nmol) was added 2.22  $\mu\text{L}$  of a 20 mM stock solution of TCEP in PBS (12.74  $\mu\text{g}$ , 44.4 nmol, 20 equiv.) and 5.93  $\mu\text{L}$  of a 15 mM stock solution of TCO-maleimide in DMSO (46.54  $\mu\text{g}$ , 88.9 nmol, 40 equiv.). The solution was stirred in a thermomixer (750 rpm, 25  $^{\circ}\text{C}$ ) for 6 h. Excess of TCEP and TCO was removed by ultrafiltration on an Amicon Ultra Ultracel 10 kDa. This ultrafiltration step allowed us to concentrate the product and eliminate the DMSO. The pure TCO-modified 7D12 was obtained as a 0.54 mg/mL solution in PBS (protein recovery = 66 %)\*. Based on MALDI-TOF analysis and Orbitrap analysis, the degree of labeling was determined to be 1.

\*The concentration of the VHH 7D12 in mg/mL was calculated by UV spectrophotometry by using the extinction coefficient of 7D12 at 280 nm ( $35535 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

A. (Top) RP-HPLC chromatogram (total ion chromatogram) of **43**, (Bottom) Total mass spectrum of **43**; B. Deconvolved mass spectra of native 7D12, reduced 7D12 and 7D12-TCO **43**:



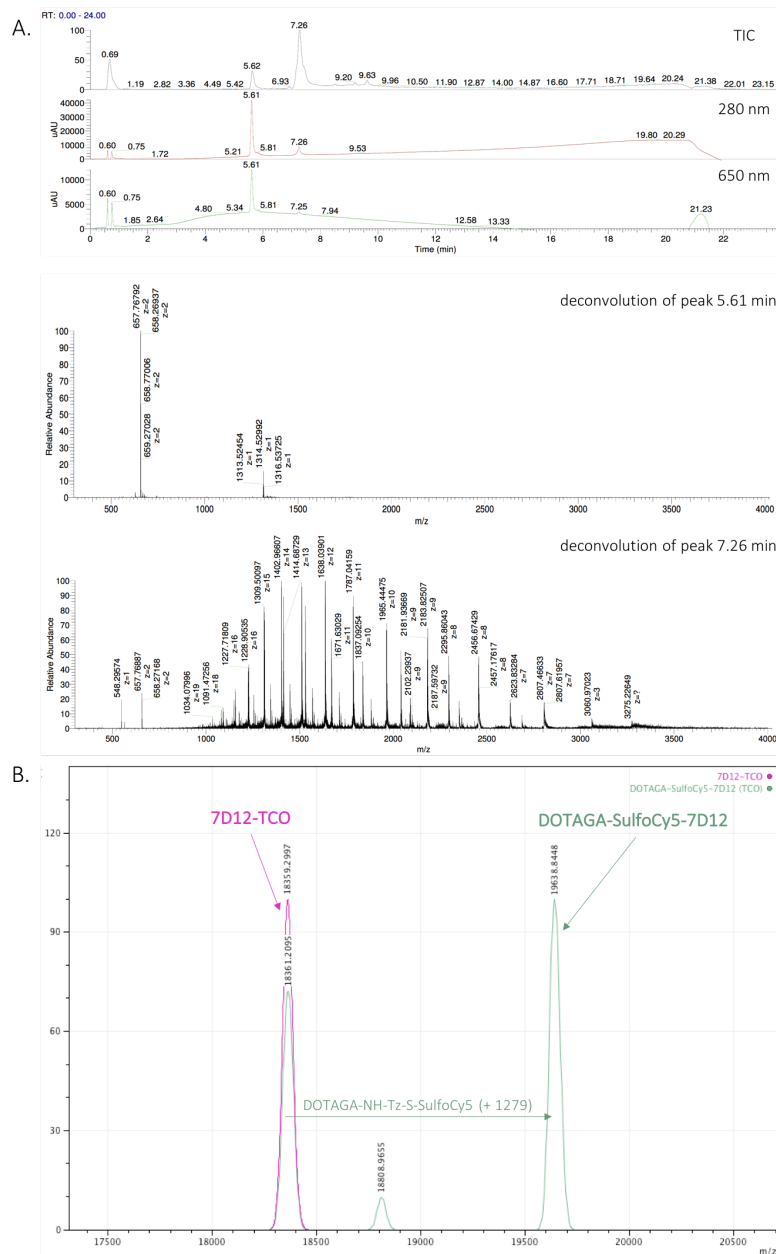
**Compound 45, 7D12-TCO-Tz-NH-DOTAGA-S-Cy5**



To 19  $\mu\text{L}$  of the 0.54 mg/mL stock solution of  $V_{\text{H}} 7\text{D}12\text{-TCO } \mathbf{43}$  in PBS (10  $\mu\text{g}$ , 0.56 nmol) was added 1.12  $\mu\text{L}$  of a 5 mM stock solution of DOTAGA-NH-Tz-S-Cy5 in  $\text{H}_2\text{O}$  (7.33  $\mu\text{g}$ , 5.6 nmol, 10 equiv.). The solution was stirred in a thermomixer (750 rpm, 25  $^\circ\text{C}$ ) overnight. The degree of labeling was determined to be 1 by

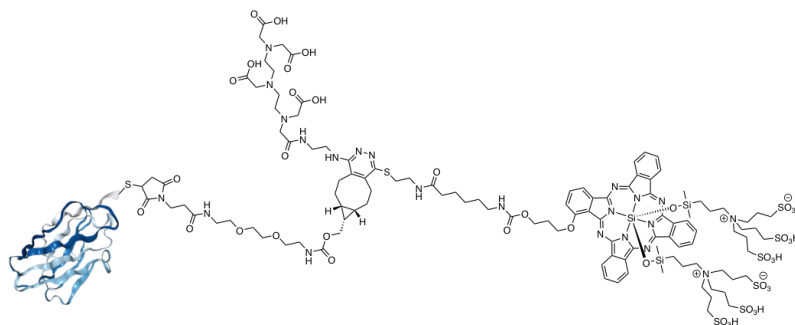
HPLC-MS analyses.

A. (Top) RP-HPLC chromatogram (total ion chromatogram, 280 nm and 650 nm) of **45**, (Middle) Total mass spectrum of peak at 5.62 min (free probe), (Bottom) Total mass spectrum of peak at 7.26 min (conjugate **45**); B. Deconvolved mass spectra of 7D12-TCO and conjugate **45**:



### IV.2.5. Synthesis of conjugate DTPA-IRDye700DX-7D12 50

#### Compound 50, DTPA-IRDye700DX-7D12



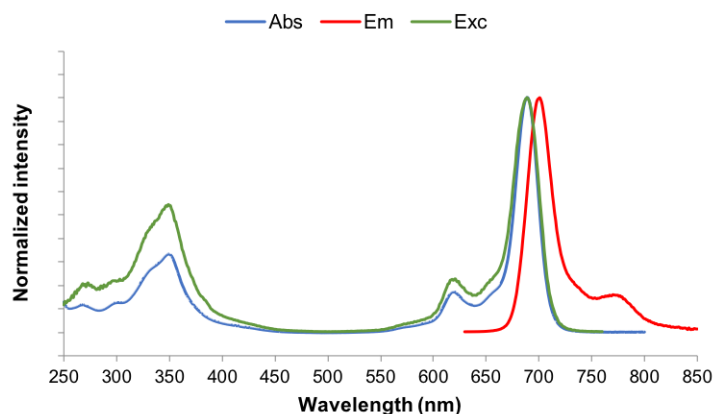
To a 3.69 g/L solution of V<sub>H</sub>H 7D12-BCN **35** in PBS (922 µg, 50.4 nmol) was added 75.2 µL of a 6.7 mM stock solution of DTPA-NH-Tz-S-IRDye700DX **49** in PBS (1.18 mg, 504 nmol, 10 equiv.) and 905 µL of PBS. The solution was stirred in a thermomixer (900 rpm, 37 °C) overnight. The product was purified by FPLC (Äkta Pure 25 M chromatography system, GE Healthcare Life Sciences) on a Superdex 75 10/300 GL column (cross-linked agarose and dextran, 13 µm, 10 × 300-310 mm, 24 mL), at 0.8 mL/min, with phosphate buffer (PB, 20 mM, pH 7.3) with NaN<sub>3</sub> (0.05%) as eluent. The bimodal conjugate DTPA-IRDye700DX-7D12 was obtained as a 1.27 g/L solution in PB (444 µg, protein recovery = 43%). The degree of labeling was determined to be 0.56 (UV-visible spectroscopy). A correction factor (0.1) was introduced to account for the contribution of the phthalocyanine absorbance at 280 nm. The molar concentration of the fluorophore was calculated by UV spectrophotometry by using the extinction coefficient of IRDye700DX at 689 nm in PBS (165000 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>).

### IV.3. Spectral properties of compound IRDye700DX derivatives

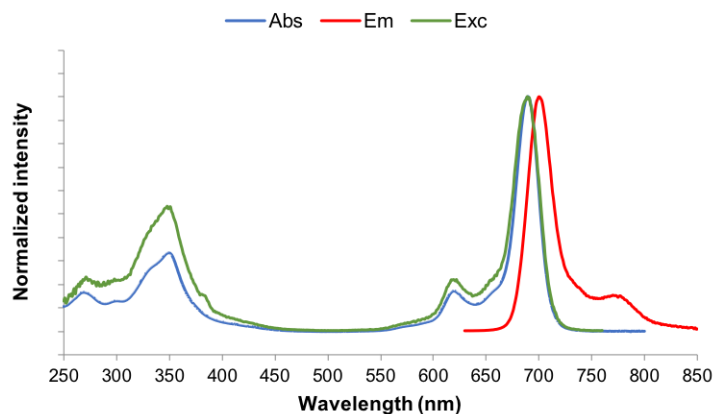
UV-Vis absorbance and fluorescence spectra of the IRDye700DX dye and related conjugates were recorded in the range 250-800 nm in PBS (pH 7.4, 0.01 M) with concentrations in the micromolar range. Emission spectra were recorded in the range 630-850 nm after excitation at 620 nm (shutter: Auto Open, Ex. Slit = 5 nm and Em. slit = 5 nm). Excitation spectra were recorded in the range 250-760 nm with emission measurement at 770 nm (shutter: Auto Open, Ex. slit = 5 nm and Em. slit = 5 nm). Fluorescence quantum yields were measured at 25 °C by a relative method using a suitable standard (AzaBODIPY JPL04, Φ 0.36, dilution by a factor of 3 between absorption and fluorescence measurements). The following equation was used:

$\Phi_{F_x} = (A_s/A_x)(F_x/F_s)(n_x/n_s)^2\Phi_{F_s}$  where A is the absorbance (in the range of 0.01–0.1 A.U.), F is the area under the emission curve, n is the refractive index of the solvents (at 25 °C) used in measurements, and the subscripts s and x represent standard and unknown, respectively.

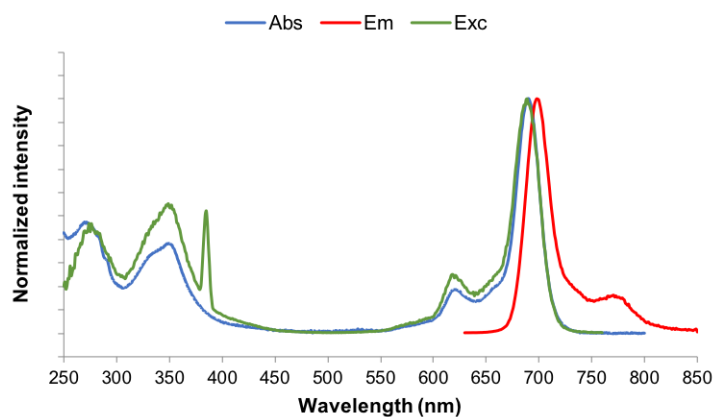
Normalized photophysical spectra (absorbance, excitation and emission) of compound IRDye700DX.  $\lambda_{Ex, max}$  = 689 nm,  $\lambda_{Em, max}$  = 701 nm:



Normalized photophysical spectra (absorbance, excitation and emission) of bimodal probe DTPA-NH-Tz-S-IRDye700DX **49**.  $\lambda_{Ex, max}$  = 689 nm,  $\lambda_{Em, max}$  = 700 nm:



Normalized photophysical spectra (absorbance, excitation and emission) of bimodal conjugate DTPA-IRDye700DX-7D12 **50**.  $\lambda_{Ex, max}$  = 689 nm,  $\lambda_{Em, max}$  = 698 nm:





#### IV.4. Stability of DTPA-IRDye700DX-7D12 in radiolabeling-like conditions

To 19  $\mu\text{L}$  of a solution of V<sub>H</sub>H 7D12 in PBS (1.04 mg/mL, 20  $\mu\text{g}$ ) was added 8.3  $\mu\text{L}$  of 0.05 M HCl and 16.6  $\mu\text{L}$  of 0.5 M MES. The resulting solution was stirred in a thermomixer (900 rpm, 25 °C). After 0 min, 1 h, 2 h, 4 h a sample (15  $\mu\text{L}$ ) of solution was collected and analyzed by RP-HPLC-MS (Orbitrap) at a wavelength of 280 nm and 650 nm. The separation was achieved on a Thermo Scientific™ MAbPac™ column (4  $\mu\text{m}$ , 50  $\times$  21 mm) with the following eluents: A: H<sub>2</sub>O, 0.1% FA + 0.02% TFA and B: MeCN/H<sub>2</sub>O (90 : 10, v/v), 0.1% FA + 0.02% TFA, and a linear gradient program: 5% to 100% of B in 15 min, 100% B for 3 min, 100% to 5% B in 0.1 min and 5% B for 6 min, at a flow rate of 0.3 mL/min, at 80 °C.

#### IV.5. Radiolabeling of conjugate with <sup>111</sup>In

DTPA-IRDye700DX-7D12 was incubated with [<sup>111</sup>In]InCl<sub>3</sub> (Curium, Petten, The Netherlands) and twice the volume of 0.5M 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic (MES) buffer, pH 5.5 for 30 minutes at room temperature. Labeling efficiency and radiochemical purity were determined by instant thin-layer chromatography (iTLC) on a silicagel chromatography strip (Biodex, Shirley, NY, USA), using 0.1 M citrate buffer pH 6.0 as the mobile phase. Stability of labeling up to 24 hours was determined by iTLC after incubating 180 nM of the labeled construct in either human serum or PBS with or without a thousand-fold molar excess of EDTA.

Table summarizing the stability of radiolabeled conjugate [<sup>111</sup>In]In-**50** after incubation in PBS or human serum with or without excess EDTA ; values are expressed as the percentage of radiolabeled compound (%  $\pm$  SD):

	PBS		Human serum	
	without EDTA	with EDTA	without EDTA	with EDTA
Time (h)	n = 2	n = 2	n = 2	n = 2
0	96 $\pm$ 0.00	96 $\pm$ 0.00	96 $\pm$ 0.00	96 $\pm$ 0.00
0.5	99.70 $\pm$ 0.14	99.65 $\pm$ 0.07	99.75 $\pm$ 0.07	99.75 $\pm$ 0.07
1	99.75 $\pm$ 0.07	99.70 $\pm$ 0.00	99.90 $\pm$ 0.00	99.75 $\pm$ 0.07
2	99.55 $\pm$ 0.21	99.75 $\pm$ 0.07	99.7 $\pm$ 0.28	99.75 $\pm$ 0.07
4	99.55 $\pm$ 0.21	99.65 $\pm$ 0.07	99.90 $\pm$ 0.00	99.80 $\pm$ 0.00
24	98.95 $\pm$ 0.21	95.65 $\pm$ 4.03	99.85 $\pm$ 0.07	99.50 $\pm$ 0.00

## IV.6. Cell culture and animal models

The human epidermoid carcinoma cell line A431, carrying an amplification of the EGFR gene, was cultured in RPMI-1640 (GIBCO, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), supplemented with 2 mmol/L L-glutamine (GIBCO, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 10% FCS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MS, USA). During all in vitro assays, cells were incubated at 37 °C, in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>, unless stated otherwise.

## IV.7. *In vitro* binding assay

A431 cells were plated at 60.000 cells/well in 6-wells plates, and grown to 80% confluency in 3 days. Cells were incubated with increasing concentrations of either unlabeled **50** or native 7D12 (0.005 to 450 nM) in binding buffer, in presence of 1600 Bq of [<sup>111</sup>In]In-**50** (310 pM, 0.25 MBq/μg) for 4 hours on ice. Subsequently, cells were washed twice with PBS, and collected with 1 mL 0.1 M NaOH. Activity in all fraction was counted in a γ-counter (2480 Wizard 3'', LKB/Wallace, Perkin-Elmer, Boston, MA, USA). The IC<sub>50</sub> values (the concentrations of **50** or 7D12 needed to replace 50% of the bound [<sup>111</sup>In]In-**50**) were calculated in Graphpad Prism version 5.0.

## IV.8. *In vitro* binding and internalization of conjugate

A431 cells were plated at 60.000 cells/well in 6-wells plates, and grown to 80% confluency in 3 days. Cells were incubated with 1600 Bq [<sup>111</sup>In]In-**50** in 0.5% BSA in RPMI (binding buffer) for 1, 4 and 24 hours. EGFR specificity of binding was assessed by co-incubation with 15 μg unlabeled 7D12 per well. After incubation, cells were washed twice with PBS, and the receptor-bound Bq [<sup>111</sup>In]In-**50** was retrieved by incubation with ice-cold 0.1 M acetic acid, 154 M NaCl, pH 2.6 for 10 minutes on ice. After washing twice with PBS, cells containing the internalized Bq [<sup>111</sup>In]In-**50** were collected with 1 mL 0.1 M NaOH. Activity in both fractions was counted in a γ-counter (2480 Wizard 3'', LKB/Wallace, Perkin-Elmer, Boston, MA, USA). Specific binding and internalization were calculated by subtracting the non-specific signal from the total signal.

Table summarizing the percentage of conjugate [ $^{111}\text{In}$ ]In-**50** bounds to the membrane or internalized after incubation with A431 cells ; values are expressed as the percentage of radiolabeled compound (%  $\pm$  SD):

	Internalized (%)	Membrane bound (%)	Internalized non-specific (%)	Membrane bound non-specific (%)
Time (h)	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3
1	5.05 $\pm$ 0.54	8.79 $\pm$ 0.48	0.09 $\pm$ 0.03	0.21 $\pm$ 0.03
4	8.79 $\pm$ 0.72	9.10 $\pm$ 0.87	0.18 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.01
24	11.19 $\pm$ 0.27	4.83 $\pm$ 0.15	0.42 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.02

#### IV.9. Singlet oxygen production of conjugate upon illumination

The generation of molecular singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) produced by **50** upon illumination was measured. **50**, IRDye700DX-7D12 and IRDye700DX (250 nM) were incubated with p-nitrosodimethylaniline (RNO; 50  $\mu\text{M}$ ) and imidazole (400  $\mu\text{M}$ ) as an acceptor of  $^1\text{O}_2$  in phosphate buffered saline pH 7.4 in clear flat-bottom 96-wells plates (Costar). The controls were realized in same conditions without imidazole. Plates were illuminated with 690 nm light at 200 mW/cm<sup>2</sup>. Absorbance at 440 nm was measured every minute for 15 min with the Tecan Infinite<sup>®</sup> 200 Pro (Tecan, Männedorf, Switzerland), to determine  $^1\text{O}_2$  induced bleaching of RNO.

Table summarizing the relative absorbance à 440 nm ; values are expressed as %  $\pm$  SEM:

	IRDye700DX control	IRDye700DX	IRDye700DX-7D12 control	IRDye700DX-7D12	<b>50</b> control	<b>50</b>
Fluence (J/cm <sup>2</sup> )	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3
0	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
12	100.36 $\pm$ 0.42	76.94 $\pm$ 0.40	98.34 $\pm$ 0.57	71.84 $\pm$ 0.99	97.46 $\pm$ 0.32	84.86 $\pm$ 0.58
24	99.71 $\pm$ 0.34	62.47 $\pm$ 0.17	97.17 $\pm$ 0.87	56.34 $\pm$ 0.35	96.96 $\pm$ 0.44	73.70 $\pm$ 0.24
36	99.02 $\pm$ 0.48	52.81 $\pm$ 0.09	95.50 $\pm$ 0.78	46.16 $\pm$ 0.36	96.25 $\pm$ 0.37	67.42 $\pm$ 0.71
48	98.70 $\pm$ 0.50	45.61 $\pm$ 0.12	93.81 $\pm$ 0.65	38.64 $\pm$ 0.17	93.97 $\pm$ 0.31	59.99 $\pm$ 0.31
60	97.79 $\pm$ 0.29	39.93 $\pm$ 0.11	93.08 $\pm$ 0.74	33.53 $\pm$ 0.22	93.65 $\pm$ 0.32	55.15 $\pm$ 0.32
72	97.23 $\pm$ 0.31	35.92 $\pm$ 0.12	92.72 $\pm$ 0.75	30.44 $\pm$ 0.17	93.39 $\pm$ 0.33	51.68 $\pm$ 0.31
84	96.79 $\pm$ 0.32	32.68 $\pm$ 0.12	92.23 $\pm$ 0.74	28.08 $\pm$ 0.17	93.12 $\pm$ 0.32	48.61 $\pm$ 0.38
96	96.37 $\pm$ 0.31	30.25 $\pm$ 0.11	91.25 $\pm$ 0.83	26.33 $\pm$ 0.17	92.73 $\pm$ 0.34	46.26 $\pm$ 0.38
108	96.03 $\pm$ 0.31	28.57 $\pm$ 0.13	90.52 $\pm$ 0.82	24.99 $\pm$ 0.15	92.48 $\pm$ 0.36	44.25 $\pm$ 0.38
120	95.59 $\pm$ 0.31	27.07 $\pm$ 0.13	89.25 $\pm$ 0.82	24.04 $\pm$ 0.14	92.17 $\pm$ 0.36	42.58 $\pm$ 0.38
132	95.21 $\pm$ 0.28	26.02 $\pm$ 0.13	88.68 $\pm$ 0.85	23.32 $\pm$ 0.13	91.84 $\pm$ 0.37	41.25 $\pm$ 0.36
144	94.79 $\pm$ 0.29	25.11 $\pm$ 0.13	88.02 $\pm$ 0.83	22.81 $\pm$ 0.12	91.48 $\pm$ 0.33	40.19 $\pm$ 0.35
156	94.41 $\pm$ 0.30	24.37 $\pm$ 0.13	87.39 $\pm$ 0.93	22.30 $\pm$ 0.12	90.99 $\pm$ 0.36	39.19 $\pm$ 0.35
168	94.14 $\pm$ 0.27	23.83 $\pm$ 0.13	87.06 $\pm$ 0.83	21.95 $\pm$ 0.12	90.73 $\pm$ 0.36	38.44 $\pm$ 0.35
180	85.30 $\pm$ 1.66	21.64 $\pm$ 0.17	86.73 $\pm$ 0.82	21.67 $\pm$ 0.12	90.55 $\pm$ 0.38	37.84 $\pm$ 0.35

#### IV.10. *In vitro* photodynamic therapy

A431 cells were plated at 2.000 cells/well in 96 wells plates, and grown to 50% confluency in 3 days. Then cells were incubated for 4 hours with increasing concentrations of  $^{111}\text{In}$  labeled or unlabeled **50**. Subsequently, cells were washed twice and illuminated with  $90 \text{ J/cm}^2$  at 690 nm (dose rate of  $200 \text{ mW/cm}^2$ , 7.5 min) using a light emitting diode. Non-illuminated cells were taken as control to determine dark toxicity of the conjugates. The next day, cell viability was determined with the CellTiter-Glo<sup>®</sup> luminescence cell viability assay (Promega, Madison, WI, USA), according to manufacturer's protocol.

Relative viability of A431 cells illuminated or non-illuminated after incubation with different concentrations of conjugates **50** or  $^{111}\text{In}$ In-**50** ; values are expressed as the percentage of relative viability ( $\% \pm \text{SEM}$ ):

	$90 \text{ J/cm}^2$		Non-illuminated	
	<b>50</b>	$^{111}\text{In}$ In- <b>50</b>	<b>50</b>	$^{111}\text{In}$ In- <b>50</b>
	n = 4	n = 4	n = 3	n = 4
0 nM	$100 \pm 0.000$	$100 \pm 0.000$	$100 \pm 0.000$	$100 \pm 0.000$
2.2 nM	$8.214 \pm 0.228$	$8.530 \pm 0.203$	$113.214 \pm 0.283$	$117.527 \pm 6.609$
6.67 nM	$2.102 \pm 0.196$	$2.305 \pm 0.173$	$125.205 \pm 3.047$	$102.641 \pm 8.437$
20 nM	$1.331 \pm 0.136$	$1.410 \pm 0.125$	$121.847 \pm 2.214$	$127.573 \pm 7.617$
60 nM	$0.777 \pm 0.064$	$0.867 \pm 0.033$	$123.225 \pm 2.546$	$131.353 \pm 5.038$
180 nM	$0.514 \pm 0.054$	$0.608 \pm 0.007$	$111.605 \pm 1.911$	$134.929 \pm 12.142$

## IV.11. Small animal SPECT imaging and biodistribution studies

Tumor targeting by DTPA-IRDye700DX-7D12 was determined in a biodistribution study in mice bearing A431 xenografts. Mice (n = 5) were injected intravenously with 7.5 µg of [<sup>111</sup>In]In-**50** (1 MBq in PBS/0.5%BSA). To determine the specificity of EGFR targeting, a separate group (n = 3) was injected with a blocking dose of 300 µg unlabeled 7D12 at 30 min prior to [<sup>111</sup>In]In-**50** injection. Mice were euthanized by CO<sub>2</sub> suffocation at 4 hours after tracer injection. Tumors and other tissue samples (blood, muscle, liver, lung, kidney, spleen, pancreas, stomach and duodenum) were harvested and weighed, and radioactivity in these samples was determined in a γ-counter (2480 Wizard 3'', LKB/Wallace). Radioactivity concentrations were calculated as percentage of the injected dose per gram of tissue (%ID/g) and corrected for decay using injection standards.

*Ex vivo* biodistribution of conjugate [<sup>111</sup>In]In-**50** with or without an excess of 7D12 ; values are expressed as the percentage of injected activity per gram of tissue (%IA/g ± SD):

	[ <sup>111</sup> In]In- <b>50</b>	[ <sup>111</sup> In]In- <b>50</b> blocking
Uptake (%IA/g)	n = 5	n = 3
Blood	1.393 ± 0.268	1.602 ± 0.144
Muscle	0.412 ± 0.063	0.456 ± 0.035
Skin	1.727 ± 0.104	1.854 ± 0.220
Heart	0.822 ± 0.096	1.079 ± 0.012
Lungs	1.771 ± 0.513	1.973 ± 0.216
Liver	7.076 ± 1.176	9.434 ± 1.957
Spleen	2.107 ± 0.352	3.336 ± 0.931
Pancreas	0.962 ± 0.199	1.182 ± 0.287
Kidneys	81.386 ± 15.472	105.550 ± 11.791
Stomac	1.200 ± 0.135	1.615 ± 0.074
Duodenum	1.306 ± 0.178	1.582 ± 0.429
Tumor	2.126 ± 0.274	2.479 ± 0.517



---

# VALORISATION DES RÉSULTATS

---





## **Publications**

- Design of Bimodal Ligands of Neurotensin Receptor 1 for PET Imaging and Fluorescence-Guided Surgery of Pancreatic Cancer.

Emma Renard, Pierre-Alix Dancer, Christophe Portal, Franck Denat, Aurélie Prignon, Victor Goncalves

Journal of Medicinal Chemistry, **2020**, 63 (5), 2426-2433

→ Annexe 1

- PET Imaging of Neurotensin Receptor-Positive Tumors with <sup>68</sup>Ga-Labeled Antagonists : “the Chelate Makes Again the Difference”

Emma Renard, Mathieu Moreau, Pierre-Simon Bellaye, Mélanie Guillemin, Bertrand Collin, Franck Denat, Victor Goncalves

Article soumis à Journal of Medicinal Chemistry

→ Annexe 2

- Site-Specific Dual-Labeling of Anti-EGFR VHH 7D12 with a Chelator and a Photosensitizer for Nuclear Imaging and Targeted Photodynamic Therapy

Emma Renard, Estel Collado-Camps, Coline Canovas, Annemarie Kip, Martin Gotthardt, Franck Denat, Victor Goncalves, Sanne A.M. van Lith

Manuscrit en préparation

## **Communications orales**

- Design of a bimodal ligand of neurotensin receptor 1 for PET Imaging and fluorescence-guided surgery of pancreatic cancer

Emma Renard, Pierre-Alix Dancer, Christophe Portal, Franck Denat, Aurélie Prignon, Victor Goncalves

- European Molecular Imaging Meeting (EMIM), Glasgow (Royaume-Uni), 2019
- 21<sup>st</sup> Groupe Français des Peptides et des Protéines Meeting (GFPP), Amboise (France), 2019
- XX<sup>ème</sup> édition des Journées de l’Ecole Doctorale Carnot-Pasteur, Dijon (France), 2019
- Annual congress of European Association of Nuclear Medicine (EANM), Barcelone (Espagne), 2019

### **Communications par affiche**

- PET Imaging of Neurotensin Receptor-Positive Tumors with  $^{68}\text{Ga}$ -Labeled Antagonists :  
“the Chelate Makes Again the Difference”

Emma Renard, Mathieu Moreau, Pierre-Simon Bellaye, Mélanie Guillemin, Franck Denat, Victor Goncalves

European Molecular Imaging Meeting (EMIM), Thessalonique (Grèce), 2020

- Design of a bimodal ligand of neurotensin receptor 1 for  $^{68}\text{Ga}$ -PET imaging and fluorescence-guided surgery of pancreatic cancer

Emma Renard, Pierre-Alix Dancer, Christophe Portal, Franck Denat, Aurélie Prignon, Victor Goncalves

- Annual congress of European Association of Nuclear Medicine (EANM), Barcelone (Espagne), 2019
- 2<sup>èmes</sup> journées du GDR AIM, Dijon (France), 2019
- European Molecular Imaging Meeting (EMIM), Glasgow (Royaume-Uni), 2019
- XIX<sup>ème</sup> édition des Journées de l’Ecole Doctorale Carnot-Pasteur, Besançon (France), 2018
- 2<sup>nd</sup> PSL Chemical Biology Symposium, Paris (France), 2018

---

# ANNEXE 1

---

## **Design of Bimodal Ligands of Neurotensin Receptor 1 for PET Imaging and Fluorescence-Guided Surgery of Pancreatic Cancer.**

Emma RENARD, Pierre-Alix Dancer, Christophe Portal, Franck Denat, Aurélie Prignon, Victor Goncalves

*J. Med. Chem.*, **2020**, 63 (5), 2426-2433

DOI : [10.1021/acs.jmedchem.9b01407](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01407)



## Design of Bimodal Ligands of Neurotensin Receptor 1 for Positron Emission Tomography Imaging and Fluorescence-Guided Surgery of Pancreatic Cancer

Emma Renard,<sup>†</sup> Pierre-Alix Dancer,<sup>‡</sup> Christophe Portal,<sup>§</sup> Franck Denat,<sup>†</sup> Aurélie Prignon,<sup>\*,||</sup> and Victor Goncalves<sup>\*,†</sup>

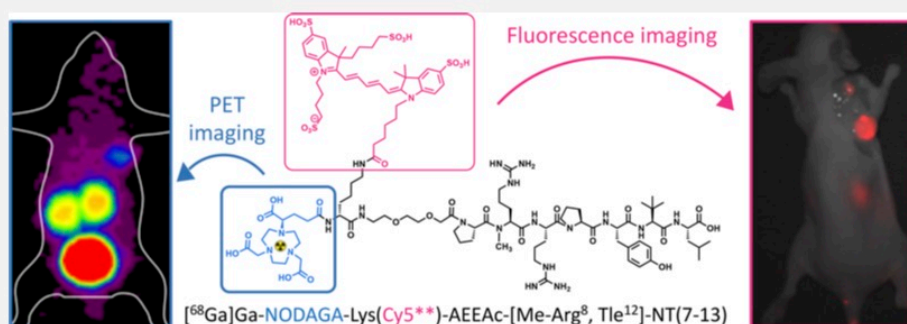
<sup>†</sup>Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, UMR CNRS 6302, Université Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France

<sup>‡</sup>Kaer Labs, 44300 Nantes, France

<sup>§</sup>Edinburgh Molecular Imaging, Edinburgh EH16 4UX, United Kingdom

<sup>||</sup>Sorbonne Université, UMS28 Laboratoire d'Imagerie Moléculaire Positronique (LIMP), 75020 Paris, France

### Supporting Information



**ABSTRACT:** Neurotensin receptor 1 (NTSR1) is overexpressed in most human pancreatic ductal adenocarcinomas. It makes it an attractive target for the development of pancreatic cancer imaging agents. In this study, we sought to develop a bimodal positron emission tomography (PET)/fluorescent imaging agent capable of specifically targeting these receptors. Starting from the structure of a known NTSR1 agonist, a series of tracers were synthesized, radiometalated with gallium-68, and evaluated *in vitro* and *in vivo*, in mice bearing an AsPC-1 xenograft. PET imaging allowed us to identify the compound [<sup>68</sup>Ga]Ga-NODAGA-Lys(Cy5\*\*) -AEEAc-[Me-Arg<sup>8</sup>, Tle<sup>12</sup>]-NT(7-13) as the one with the most promising biodistribution profile, characterized by high tumor uptake ( $2.56 \pm 0.97\%$  ID/g, 1 h post-injection) and rapid elimination from nontargeted organs, through urinary excretion. Fluorescence imaging gave similar results. On this basis, fluorescence-guided resection of tumor masses was successfully carried out on a preclinical model.

### INTRODUCTION

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), commonly termed pancreatic cancer, is the fourth leading cause of death by cancer in Europe.<sup>1,2</sup> This cancer has a poor prognosis, with a survival rate of only 8% at five years, which results from the late clinical presentation of the patients, rapid progression of the disease, and limited efficacy of chemotherapy.<sup>2,3</sup> Only patients with a localized, nonmetastatic tumor (10–20%) can benefit from surgery. Unfortunately, their selection is difficult because anatomical imaging is weakly effective in detecting local tumor invasion and small metastases. In addition, approximately 30–50% of these patients will relapse.<sup>4</sup> Indeed, the precise evaluation of tumor margins, during surgery or histopathological examination of tissue samples, is challenging, which can lead to incomplete tumor resection. The presence of residual tumor cells after surgery is a strong predictor of tumor

recurrence.<sup>5</sup> Therefore, there is a real clinical need to identify new methods that improve both the diagnosis and the staging of pancreatic cancer and the accuracy of surgical procedures.

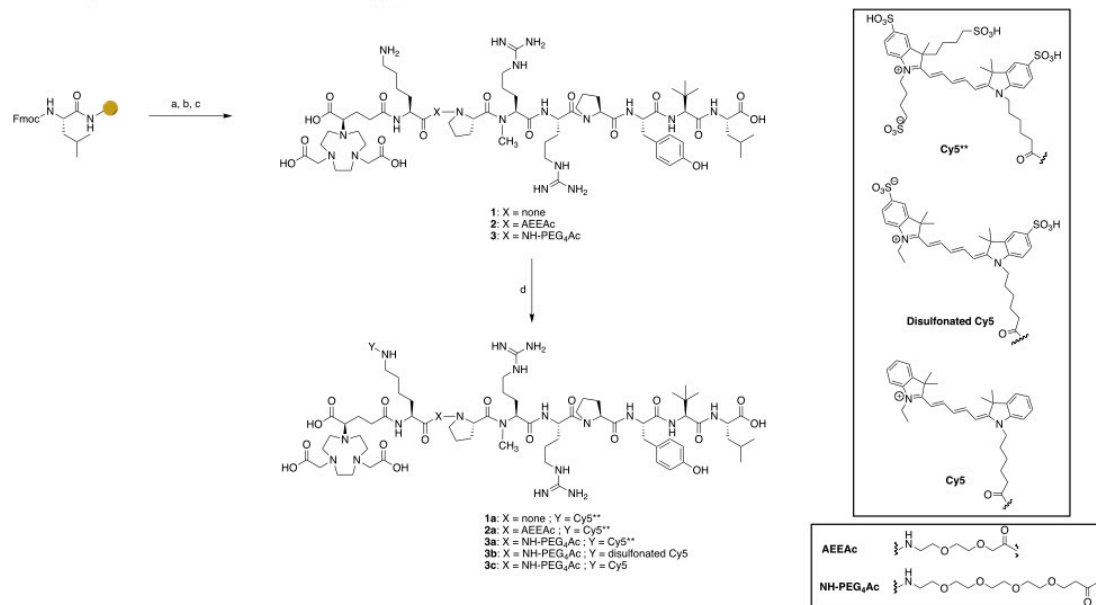
Positron emission tomography (PET) is a nuclear imaging technique that has been widely adopted as a standard tool for diagnosing and staging patients in oncology.<sup>6</sup> PET allows the efficient and quantitative detection of tumors but suffers from a limited spatial resolution. Fluorescence-guided surgery (FGS) is another fast-growing field that has already achieved clinical success. It relies on fluorescence imaging, a highly sensitive and sensitive imaging modality, which has been shown to

**Special Issue:** Women in Medicinal Chemistry

**Received:** August 26, 2019

**Published:** December 19, 2019



Scheme 1. Synthesis of Bimodal NTSR1 Ligands<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) coupling: Fmoc-(L)-aa(PG)-OH, DIC, Oxyma, DMF, MW; deprotection: 20% (v/v) piperidine in DMF, MW; (b) (R)-NODAGA-NHS, DIPEA, DMF, room temperature (RT), 18 h; (c) TFA/triisopropylsilane/H<sub>2</sub>O (95/2.5/2.5, v/v/v), RT, 2 h, then 40 °C, 4 h; (d) Cy5 derivatives, DIPEA, TSTU, DMF, RT, 20 h. Abbreviations: aa, amino acid; PG, protecting group; AEEAc, 8-amino-3,6-dioxaoctanoic acid.

improve the quality of tumor resection during the surgical procedure.<sup>7–10</sup>

An attractive strategy for locating primary tumors and their possible metastases is based on the use of bimodal nuclear/optical probes.<sup>11,12</sup> By combining both modalities into a single imaging agent, physicians can assess the extent of the disease before and after surgery by PET imaging, while fluorescence imaging can be used during surgery to delineate the local spread of the tumor and detect the presence of metastases invisible to the naked eye.

A well-validated marker of pancreatic cancer is neurotensin receptor 1 (NTSR1).<sup>13</sup> NTSR1 is overexpressed in 75–88% of pancreatic adenocarcinomas and high-grade precancerous lesions (PanINs) but is not detected in healthy pancreas or pancreatitis.<sup>14</sup> Thus, unlike glucose transporters for instance, NTSR1 tracers allow the imaging of malignant pancreatic tumors and related metastases with high specificity.<sup>15–17</sup> Neurotensin (NT) is the endogenous ligand of NTSR1. Its smallest active fragment, NT(8–13), has a nanomolar affinity for the receptor.<sup>18,19</sup> Because of its limited half-life *in vivo*, several derivatives were developed to limit proteolytic degradation.<sup>20</sup> An NT(6–13) analogue, named NT-20.3, showed an excellent affinity for NTSR1 (IC<sub>50</sub> = 2.2 ± 0.3 nM).<sup>21</sup> In 2011, Alshoukr et al. radiolabeled the peptide NT-20.3 with gallium-68 (<sup>68</sup>Ga) using DOTA as a chelating agent. This compound showed specific tumor uptake *in vivo*, with high tumor-to-organ ratios, in a model of NTSR1-positive colorectal cancer.<sup>22</sup> These results were further confirmed in 2019 by Prignon et al. in subcutaneous and orthotopic models of pancreatic cancer.<sup>23</sup>

To date, only one bimodal PET/fluorescent imaging agent targeting NTSR1 has been reported by the group of Deng and

collaborators.<sup>24</sup> This compound, which incorporates a DOTA chelator for copper-64 (<sup>64</sup>Cu) and a cyanine 5.5 dye, showed a good affinity for the human colon adenocarcinoma cell model, HT-29. Unfortunately, its pharmacokinetic properties are suboptimal, with a significant uptake in the liver, which was attributed to the hydrophobicity of the fluorophore and/or the release of free <sup>64</sup>Cu from the chelator *in vivo*.<sup>25</sup>

In this study, we report the development and evaluation of a series of PET/fluorescent imaging agents targeting NTSR1-positive tumors. These compounds were designed to chelate <sup>68</sup>Ga, a positron-emitting radioisotope with a half-life of 67.7 min, well-adapted to the pharmacokinetics of small peptides. Starting from the neurotensin analogue NT-20.3, different near-infrared (NIR) fluorescent probes and spacers were tested to optimize the biodistribution of the imaging agents. The best compound was validated *in vivo* by PET and NIR fluorescence imaging in mice xenografted with an AsPC-1 model of human pancreatic ductal adenocarcinoma. The selectivity of the imaging agent was further confirmed during the fluorescence-guided resection of tumor masses in the same mouse model.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Design of NTSR1 Ligands.** A series of bimodal agents was synthesized (Scheme 1). Their structure derives from the sequence of the well-validated peptide agonist NT-20.3 (Ac-Lys-Pro-N-Me-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH).<sup>21–23,26</sup> A lysine residue was introduced at the N-terminal end of the peptide to conjugate the radiometal chelator and the fluorophore, and different spacers were inserted before the lysine: no spacer, a PEG<sub>2</sub> analogue (8-amino-3,6-dioxaoctanoic acid, or AEEAc), or a PEG<sub>4</sub> chain.



For the PET modality, we chose to use  $^{68}\text{Ga}$  among other positron-emitting radioisotopes because its short physical half-life matches well with the rapid pharmacokinetics of peptides, and it provides safer dosimetry for the patients compared to  $^{64}\text{Cu}$ .<sup>27</sup> In combination with its good availability, limited cost of operation, and the reliability of commercial  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generators,  $^{68}\text{Ga}$  is one of the most interesting radioisotopes for PET diagnosis today. (R)-NODAGA was chosen as the chelator.<sup>28</sup> This polyazamacrocyclic is well-adapted to metals with small ionic radii such as  $^{68}\text{Ga}$  and  $^{64}\text{Cu}$ .<sup>29</sup> It requires mild radiolabeling conditions and forms highly stable complexes *in vivo*.

For the fluorescent modality, three near-infrared cyanine 5 derivatives, which differ in the number of sulfonate groups, were tested: a cyanine with no sulfonate group (Cy5),<sup>30</sup> a disulfonated cyanine 5,<sup>31–33</sup> and a tetrasulfonated cyanine (Cy5\*\*),<sup>34</sup> which has already shown promising results in a clinical setting.

**Synthesis of the Ligands.** The different bimodal ligands were synthesized in four steps (Scheme 1). First, the peptide was elongated by solid phase peptide synthesis (SPPS), starting from Fmoc-Leu Wang preloaded resin.<sup>35</sup> The different spacers were then introduced at this stage in the N-terminal position, prior to the coupling of a lysine residue. (R)-NODAGA-NHS was then conjugated to the free  $\alpha$ -amine of the N-terminal lysine. Cleavage and deprotection of the peptides from the resin, followed by RP-HPLC purification of the crude products, afforded compounds 1–3 in 43–69% yields. Finally, the different fluorophores were activated with TSTU and coupled to the  $\epsilon$ -amine group of the lysine, yielding NTSR1 ligands 1a, 2a, 3a, 3b, and 3c in 18–48% yields after RP-HPLC purification.

**Spectral Properties and Stability.** Ultraviolet–visible absorbance and fluorescence spectra were recorded in phosphate buffer (0.01 M) at pH 7.4. The  $\lambda_{\text{exc}}$  ranged between 643 and 653 nm, and the  $\lambda_{\text{em}}$  between 655 and 666 nm, with a Stokes shift of  $\sim 12$  nm. No aggregation of the fluorescent dyes was observed in aqueous buffered solutions (Figures S9–S11).

The stability of the molecules with regard to enzymatic degradation was then evaluated in mouse serum at 37 °C by RP-HPLC. No significant evolution was observed over a 24 h incubation for peptides 1a, 2a, 3a, 3b, and 3c (Figures S18–S22). In contrast, only half of the natural neurotensin was recovered after incubation under these assay conditions for 5 h (Figure S17).

**In Vitro Binding Affinity.** The five compounds were then metalated with  $^{nat}\text{Ga}$ . Their  $K_i$  was determined in a competition experiment performed on CHO cells overexpressing the NTSR1 receptor, using [ $^{125}\text{I}$ ]I-Tyr<sup>3</sup>-neurotensin as the ligand.<sup>36</sup> All  $K_i$  values were close to that of the reference compound ( $^{nat}\text{Ga}$ -DOTA-NT-20.3;  $K_i = 10.0$  nM) (Table 1). Interestingly, the spacer appears to play only a minor role in the affinity of the ligands for their target, with the exception of the compound bearing an AEEAc chain,  $^{nat}\text{Ga}$ -2a, whose affinity was reduced by a factor of 2 compared to those of the compounds with no spacer or a PEG<sub>4</sub> spacer ( $^{nat}\text{Ga}$ -1a or  $^{nat}\text{Ga}$ -3a, respectively). In contrast, the number of sulfonates had a greater impact on ligand affinity. The absence of sulfonate groups on the cyanine was associated with a stronger binding affinity ( $K_i$  of 0.76 nM for the nonsulfonated Cy5  $^{nat}\text{Ga}$ -3c vs 6.02 nM for the tetrasulfonated Cy5\*\*  $^{nat}\text{Ga}$ -3a). We hypothesize that these results can be explained by the

**Table 1. Inhibition Constants and Partition Coefficients of Compounds Tested in This Study**

compound	$K_i$ (nM) <sup>a</sup>	LogD <sup>b</sup>
[ $^{nat}/^{68}\text{Ga}$ ]Ga1a	5.52 (4.8–6.4)	-2.63 $\pm$ 0.10
[ $^{nat}/^{68}\text{Ga}$ ]Ga2a	12.1 (10.3–14.2)	-2.51 $\pm$ 0.16
[ $^{nat}/^{68}\text{Ga}$ ]Ga3a	6.02 (4.9–7.4)	-2.73 $\pm$ 0.13
[ $^{nat}/^{68}\text{Ga}$ ]Ga3b	3.81 (2.9–5.0)	-2.29 $\pm$ 0.06
[ $^{nat}/^{68}\text{Ga}$ ]Ga3c	0.76 (0.66–0.88)	-0.70 $\pm$ 0.25
[ $^{nat}/^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-NT-20.3	10.0 (6.51–15.4) <sup>c</sup>	-2.50 $\pm$ 0.31

<sup>a</sup> $K_i$  values are presented as “mean (95% confidence interval)” and were determined using  $^{nat}\text{Ga}$  compounds and [ $^{125}\text{I}$ ]I-Tyr<sup>3</sup>-neurotensin (0.05 nM;  $K_i = 0.22$  nM) as the radioligand. <sup>b</sup>Partition coefficients (LogD) at pH 7.4 were determined using  $^{68}\text{Ga}$  compounds and are presented as mean  $\pm$  SD. <sup>c</sup>Alshoukr et al. reported an  $\text{IC}_{50}$  value of 14  $\pm$  2 nM in a competition assay with HT29 cells.<sup>22</sup>

establishment of nonspecific hydrophobic interactions between the Cy5 fluorophore and NTSR1.

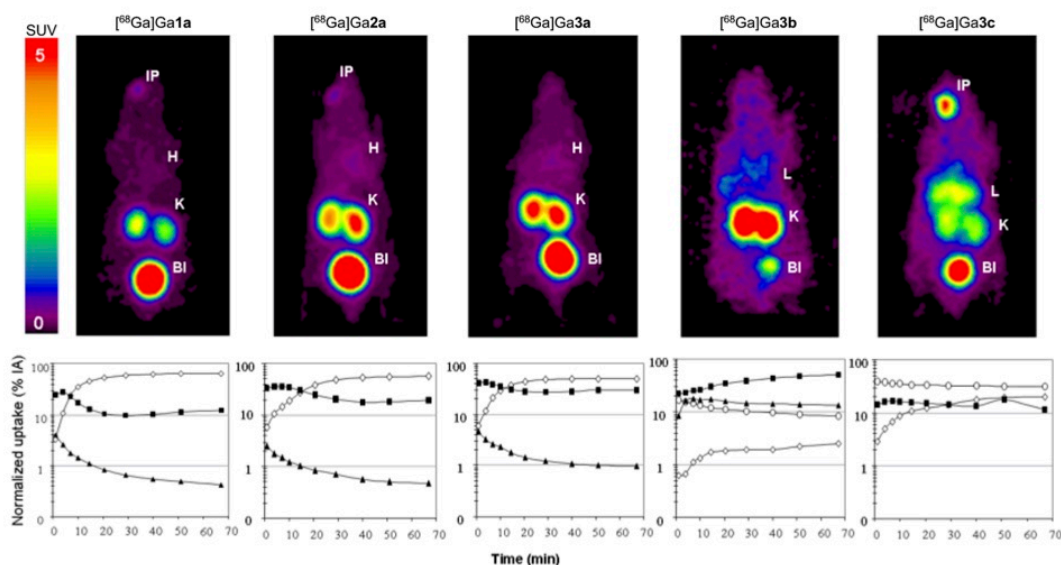
**Radiolabeling.** The compounds were radiolabeled with [ $^{68}\text{Ga}$ ]GaCl<sub>3</sub> in sodium acetate buffer (0.8 M, pH 3.5) for 10 min at 40 °C. Radiochemical yields ranged from 51% to 90%, and molar activities from 3.5 to 10.7 MBq/nmol at the end of the radiolabeling (Table S1). The peptides were purified on a C<sub>18</sub> Sep-Pack cartridge to achieve a radiochemical purity superior to 99% for each tracer, as determined by radio-HPLC analyses. The radiolabeling, quality control, and intravenous injection of peptides were completed in <1 h. Partition coefficients (LogD) were determined by the shake-flask method in the presence of octanol and PBS (0.1 M) at pH 7.4 (Table 1).<sup>37</sup> As expected, the five bimodal agents were all rather hydrophilic. Compounds [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga1a, [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga2a, and [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga3a showed the same LogD (approximately -2.6), suggesting that the hydrophilicity of these molecules is mainly driven by the number of sulfonate groups on the cyanine rather than by the length of the spacer.

**PET Imaging and Biodistribution.** To assess their pharmacokinetic properties, each radiolabeled bimodal tracer was first injected (473  $\pm$  151 pmol, 3.49  $\pm$  2.71 MBq) into five healthy nude mice. Dynamic PET imaging was performed for 70 min immediately post-injection (p.i.).

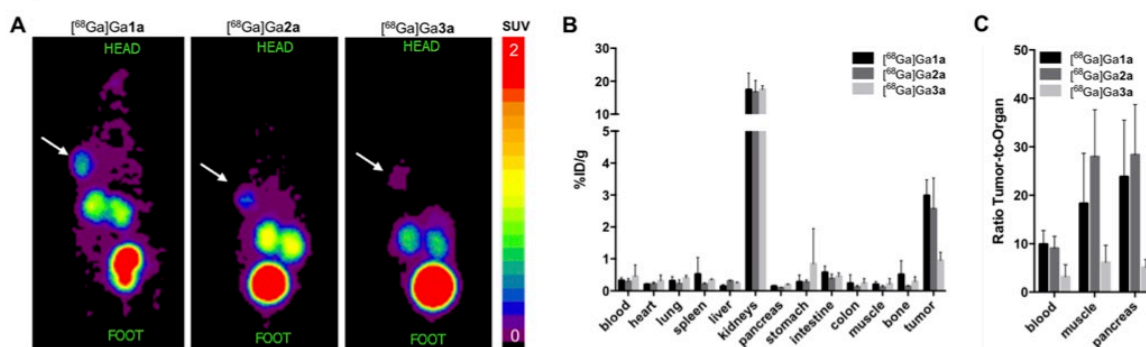
As illustrated in Figure 1, compounds [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga1a, [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga2a, and [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga3a showed a conventional urinary excretion profile, with the majority of the radioactive signal located in the kidneys and bladder. In contrast, compound [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga3b also showed signal uptake in the heart and liver, suggesting a longer circulation time in the bloodstream, and clearance of the compound, in part by the hepatic pathway. Finally, the injection of the least hydrophilic compound, [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga3c, resulted in significant uptake into the liver. Thus, the presence of four sulfonate groups on the cyanine 5 is essential to achieve a good distribution profile. The length of the spacer did not significantly change the distribution of this series of NTSR1 ligands.

Thus, further experiments on the tetrasulfonated compounds ([ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga1a, [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga2a, and [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga3a) were carried out on a model of human pancreatic adenocarcinoma (AsPC-1), xenografted subcutaneously on the shoulder of nude mice. Static PET images were recorded 40 min post-injection of 553  $\pm$  145 pmol or 3.17  $\pm$  0.92 MBq, over 15 min ( $n = 3$ ) (Figure 2A). Tumors were clearly visualized with a high tumor-to-background contrast, even if compound [ $^{68}\text{Ga}$ ]-





**Figure 1.** Maximum intensity projection (MIP) images obtained after signal acquisition for 10 min, between 57 and 67 min p.i., during a dynamic PET imaging study, after the retro-orbital injection in the sinus vein of  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga1a}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga2a}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga3a}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga3b}$ , and  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga3c}$ . Abbreviations: SUV, three-dimensional standardized uptake value data; IP, injection point; H, heart; K, kidneys; BL, bladder. Image-derived time-activity curves (TACs) for radioactivity in the bladder ( $\diamond$ ), kidneys ( $\blacksquare$ ), heart ( $\blacktriangle$ ), and liver ( $\circ$ ).



**Figure 2.** (A) Representative PET images of AsPC-1 tumor-bearing mice. The images show the maximum intensity projections, recorded over a 15 min acquisition, 40–55 min p.i., of  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga1a}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga2a}$ , and  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga3a}$ . The location of the xenografted tumor is indicated by a white arrow. (B) *Ex vivo* biodistribution data of  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga1a}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga2a}$ , and  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga3a}$  1 h p.i. Values are expressed as the percentage of injected dose per gram (%ID/g, mean  $\pm$  SD) for each collected organ. (C) Tumor-to-organ ratios from *ex vivo* biodistribution. Data are expressed as means  $\pm$  SD.

$\text{Ga3a}$  showed poorer tumor uptake compared to  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga1a}$  and  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga2a}$ .

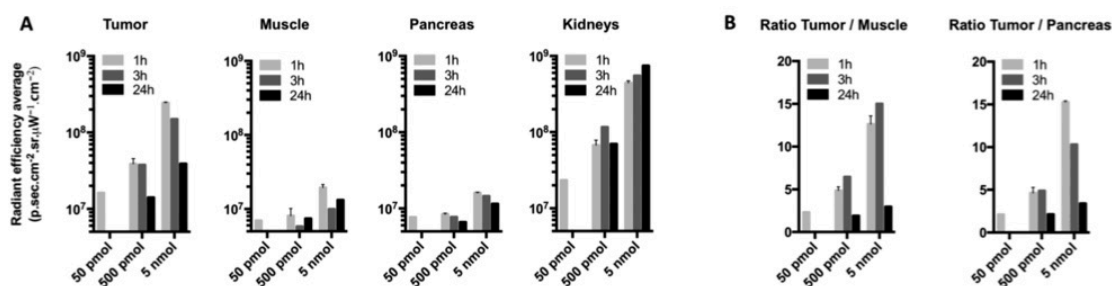
To confirm these results, an *ex vivo* biodistribution study was performed. One hour after the injection, mice were euthanized, and organs were collected, weighed, and  $\gamma$ -counted (Table S2). Data showed a clean distribution profile with most of the signal in the tumor and kidneys (Figure 2B). The highest uptake was observed in the kidneys with  $\sim 17.5\% \text{ID/g}$  for all three compounds. In agreement with PET data, tumor uptake in compound  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga3a}$  was lower ( $0.95 \pm 0.26\% \text{ID/g}$ ) than that seen in compounds  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga1a}$  and  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga2a}$  ( $2.98 \pm 0.50\% \text{ID/g}$  and  $2.56 \pm 0.97\% \text{ID/g}$ , respectively) (Figure 2B), resulting in lower tumor-to-organ ratios (Figure 2C). To date, we have no clear explanation for the different behavior of  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga3a}$  compared to that of the other two tracers.

Compounds  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga1a}$  and  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga2a}$  showed a biodistribution profile similar to that of  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-}$

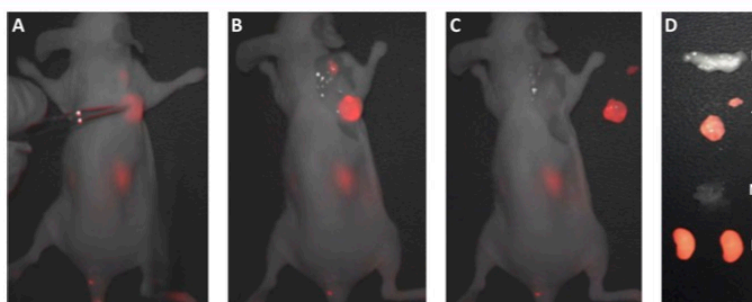
NT-20.3 apart from a slightly lower signal in the tumor and higher uptake in the kidneys (Table S2).<sup>23</sup> However, tumor-to-blood ratios of compounds  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga1a}$  and  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga2a}$  were higher ( $9.88 \pm 2.87$  and  $9.03 \pm 2.53$ , respectively) than that of  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-NT-20.3}$  ( $5.93 \pm 1.82$ ) (Table S2). Although these values do not reach those obtained with the best  $^{68}\text{Ga}$ -PET tracers described in the literature [Prante and co-workers reported a tumor-to-blood ratio of 31 with the NT-peptide tracer  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga8}$ , 1 h post-injection on an HT29 model],<sup>38</sup> they remain very satisfactory.<sup>39</sup> In addition, they show that, despite the addition of a fluorescent probe, the biodistribution and affinity for the receptors have not been significantly altered. As expected, almost no uptake was observed in the pancreas, and unlike the results obtained by Deng et al., liver uptake was minimal.<sup>24</sup>

On average, the injection of  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga2a}$  resulted in tumor-to-normal tissue ratios that were higher than that of





**Figure 3.** (A) *Ex vivo* biodistribution of **2a** (50 pmol, 500 pmol, and 5 nmol) at 1, 3, and 24 h p.i. as determined by fluorescence imaging. Data are expressed as means of the average radiant efficiency [(p/s/cm<sup>2</sup>/sr)/(μW/cm<sup>2</sup>)] for each collected organ. (B) Tumor-to-organ ratios from the *ex vivo* biodistribution. Individual data are available in Table S3. Data could not be collected for the 50 pmol dose at 3 and 24 h p.i. due to insufficient signal.



**Figure 4.** (A–C) Illustrative fluorescence-guided surgery of a mouse bearing an AsPC-1 tumor, 3.5 h p.i. of **2a** (500 pmol). (D) Fluorescence imaging of isolated organs. Abbreviations: P, pancreas; T, tumors; M, muscle; K, kidneys. Images were recorded with an exposure time of 200 ms, laser excitation at 640 nm, and collection of fluorescence emission above 665 nm.

[<sup>68</sup>Ga]Ga**1a** (Figure 2C), which prompted us to select this tracer for the remainder of the study.

**Near-Infrared Fluorescence Imaging and Fluorescence-Guided Surgery.** Fluorescence images were recorded 1, 3, and 24 h after intravenous administration of different amounts of compound **2a** (50 pmol, 500 pmol, and 5 nmol). Mice were euthanized, and organs collected, and the uptake of the tracer was quantified by fluorescence imaging at 680 nm (Figure 3, Table S3, and Figure S23). In accordance with PET images, the signal was mainly present in the tumor and kidneys. We also noticed fluorescence in the digestive organs, which actually came from the food ingested by the mice. In the other tissues, the signal was minimal (Figure 3A).

It is worth noting that the signal in the tumor increased with the injected dose while it remained about the same in muscles and pancreas. This led to improved tumor-to-muscle and tumor-to-pancreas ratios at the largest tested dose (Figure 3B). The fluorescence signal in tumors decreased substantially over 24 h, suggesting that fluorescence-guided surgery should ideally be performed within the first few hours post-injection. As shown in Figure 3B, tumor-to-muscle and tumor-to-pancreas ratios of up to 15 could be achieved 1 h post-injection of a 5 nmol dose of tracer.

Finally, real time fluorescence imaging was implemented (Supplementary Video and Figure 4). This technique allowed the fluorescence-guided resection of tumors in a mouse model. Again, an excellent contrast was found between the tumor and the surrounding healthy tissues.

## CONCLUSION

It has been widely established that the nature of the metal, chelator, and even more importantly the fluorophore can exert a considerable effect on the biodistribution of imaging agents.<sup>28,40</sup>

Through the stepwise evaluation of different near-infrared fluorophores and spacers, we were able to identify the tracer [<sup>68</sup>Ga]Ga**2a**, [<sup>68</sup>Ga]Ga-NODAGA-Lys(Cys<sup>\*\*</sup>)-AEEAc-[Me-Arg<sup>8</sup>,Tle<sup>12</sup>]-NT(7–13), as the one with the most interesting distribution, similar to that of [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-NT-20.3. This bimodal compound showed rapid and high tumor uptake and fast clearance from circulation, resulting in high contrast, as early as 1 h p.i., in both PET and fluorescence imaging. The accumulation in nontargeted tissues was almost negligible, except in the kidneys and bladder (urinary excretion pathway). *Post mortem* fluorescence-guided resection confirmed high-contrast fluorescence in the NTSR1-expressing PDAC tumor model and excellent delineation of cancerous cells from surrounding tissues. The evaluation of this tracer on a more relevant orthotopic model of pancreatic cancer is in progress.

While monomodal tracers can be designed for each application, we believe that introducing both modalities into a single agent, at an early stage of drug development, is a more cost-effective approach. Indeed, developing a single new chemical compound should simplify clinical translation and regulatory approval. Furthermore, it guarantees direct correlation between the diagnostic PET images used for surgical planning and the fluorescence images used during tumor resection.



These bimodal tracers should be useful to oncologists, by allowing earlier detection of PDAC primary tumors and small metastases, improving staging procedures, and tailoring of the best therapeutic strategy for each patient. For those who can benefit from surgery, the injection of the nonradioactive fluorescent tracer **2a** should improve the quality of tumor resection, leading ultimately to increased chances of survival. Future work will focus on the transposition of this dual-labeling strategy to nonpeptide antagonists of NTSR1, which exhibit promising biodistribution properties.<sup>41</sup>

## EXPERIMENTAL SECTION

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Acros Organics, and Alfa Aesar and used without further purification. Fmoc-protected amino acids and coupling reagents for peptide synthesis were from Iris Biotech. (R)-NODAGA-NHS and DOTA-NHS were provided by CheMatech (Dijon, France). The tetrasulfonated cyanine Cy5\*\* was kindly given by C. Portal (EM Imaging, Edinburgh, United Kingdom). The disulfonated Cy5 and the Cy5 dye were provided by A. Romieu (ICMUB, Dijon, France). Moisture sensitive reactions were performed under a nitrogen or argon atmosphere. The purity of tested compounds was determined by RP-HPLC-MS and was >95%, unless specified. The synthesis of compounds **1–3** and **2a** is described below. Data for other compounds are available in the Supporting Information.

**Synthesis of Peptide Conjugates 1–3.** Peptides were synthesized in 0.1 mmol scale on a Liberty Blue automated microwave peptide synthesizer (CEM). The synthesis was performed by using predefined Fmoc/tBu chemistry protocols on a Fmoc-Leu Wang resin (loading of 0.32 mmol/g), with DIC and Oxyma as coupling agents, and a solution of 20% piperidine in DMF for Fmoc deprotection steps. A solution of (R)-NODAGA-NHS (2 equiv) and DIPEA (10 equiv) in dry DMF was added to the resin-bound peptide. The reaction mixture was shaken at room temperature overnight. The resin was washed three times with DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and Et<sub>2</sub>O.

The peptide was cleaved from the resin using a TFA/triisopropylsilane/H<sub>2</sub>O mixture (95/2.5/2.5, v/v/v, 5 mL) for 2 h at room temperature. The filtrate was recovered and heated at 40 °C for an additional 4 h and then concentrated under a flow of nitrogen gas, followed by precipitation in diethyl ether and centrifugation (4000 rpm, 10 min). The supernatant was removed, and the residue was dried under vacuum.

The crude peptide was purified by semipreparative HPLC on a BetaBasic-18 column (A being H<sub>2</sub>O with 0.1% TFA and B being MeCN with 0.1% TFA, with the following gradient program: 10% to 60% B over 50 min, at a flow rate of 20 mL/min), and the appropriate fractions were lyophilized to afford target peptides as white powders with a yield ranging from 43% to 69%.

**Synthesis of Peptide Conjugate 2a.** To a solution of tetrasulfonated cyanine 5.0 Cy5\*\* (1.3 equiv) in DMF were added DIPEA (7.8 equiv) and TSTU (1.3 equiv). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. This solution was added to a solution of peptide (1 equiv) and DIPEA (10 equiv) in DMF. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under vacuum, and the solid was purified by semipreparative HPLC on a SiliaChrom dt C<sub>18</sub> column (Silicycle) (A being 50 mM TEAB and B being MeCN with the following gradient program: 5% B for 10 min, 5% to 60% of B over 60 min, at a flow rate of 20 mL/min) to afford target peptide **2a** (triethylammonium salt) as a blue powder (15.8 mg, 23%, 94% pure). HRMS: *m/z* calcd for C<sub>109</sub>H<sub>167</sub>N<sub>21</sub>O<sub>33</sub>S<sub>4</sub> [M + H]<sup>+</sup> 2427.09908, found 2427.11013.

**In Vitro Stability.** Fifteen microliters of a 5 mM stock solution of peptide in H<sub>2</sub>O was stirred in a thermomixer (900 rpm, 37 °C, dark) with 135 μL of mouse serum (Sigma-Aldrich, M5905, batch SLBT4412). The final concentration in peptide was 0.5 mM. After 0 min, 20 min, 35 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, and 24 h, a sample (15 μL) was collected and diluted with 60 μL of 99% ethanol. Samples were vortexed and centrifuged (11700 rpm, 10 min) to remove precipitated

proteins. The supernatant was analyzed by RP-HPLC-MS at a wavelength of 214 nm.

**In Vitro Binding Affinity.** The affinity of each bimodal compound <sup>nat</sup>Ga-1a, <sup>nat</sup>Ga-2a, <sup>nat</sup>Ga-3a, <sup>nat</sup>Ga-3b, and <sup>nat</sup>Ga-3c for the NTSR1 receptors was measured on a competitive binding assay on human recombinant CHO cells overexpressing NTSR1, using [<sup>125</sup>I]-Tyr<sup>3</sup>-neurotensin (0.05 nM; K<sub>d</sub> = 0.22 nM) as a radioligand (Eurofins).<sup>34</sup> IC<sub>50</sub> values were converted into inhibition constants (K<sub>i</sub>) using the Cheng–Prusoff equation.

**Radiolabeling.** Compounds were radiolabeled using an R&D Synchrom module (Raytest). The <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga eluate (1.5 mL, 150–300 MBq) was adjusted to pH 3.5 with sodium acetate (0.8 M). Each compound (9–12 nmol; **1a–3a** as triethylammonium salts; **3b** and **3c** as TFA salts) was added and incubated under agitation at 40 °C for 10 min. The products were purified on a C<sub>18</sub> Sep-Pack cartridge (Waters, Milford, MA), eluted using 800 μL of 80% ethanol in the second reactor, and subsequently evaporated at 70 °C under an argon flow. The final products were diluted with 9 mg/mL sodium chloride (NaCl). HPLC quality control was performed using a reverse phase column (Discovery Bio, 5 μm, 300 Å, Supelco) on a Waters Breeze System equipped with a 1525 binary pump. Radioactivity was detected with a Berthold radio-HPLC detector (A being H<sub>2</sub>O with 0.1% TFA and B being MeCN with 0.1% TFA with the following gradient program: 17% to 80% B in 15 min, at a flow rate of 2 mL/min). The tracers were dissolved in a saline solution (9 mg/mL NaCl) before injection.

**Cell Culture and Animal Models.** Human pancreatic adenocarcinoma cell line AsPC-1 (ATCC, Rockville, MD) was cultured in RPMI-1640 medium with 10% fetal bovine serum (FBS) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

All animal experiments were carried out in compliance with the French laws relating to the conduct of animal experimentation. The subcutaneous AsPC-1 tumors were developed by injection of 5 × 10<sup>6</sup> cells in a 1/1 mixture of matrigel (BD Biosciences) in the right shoulder of female immunodeficient mice (Nu/nu, Charles River) (5–6 weeks old). Animals were subjected to further imaging experiments when the tumors grew to at least 3 mm in diameter.

**Small Animal PET Imaging and Biodistribution Studies.** Healthy female adult Nu/nu mice were weighed and intravenously injected via the retro-orbital sinus with 3.49 ± 2.71 MBq of each radiotracer based on a consistent number of picomoles being injected. Dynamic PET imaging was performed immediately p.i. using the Mosaic HP Small Animal Imager (Philips) for 70 min with 4 × 2 min, 2 × 5 min frames with 1 min between each sinogram followed by 3 × 10 min frames. The animals were kept under anesthesia using 1.5% isoflurane from the time of administration of <sup>68</sup>Ga-labeled compounds until the end of imaging. All sinograms were reconstructed in three-dimensional standardized uptake value (SUV) images and visualized as maximum intensity projection (MIP). Processing of reconstructed images was performed with the Syntegra–Philips software (PETView; Philips Medical Systems). For each mouse submitted to dynamic PET imaging, three-dimensional regions of interest (ROIs) were drawn manually by irregular contouring on PET images as follows: total mouse, heart, kidneys, liver, and urinary bladder. The total number of voxels in a given organ was divided by the number of voxels in the “total mouse” for each frame. Data were expressed as normalized uptake in percentage injected activity per organ (%IA), and the decay-corrected mean time–activity curves (TACs) were determined for each target organ.

Static PET images were acquired 40 min p.i. for 15 min. After imaging, 1 h p.i. of [<sup>68</sup>Ga]Ga1a, [<sup>68</sup>Ga]Ga2a, and [<sup>68</sup>Ga]Ga3a (553 ± 145 pmol, 3.17 ± 0.92 MBq), mice were sacrificed and the main organs and tissues were dissected, washed, weighed, and γ-counted (1480 Wizard 3, PerkinElmer). Tumor or tissue uptake was expressed as mean ± SD percentage injected dose per gram (%ID/g), corrected for radionuclide decay.

**Near-Infrared Fluorescence Imaging.** First, 50 pmol, 500 pmol, or 5 nmol of **2a** was injected intravenously, in a 0.1 mL volume, in mice bearing subcutaneous AsPC-1 tumors. After 1, 3, or 24 h p.i., optical imaging was conducted *in vivo*, *post mortem* with the skin



These bimodal tracers should be useful to oncologists, by allowing earlier detection of PDAC primary tumors and small metastases, improving staging procedures, and tailoring of the best therapeutic strategy for each patient. For those who can benefit from surgery, the injection of the nonradioactive fluorescent tracer **2a** should improve the quality of tumor resection, leading ultimately to increased chances of survival. Future work will focus on the transposition of this dual-labeling strategy to nonpeptide antagonists of NTSR1, which exhibit promising biodistribution properties.<sup>41</sup>

## ■ EXPERIMENTAL SECTION

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Acros Organics, and Alfa Aesar and used without further purification. Fmoc-protected amino acids and coupling reagents for peptide synthesis were from Iris Biotech. (R)-NODAGA-NHS and DOTA-NHS were provided by CheMatech (Dijon, France). The tetrasulfonated cyanine Cy5\*\* was kindly given by C. Portal (EM Imaging, Edinburgh, United Kingdom). The disulfonated Cy5 and the Cy5 dye were provided by A. Romieu (ICMUB, Dijon, France). Moisture sensitive reactions were performed under a nitrogen or argon atmosphere. The purity of tested compounds was determined by RP-HPLC-MS and was >95%, unless specified. The synthesis of compounds 1–3 and **2a** is described below. Data for other compounds are available in the Supporting Information.

**Synthesis of Peptide Conjugates 1–3.** Peptides were synthesized in 0.1 mmol scale on a Liberty Blue automated microwave peptide synthesizer (CEM). The synthesis was performed by using predefined Fmoc/tBu chemistry protocols on a Fmoc-Leu Wang resin (loading of 0.32 mmol/g), with DIC and Oxyma as coupling agents, and a solution of 20% piperidine in DMF for Fmoc deprotection steps. A solution of (R)-NODAGA-NHS (2 equiv) and DIPEA (10 equiv) in dry DMF was added to the resin-bound peptide. The reaction mixture was shaken at room temperature overnight. The resin was washed three times with DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and Et<sub>2</sub>O.

The peptide was cleaved from the resin using a TFA/triisopropylsilane/H<sub>2</sub>O mixture (95/2.5/2.5, v/v/v, 5 mL) for 2 h at room temperature. The filtrate was recovered and heated at 40 °C for an additional 4 h and then concentrated under a flow of nitrogen gas, followed by precipitation in diethyl ether and centrifugation (4000 rpm, 10 min). The supernatant was removed, and the residue was dried under vacuum.

The crude peptide was purified by semipreparative HPLC on a BetaBasic-18 column (A being H<sub>2</sub>O with 0.1% TFA and B being MeCN with 0.1% TFA, with the following gradient program: 10% to 60% B over 50 min, at a flow rate of 20 mL/min), and the appropriate fractions were lyophilized to afford target peptides as white powders with a yield ranging from 43% to 69%.

**Synthesis of Peptide Conjugate 2a.** To a solution of tetrasulfonated cyanine 5.0 Cy5\*\* (1.3 equiv) in DMF were added DIPEA (7.8 equiv) and TSTU (1.3 equiv). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. This solution was added to a solution of peptide (1 equiv) and DIPEA (10 equiv) in DMF. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under vacuum, and the solid was purified by semipreparative HPLC on a SiliaChrom dt C<sub>18</sub> column (Silicycle) (A being 50 mM TEAB and B being MeCN with the following gradient program: 5% B for 10 min, 5% to 60% of B over 60 min, at a flow rate of 20 mL/min) to afford target peptide **2a** (triethylammonium salt) as a blue powder (15.8 mg, 23%, 94% pure). HRMS: *m/z* calcd for C<sub>109</sub>H<sub>167</sub>N<sub>21</sub>O<sub>33</sub>S<sub>4</sub> [M + H]<sup>+</sup> 2427.09908, found 2427.11013.

**In Vitro Stability.** Fifteen microliters of a 5 mM stock solution of peptide in H<sub>2</sub>O was stirred in a thermomixer (900 rpm, 37 °C, dark) with 135 μL of mouse serum (Sigma-Aldrich, M5905, batch SLBT4412). The final concentration in peptide was 0.5 mM. After 0 min, 20 min, 35 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, and 24 h, a sample (15 μL) was collected and diluted with 60 μL of 99% ethanol. Samples were vortexed and centrifuged (11700 rpm, 10 min) to remove precipitated

proteins. The supernatant was analyzed by RP-HPLC-MS at a wavelength of 214 nm.

**In Vitro Binding Affinity.** The affinity of each bimodal compound <sup>nat</sup>Ga-1a, <sup>nat</sup>Ga-2a, <sup>nat</sup>Ga-3a, <sup>nat</sup>Ga-3b, and <sup>nat</sup>Ga-3c for the NTSR1 receptors was measured on a competitive binding assay on human recombinant CHO cells overexpressing NTSR1, using [<sup>125</sup>I]-Tyr<sup>3</sup>-neurotensin (0.05 nM; K<sub>d</sub> = 0.22 nM) as a radioligand (Eurofins).<sup>34</sup> IC<sub>50</sub> values were converted into inhibition constants (K<sub>i</sub>) using the Cheng–Prusoff equation.

**Radiolabeling.** Compounds were radiolabeled using an R&D Synchrom module (Raytest). The <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga eluate (1.5 mL, 150–300 MBq) was adjusted to pH 3.5 with sodium acetate (0.8 M). Each compound (9–12 nmol; **1a–3a** as triethylammonium salts; **3b** and **3c** as TFA salts) was added and incubated under agitation at 40 °C for 10 min. The products were purified on a C<sub>18</sub> Sep-Pack cartridge (Waters, Milford, MA), eluted using 800 μL of 80% ethanol in the second reactor, and subsequently evaporated at 70 °C under an argon flow. The final products were diluted with 9 mg/mL sodium chloride (NaCl). HPLC quality control was performed using a reverse phase column (Discovery Bio, 5 μm, 300 Å, Supelco) on a Waters Breeze System equipped with a 1525 binary pump. Radioactivity was detected with a Berthold radio-HPLC detector (A being H<sub>2</sub>O with 0.1% TFA and B being MeCN with 0.1% TFA with the following gradient program: 17% to 80% B in 15 min, at a flow rate of 2 mL/min). The tracers were dissolved in a saline solution (9 mg/mL NaCl) before injection.

**Cell Culture and Animal Models.** Human pancreatic adenocarcinoma cell line AsPC-1 (ATCC, Rockville, MD) was cultured in RPMI-1640 medium with 10% fetal bovine serum (FBS) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

All animal experiments were carried out in compliance with the French laws relating to the conduct of animal experimentation. The subcutaneous AsPC-1 tumors were developed by injection of 5 × 10<sup>6</sup> cells in a 1/1 mixture of matrigel (BD Biosciences) in the right shoulder of female immunodeficient mice (Nu/nu, Charles River) (5–6 weeks old). Animals were subjected to further imaging experiments when the tumors grew to at least 3 mm in diameter.

**Small Animal PET Imaging and Biodistribution Studies.** Healthy female adult Nu/nu mice were weighed and intravenously injected via the retro-orbital sinus with 3.49 ± 2.71 MBq of each radiotracer based on a consistent number of picomoles being injected. Dynamic PET imaging was performed immediately p.i. using the Mosaic HP Small Animal Imager (Philips) for 70 min with 4 × 2 min, 2 × 5 min frames with 1 min between each sinogram followed by 3 × 10 min frames. The animals were kept under anesthesia using 1.5% isoflurane from the time of administration of <sup>68</sup>Ga-labeled compounds until the end of imaging. All sinograms were reconstructed in three-dimensional standardized uptake value (SUV) images and visualized as maximum intensity projection (MIP). Processing of reconstructed images was performed with the Syntegra–Philips software (PETView; Philips Medical Systems). For each mouse submitted to dynamic PET imaging, three-dimensional regions of interest (ROIs) were drawn manually by irregular contouring on PET images as follows: total mouse, heart, kidneys, liver, and urinary bladder. The total number of voxels in a given organ was divided by the number of voxels in the “total mouse” for each frame. Data were expressed as normalized uptake in percentage injected activity per organ (%IA), and the decay-corrected mean time–activity curves (TACs) were determined for each target organ.

Static PET images were acquired 40 min p.i. for 15 min. After imaging, 1 h p.i. of [<sup>68</sup>Ga]Ga1a, [<sup>68</sup>Ga]Ga2a, and [<sup>68</sup>Ga]Ga3a (553 ± 145 pmol, 3.17 ± 0.92 MBq), mice were sacrificed and the main organs and tissues were dissected, washed, weighed, and γ-counted (1480 Wizard 3, PerkinElmer). Tumor or tissue uptake was expressed as mean ± SD percentage injected dose per gram (%ID/g), corrected for radionuclide decay.

**Near-Infrared Fluorescence Imaging.** First, 50 pmol, 500 pmol, or 5 nmol of **2a** was injected intravenously, in a 0.1 mL volume, in mice bearing subcutaneous AsPC-1 tumors. After 1, 3, or 24 h p.i., optical imaging was conducted *in vivo*, *post mortem* with the skin



- (11) Seibold, U.; Wängler, B. r.; Schirmacher, R.; Wängler, C. Bimodal Imaging Probes for Combined PET and OI: Recent Developments and Future Directions for Hybrid Agent Development. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–13.
- (12) Azhdarinia, A.; Ghosh, P.; Ghosh, S.; Wilganowski, N.; Sevick-Muraca, E. M. Dual-Labeling Strategies for Nuclear and Fluorescence Molecular Imaging: a Review and Analysis. *Mol. Imaging Biol.* **2012**, *14*, 261–276.
- (13) 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.* **2013**, *3*, 184.
- (14) Körner, M.; Waser, B.; Strobel, O.; Büchler, M.; Reubi, J. C. Neurotensin Receptors in Pancreatic Ductal Carcinomas. *EJNMMI Res.* **2015**, *5*, 17.
- (15) Reubi, J. C.; Waser, B.; Friess, H.; Buchler, M.; Laissue, J. Neurotensin Receptors: a New Marker for Human Ductal Pancreatic Adenocarcinoma. *Gut* **1998**, *42*, 546–550.
- (16) Yin, X.; Wang, M.; Wang, H.; Deng, H.; He, T.; Tan, Y.; Zhu, Z.; Wu, Z.; Hu, S.; Li, Z. Evaluation of Neurotensin Receptor 1 as a Potential Imaging Target in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Amino Acids* **2017**, *49*, 1325–1335.
- (17) De Visser, M.; Janssen, P. J.; Srinivasan, A.; Reubi, J. C.; Waser, B.; Erion, J. L.; Schmidt, M. A.; Krenning, E. P.; De Jong, M. Stabilised <sup>111</sup>In-Labelled DTPA- and DOTA-Conjugated Neurotensin Analogues for Imaging and Therapy of Exocrine Pancreatic Cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30*, 1134–1139.
- (18) Krumm, B. E.; Lee, S.; Bhattacharya, S.; Botos, I.; White, C. F.; Du, H.; Vaidehi, N.; Grisshammer, R. Structure and Dynamics of a Constitutively Active Neurotensin Receptor. *Sci. Rep.* **2016**, 38564.
- (19) Myers, R. M.; Shearman, J. W.; Kitching, M. O.; Ramos-Montoya, A.; Neal, D. E.; Ley, S. V. Cancer, Chemistry, and the Cell: Molecules that Interact with the Neurotensin Receptors. *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 503–525.
- (20) Kokko, K. P.; Hadden, M. K.; Orwig, K. S.; Mazella, J.; Dix, T. A. In Vitro Analysis of Stable, Receptor-Selective Neurotensin[8–13] Analogues. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4141–4148.
- (21) Alshoukr, F.; Rosant, C.; Maes, V.; Abdelhak, J.; Raguin, O.; Burg, S.; Sarda, L.; Barbet, J.; Tourwé, D.; Pelaprat, D.; Gruaz-Guyon, A. Novel Neurotensin Analogues for Radioisotope Targeting to Neurotensin Receptor-Positive Tumors. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1602–1610.
- (22) Alshoukr, F.; Prignon, A.; Brans, L.; Jallane, A.; Mendes, S.; Talbot, J.-N.; Tourwé, D.; Barbet, J.; Gruaz-Guyon, A. 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.
- (23) Prignon, A.; Provost, C.; Alshoukr, F.; Wendum, D.; Couvelard, A.; Barbet, J.; Forgez, P.; Talbot, J.-N.; Gruaz-Guyon, A. Preclinical Evaluation of <sup>68</sup>Ga-DOTA-NT-20.3: A Promising PET Imaging Probe To Discriminate Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma from Pancreatitis. *Mol. Pharmaceutics* **2019**, *16*, 2776–2784.
- (24) Deng, H.; Wang, H.; Wang, M.; Li, Z.; Wu, Z. Synthesis and Evaluation of <sup>64</sup>Cu-DOTA-NT-Cy5.5 as a Dual-Modality PET/Fluorescence Probe to Image Neurotensin Receptor-Positive Tumor. *Mol. Pharmaceutics* **2015**, *12*, 3054–3061.
- (25) Dearling, J. L. J.; Voss, S. D.; Dunning, P.; Snay, E.; Fahey, F.; Smith, S. V.; Huston, J. S.; Meares, C. F.; Treves, S. T.; Packard, A. B. Imaging Cancer Using PET-the Effect of the Bifunctional Chelator on the Biodistribution of a (<sup>64</sup>Cu)-Labeled Antibody. *Nucl. Med. Biol.* **2011**, *38*, 29–38.
- (26) Marengo, M.; Lodola, L.; Persico, M. G.; Frangipane, V.; Facchetti, A.; Aprile, C.; Hodolic, M. Evidence of (<sup>68</sup>Ga)-DOTA-NT-20.3 Uptake in Pancreatic Adenocarcinoma AsPC-1 Cell Line - in vitro Study. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2018**, *19*, 754–759.
- (27) Brandt, M.; Cardinale, J.; Aulsebrook, M. L.; Gasser, G.; Mindt, T. L. An Overview of PET Radiochemistry, Part 2: Radiometals. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59*, 1500–1506.
- (28) Fani, M.; Del Pozzo, L.; Abiraj, K.; Mansi, R.; Tamma, M. L.; Cascato, R.; Waser, B.; Weber, W. A.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R. PET of Somatostatin Receptor-Positive Tumors Using <sup>64</sup>Cu- and <sup>68</sup>Ga-Somatostatin Antagonists: The Chelate Makes the Difference. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52*, 1110–1118.
- (29) Gourni, E.; Canovas, C.; Goncalves, V.; Denat, F.; Meyer, P. T.; Maecke, H. R. (R)-NODAGA-PSMA: A Versatile Precursor for Radiometal Labeling and Nuclear Imaging of PSMA-Positive Tumors. *PLoS One* **2015**, *10*, No. e0145755.
- (30) Pisoni, D. S.; Todeschini, L.; Borges, A. C. A.; Petzhold, C. L.; Rodembusch, F. S.; Campo, L. F. Symmetrical and Asymmetrical Cyanine Dyes. Synthesis, Spectral Properties, and BSA Association Study. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 5511–5520.
- (31) Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S. Cyanine Dye Labeling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters. *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 105–111.
- (32) Canovas, C.; Moreau, M.; Bernhard, C.; Oudot, A.; Guillemin, M.; Denat, F.; Goncalves, V. Site-Specific Dual Labeling of Proteins on Cysteine Residues with Chlorotetraazines. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 10646–10650.
- (33) Canovas, C.; Moreau, M.; Vrigneaud, J. M.; Bellaye, P. S.; Collin, B.; Denat, F.; Goncalves, V. Modular Assembly of Multimodal Imaging Agents through an Inverse Electron Demand Diels-Alder Reaction. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30*, 888–897.
- (34) Burggraaf, J.; Kamerling, I. M.; Gordon, P. B.; Schrier, L.; de Kam, M. L.; Kales, A. J.; Bendiksen, R.; Indrevoll, B.; Bjerke, R. M.; Moestue, S. A.; Yazdanfar, S.; Langers, A. M.; Swaerd-Nordmo, M.; Torheim, G.; Warren, M.; Morreau, H.; Voorneveld, P.; Buckle, T.; van Leeuwen, F. W.; Odegardstuen, L. I.; Dalsgaard, G. T.; Healey, A.; Hardwick, J. C. Detection of Colorectal Polyps in Humans Using an Intravenously Administered Fluorescent Peptide Targeted Against c-Met. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 955–961.
- (35) Coin, I.; Beyermann, M.; Bienert, M. Solid-Phase Peptide Synthesis: from Standard Procedures to the Synthesis of Difficult Sequences. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 3247–3256.
- (36) Vita, N.; Laurent, P.; Lefort, S.; Chalou, P.; Dumont, X.; Kaghad, M.; Gully, D.; Le Fur, G.; Ferrara, P.; Caput, D. Cloning and Expression of a Complementary DNA Encoding a High Affinity Human Neurotensin Receptor. *FEBS Lett.* **1993**, *317*, 139–142.
- (37) Andrés, A.; Rosés, M.; Ráfols, C.; Bosch, E.; Espinosa, S.; Segarra, V.; Huerta, J. M. Setup and Validation of Shake-Flask Procedures for the Determination of Partition Coefficients (logD) from Low Drug Amounts. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *76*, 181–191.
- (38) Maschauer, S.; Einsiedel, J.; Hübner, H.; Gmeiner, P.; Prante, O. <sup>18</sup>F- and <sup>68</sup>Ga-Labeled Neurotensin Peptides for PET Imaging of Neurotensin Receptor 1. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 6480–6492.
- (39) Maschauer, S.; Ruckdeschel, T.; Tripal, P.; Haubner, R.; Einsiedel, J.; Hübner, H.; Gmeiner, P.; Kuwert, T.; Prante, O. In Vivo Monitoring of the Antiangiogenic Effect of Neurotensin Receptor-Mediated Radiotherapy by Small-Animal Positron Emission Tomography: A Pilot Study. *Pharmaceuticals* **2014**, *7*, 464–481.
- (40) Bunschoten, A.; van Willigen, D. M.; Buckle, T.; van den Berg, N. S.; Welling, M. M.; Spa, S. J.; Wester, H.-J.; van Leeuwen, F. W. B. Tailoring Fluorescent Dyes To Optimize a Hybrid RGD-Tracer. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 1253–1258.
- (41) Schulz, J.; Rohracker, M.; Stiebler, M.; Goldschmidt, J.; Gresser, O. S.; Osterkamp, F.; Pethe, A.; Reineke, U.; Smerling, C.; Amthauer, H. Comparative Evaluation of the Biodistribution Profiles of a Series of Nonpeptidic Neurotensin Receptor-1 Antagonists Reveals a Promising Candidate for Theranostic Applications. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57*, 1120–1123.

---

# ANNEXE 2

---

## **PET Imaging of Neurotensin Receptor-Positive Tumors with <sup>68</sup>Ga-Labeled Antagonists : “the Chelate Makes Again the Difference”**

Emma RENARD, Mathieu Moreau, Pierre-Simon Bellaye, Mélanie Guillemin, Bertrand Collin, Franck Denat, Victor Goncalves

Article soumis à Journal of Medicinal Chemistry





## PET Imaging of Neurotensin Receptor-Positive Tumors with $^{68}\text{Ga}$ -Labeled Antagonists: « the Chelate Makes Again the Difference »

Emma Renard,<sup>†</sup> Mathieu Moreau,<sup>†</sup> Pierre-Simon Bellaye,<sup>‡</sup> Mélanie Guillemain,<sup>‡</sup> Bertrand Collin,<sup>‡</sup> Franck Denat,<sup>†</sup> Victor Goncalves<sup>\*†</sup>

<sup>†</sup>Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, ICMUB UMR CNRS 6302, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

<sup>‡</sup>Georges-François LECLERC Cancer Center - UNICANCER, Dijon, France

**KEYWORDS:** Neurotensin; antagonist; positron emission tomography; gallium-68

**ABSTRACT:** Neurotensin receptor 1 (NTS<sub>1</sub>) is involved in the development and progression of numerous cancers, which makes it an interesting target for the development of diagnostic and therapeutic agents. A small molecule NTS<sub>1</sub> antagonist, named [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-IPN01087, is currently evaluated in phase I/II clinical trials for the targeted therapy of neurotensin receptor-positive cancers. The identification of a PET companion diagnostic agent would facilitate the selection of patients eligible for NTS<sub>1</sub>-targeted radiotherapy. In this study, we synthesized seven compounds based on the structure of NTS<sub>1</sub> antagonists, bearing different chelating agents, and radiolabeled them with gallium-68 for PET imaging. These compounds were evaluated *in vitro* and *in vivo* in mice bearing a HT-29 xenograft. The compound [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-bisNODAGA-16 showed the best biodistribution profile with mainly signal in tumor (4.917 ± 0.776%ID/g, 2 h post-injection). Its rapid clearance from healthy tissues led to high tumor-to-organ ratios, resulting in highly contrasted PET images.

### INTRODUCTION

Molecular imaging is a non-invasive technique that participates to the rapid and accurate diagnosis of many cancers. It relies on the administration of an imaging probe capable of binding specifically to a biomarker of the disease. The localization of this probe is then classically achieved by positron emission tomography (PET) or single photon emission computed tomography (SPECT) in oncology.<sup>1</sup>

An interesting target involved in the development and progression of numerous cancers is the neurotensin receptor 1 (NTS<sub>1</sub>).<sup>2,3</sup> This G-protein coupled receptor is overexpressed in different cancers such as pancreatic ductal adenocarcinoma,<sup>4</sup> prostate cancer,<sup>5</sup> Ewing's sarcoma,<sup>6</sup> colorectal cancer,<sup>7</sup> breast cancer<sup>8</sup> and small cell lung cancer, but not present in healthy tissues.<sup>9</sup> The endogenous ligand of this receptor is a tridecapeptide called neurotensin (NT).<sup>10</sup>

These last years, neurotensin and its receptors have been the subject of numerous studies. Most of them deal with the design of NTS<sub>1</sub> agonists. Those agonists are generally peptide analogs of neurotensin, which have been labeled with radiometals or fluorophores for nuclear imaging, radiotherapy, or fluorescence imaging.<sup>11-14</sup> Despite their good affinity for NTS<sub>1</sub> (in the nanomolar range) and interesting biodistribution properties, these compounds present some drawbacks. Indeed, their half-life *in vivo* is short, due to their rapid metabolic degradation, even after chemical optimization,<sup>15,16</sup> and they often display a strong uptake in kidneys which can cause toxicity issues and prevent the detection of tumor metastasis in the surrounding organs.

In the early 90s, Sanofi-Recherche discovered a nonpeptidic antagonist of NTS<sub>1</sub> named SR45398 (Figure 1).<sup>17,18</sup> After few

years of optimization, they identified SR142948A, a drug candidate with nanomolar affinity and potency for neurotensin receptors.<sup>19,20</sup> Starting from the structure of SR142948A, a few radiotracers were developed for the diagnosis or therapy of neurotensin receptor-positive cancers.

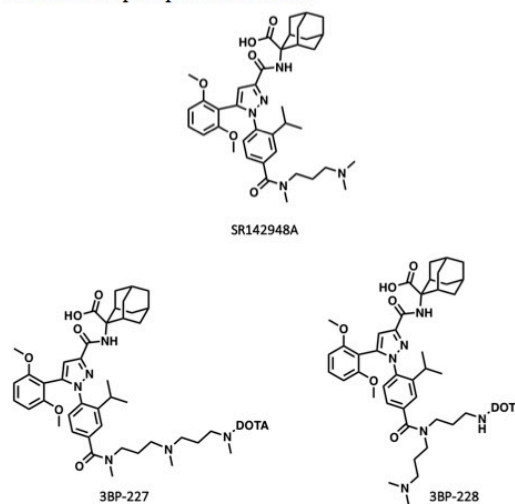


Figure 1. Chemical structures of SR142948A, 3BP-227 and 3BP-228. DOTA stands for 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid.



Such tracers present several advantages: in the absence of activation of receptor's signaling pathways, they produce no pharmacological effect; they often show better metabolic stability than peptides;<sup>21,22</sup> and, their small size allows for a rapid biodistribution, with fast renal clearance. Furthermore, it has been shown that agonists and antagonists may not necessarily recognize the same conformational states of their receptors.<sup>23–25</sup> This phenomenon has also been observed with neurotensin receptors, by Betancur *et al.*, who showed that the number of receptors labeled by the antagonist [<sup>3</sup>H]SR142948A on rat brain membranes was 80% greater than that detected when using the agonist [<sup>3</sup>H]neurotensin.<sup>20</sup>

In 2013, Lang *et al.* synthesized an analog of SR142948A and coupled it to 2-deoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluoroglucosylazide to create a PET imaging tracer.<sup>21</sup> This compound showed an excellent affinity for NTS<sub>1</sub> (0.98 nM). However, despite a fairly good uptake in tumor tissues, a significant accumulation was observed in other organs, particularly the liver. In 2016, Schulz *et al.* introduced a polyazamacrocyclic metal-chelating agent (DOTA) on different analogs of SR142948A and radiolabeled them with indium-111, a radionuclide suitable for SPECT imaging.<sup>26</sup> Their compounds [<sup>111</sup>In]In-3BP-227 and [<sup>111</sup>In]In-3BP-228 (Figure 1) showed good affinity and specificity for neurotensin receptors, as well as high tumor uptake. [<sup>111</sup>In]In-3BP-227 showed a good tumor accumulation at late time-points post injection (24 h p.i.). However, at early time-points (3 h p.i.) a high level of circulating activity was observed. In contrast, their compound [<sup>111</sup>In]In-3BP-228 showed a cleaner biodistribution profile at early time-points (3 h p.i.) and less signal at 24 h p.i. Because of these pharmacokinetic profiles, 3BP-227 was considered as a good candidate for the radiotherapy of cancer. In 2017, Schulz *et al.*, evaluated 3BP-227 (now named IPN01087) for the <sup>177</sup>Lu-radiotherapy of colon carcinoma in a preclinical study. Their promising results paved the way for a radiotherapy trial,<sup>22</sup> which was initiated in 2018 by Baum and coll. on patients with metastatic or locally advanced cancers expressing NTS<sub>1</sub>.<sup>27</sup> Preliminary results provided clinical evidence of the feasibility of treatment of ductal pancreatic adenocarcinoma with the <sup>177</sup>Lu-labeled NTS<sub>1</sub> antagonist 3BP-227.<sup>28</sup>

The availability of a PET companion diagnostic agent would greatly facilitate the selection of patients eligible for NTS<sub>1</sub>-targeted radiotherapy.<sup>29</sup> In this study, we sought to assess the influence of the chelator on the biodistribution of neurotensin receptor antagonists. A variety of chelating agents, suitable for the complexation of <sup>68</sup>Ga, were coupled to an analog of SR142948A. The resulting tracers were then evaluated *in vitro* and tested *in vivo* on mice xenografted with an HT-29 model of colorectal cancer.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Design and synthesis.** A series of seven imaging agents, antagonists of neurotensin receptors, was synthesized. In light of the study by Schulz *et al.*, we chose to build our compounds based on the structure of the compound 3BP-228.<sup>26</sup> This compound differs from 3BP-227 in its amine arm. Indeed, 3BP-227 carries a linear amine arm, while 3BP-228 has a branched amine arm (Figure 1). This difference is responsible for a change in pharmacokinetics, with [<sup>111</sup>In]In-3BP-228 showing better tumor-to-background ratio at early time-points (3 h p.i.) than [<sup>111</sup>In]In-3BP-227. Given our objective to design a PET tracer for the selection of patients, we felt it was more interesting to select the scaffold showing the fastest clearance, 3BP-228. Nonetheless,

the compound 3BP-227 was also synthesized and used as a reference in this study.

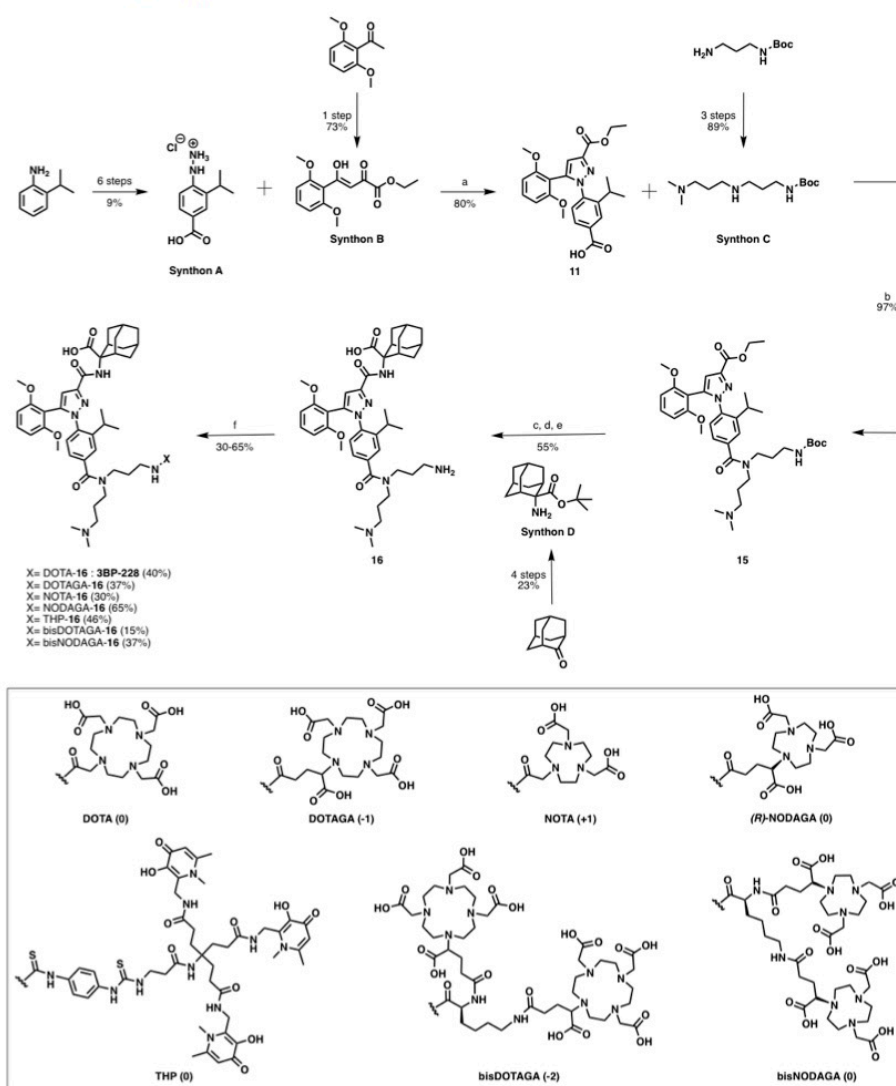
Gallium-68 was chosen as the radiometal. Indeed, this positron-emitting radioisotope has a short half-life of 67.7 min which is perfectly suited to the rapid pharmacokinetics of small molecules and reduces patient exposure to ionizing radiations compared to other radiometals with longer half-lives. In addition, <sup>68</sup>Ga has a relatively low cost and is readily available thanks to <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generators.<sup>30</sup>

Several chelating agents suitable for <sup>68</sup>Ga complexation are available.<sup>31–33</sup> Among them, we first chose to evaluate NOTA, (*R*)-NODAGA, DOTA, DOTAGA and THP. All these chelators are able to form highly stable complexes *in vivo*. Due to their differences in charge and log*D*, we hypothesized that the presence of these chelates could significantly modify the pharmacokinetics of the tracers.<sup>34–39</sup> In addition, we have also chosen to introduce two (*R*)-NODAGA or DOTAGA chelators on a same molecule in order to increase clearance from blood and improve tumor-to-background ratios. This approach was inspired by the work of Roxin *et al.*, who showed that the introduction of a metal-free DOTA on a <sup>18</sup>F-radiotracer could improve tumor uptake and increase renal excretion.<sup>40</sup>

The compounds were prepared by multi-step synthesis from four synthons. The first synthon (**A**), 3-isopropyl-4-hydrazinobenzoic acid hydrochloride, was synthesized in six steps starting from 2-isopropylaniline with a yield of 9%.<sup>41</sup> The second synthon (**B**), ethyl-4-(2,6-dimethoxyphenyl)-4-hydroxy-2-oxobut-3-enoate was prepared, starting from diethyl oxalate and 2,6-dimethoxyacetophenone, with a yield of 73%.<sup>42</sup> The amine arm (synthon **C**) was obtained in three steps with a yield of 50%.<sup>43</sup> The fourth synthon (**D**), tert-butyl-2-aminoadamantane-2-carboxylate, was synthesized in four steps starting from 2-adamantanone with a yield of 23%.<sup>44,45</sup> The linear amine arm (synthon **E**), for the reference compound 3BP-227, was prepared in one step in 80% yield. Four steps were then required to obtain the precursor **16**, ready for conjugation with the different chelating agents.<sup>41,46</sup> Finally, the introduction of the chelators was achieved in one or two steps, in yields ranging from 15 to 65% (Scheme 1).

**Stability.** In order to evaluate the stability of these molecules against enzymatic degradation, each compound was metalated with non-radioactive gallium and incubated in mouse serum at 37 °C. RP-HPLC-MS analyses were performed at different time-points (0 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h and 24 h). Interestingly, NOTA/NODAGA/THP-based compounds proved to be highly stable (> 99% intact product after 4 h) whereas DOTA/DOTAGA-based compounds showed some degradation (ca. 80% intact product after 4 h) (Table 1, Table S1). The main degradation corresponded to the loss of gallium as evidenced by mass spectrometry. This shows the importance of the cavity size on the thermodynamic stability of <sup>68</sup>Ga-complexes (the expansion of the macrocyclic ring results in a decrease in the complexation constant: log*K*<sub>Ga-NOTA</sub> = 31.0 vs log*K*<sub>Ga-DOTA</sub> = 26.1).<sup>47</sup> After 24 h, some unidentified degradation products (mass loss of 27) were also observed. Although these *in vitro* data do not necessarily reflect the metabolic stability of the compounds *in vivo*, they do confirm the good stability of small molecules relative to peptides. For comparison, only 55% of the natural neurotensin was found intact after 4 h of incubation in the same assay conditions (Table S1).



Scheme 1. Synthesis of NTS<sub>1</sub> antagonists<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) AcOH, reflux, 4 d; (b) HATU, DIPEA, DMF, RT, 6 h; (c) KOH 5 M, dioxane, RT, 18 h.; (d) HATU, NEt<sub>3</sub>, DMF, RT, 4 h; (e) TFA/DCM 50/50, RT, 1.5 h; (f) chelating agent, DIPEA, DMF, RT, 4 h. The values noted in parentheses are the estimated charge when each chelator is complexed to Ga<sup>3+</sup> at pH 7.4.

**Table 1. Percentage of inhibition constants, intact compound after 4 h, partition coefficients and radiochemical purities of compounds tested in this study**

Compound	K <sub>i</sub> (nM) <sup>a</sup>	% intact after 4 h <sup>b</sup>	LogD <sup>c</sup>	Radiochemical purity (by radio-HPLC)
[ <sup>nat</sup> 68Ga]Ga-3BP-228	1.35 [0.99 – 1.83]	80%	-2.45	> 99%
[ <sup>nat</sup> 68Ga]Ga-DOTAGA-16	3.59 [3.03 – 4.26]	78%	-1.75	> 99%
[ <sup>nat</sup> 68Ga]Ga-NOTA-16	0.73 [0.60 – 0.88]	> 99%	-1.85	94%
[ <sup>nat</sup> 68Ga]Ga-NODAGA-16	1.75 [0.77 – 3.96]	> 99%	-1.74	97%
[ <sup>nat</sup> 68Ga]Ga-THP-16	1.80 [1.55 – 2.10]	90%	-1.17	99%
[ <sup>nat</sup> 68Ga]Ga-bisDOTAGA-16	61.9 [51.9 – 73.8]	78%	-3.62	> 99%
[ <sup>nat</sup> 68Ga]Ga-bisNODAGA-16	9.05 [7.28 – 11.2]	> 99%	-3.44	> 99%
[ <sup>nat</sup> 68Ga]Ga-3BP-227	0.55 [0.51 – 0.59]	90%	-2.62	98%
[ <sup>nat</sup> 68Ga]Ga-DOTA-NT-20.3	10.0 [6.51 – 15.4]	N.D.	-2.50	> 99%

<sup>a</sup>K<sub>i</sub> values are presented as “mean [95% confidence interval]” and were determined using <sup>nat</sup>Ga-compound and [<sup>125</sup>I]-Tyr<sup>3</sup>-neurotensin as the radioligand. <sup>b</sup>Percentage of intact compound after 4 h incubation in mouse serum at 37 °C using <sup>nat</sup>Ga-compounds. <sup>c</sup>Partition coefficients (logD) were determined at pH 7.4 using <sup>68</sup>Ga-compounds and are presented as mean ± SD. N.D.: not determined.

**In vitro Binding Affinity.** The affinity for NTS<sub>1</sub> of the seven <sup>nat</sup>Ga-metalated compounds and the reference <sup>nat</sup>Ga-3BP-227 was determined in a competition experiment on CHO cells overexpressing NTS<sub>1</sub> receptor. [<sup>125</sup>I]-Tyr<sup>3</sup>-neurotensin (0.05 nM; K<sub>d</sub> = 0.22 nM) was used as ligand.<sup>48</sup> The K<sub>i</sub> values were in the nanomolar range for most of the compounds (Table 1, Figure S48). The compounds with a single chelator showed the best affinities with K<sub>i</sub> values between 0.7 and 3.6 nM, similar to the reference <sup>nat</sup>Ga-3BP-227 (0.55 nM). According to these results, it seems that the presence of a positive charge favors binding to NTS<sub>1</sub> (<sup>nat</sup>Ga-NOTA-16, K<sub>i</sub> 0.73 nM), and conversely, an increase in the number of negative charges has a detrimental effect on affinity (<sup>nat</sup>Ga-DOTAGA-16, K<sub>i</sub> 3.59 nM). In comparison, the compounds with two chelating agents showed a significant decrease in affinity (K<sub>i</sub> of 9 nM and 62 nM for <sup>nat</sup>Ga-bisNODAGA-16 and <sup>nat</sup>Ga-bisDOTAGA-16 respectively).

**Radiolabeling and Partition Coefficients.** All the compounds were radiolabeled with <sup>68</sup>Ga, using [<sup>68</sup>Ga]GaCl<sub>3</sub> obtained after elution of a generator with an 0.1 M HCl solution. A solution of sodium acetate buffer (0.5 M, pH 5.56) was added to the compounds in order to reach a final pH of 3.5. Ten percent of ethanol were also introduced to limit radiolysis. The radiolabeling of NOTA, NODAGA and THP-based compounds was performed at 37 °C for five minutes whereas ten minutes at 95 °C were required to radiolabel DOTA and DOTAGA-based compounds. Each tracer was purified on a C<sub>18</sub> Sep-Pack column to obtain the desired compound with a radiochemical purity > 94%, as determined by radio-HPLC. The radiochemical yields ranged from 35% to 80% and molar activities from 8.8 to 17.8 MBq/nmol at the end of radiolabeling. Partition coefficients (logD) were determined by the shake-flask method in octanol and PBS at pH 7.4.<sup>49</sup> All compounds were found to be hydrophilic. As expected, compounds with two chelating agents are more hydrophilic with logD values of about -3.5 while values ranging from -1.7 to -2.6 are obtained for compounds with only one chelating agent. The compound [<sup>68</sup>Ga]Ga-THP-16 is the least hydrophilic of all with a logD of -1.2 (Table 1).

**PET-MRI Imaging and Biodistribution.** In order to evaluate the biodistribution of each compound, the radiolabeled tracers

were injected (500 pmol, 3-8 MBq) in nude mice bearing a xenograft of human colorectal cancer (HT-29) in the flank. This tumor model expresses NTS<sub>1</sub>.<sup>48</sup> Static PET-MRI images were recorded between 1.5 h and 2 h post injection.

First, we chose to compare [<sup>68</sup>Ga]Ga-3BP-228 to two references: [<sup>68</sup>Ga]Ga-3BP-227 and a well-validated NTS<sub>1</sub> peptide agonist named [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-NT-20.3.<sup>50,51,11</sup> As expected from the results of Schulz *et al.* with <sup>111</sup>In-labeled compounds, [<sup>68</sup>Ga]Ga-3BP-228 showed a much cleaner biodistribution profile than its isomer. Indeed, a high level of circulating activity was observed for [<sup>68</sup>Ga]Ga-3BP-227, leading to tumor-to-organ ratios of 1.243 ± 0.279 and 11.588 ± 2.478, for the blood and the muscle respectively, while ratios of 7.540 ± 2.938 and 33.675 ± 19.096 were obtained for the same organs with [<sup>68</sup>Ga]Ga-3BP-228 (Table 2, Figure S49).

In comparison, [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-NT-20.3 showed a typical biodistribution profile for a NTS<sub>1</sub> peptide agonist, with a lower uptake in the tumor compared to [<sup>68</sup>Ga]Ga-3BP-228, but a minimal activity in all the other tissues (apart from kidneys), giving tumor-to-organ ratios around two times higher than [<sup>68</sup>Ga]Ga-3BP-228 for the blood, liver, muscle and heart (Table 2, Figure S49).

**Table 2. Ex vivo biodistribution and tumor-to-organ ratios of 3BP-227, 3BP-228 and DOTA-NT-20.3**

	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-3BP-228	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-3BP-227	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-DOTA-NT-20.3
Uptake (%ID/g)	n=4	n=4	n=4
Blood	1.083 ± 0.222	9.155 ± 0.705	0.088 ± 0.017
Liver	0.908 ± 0.129	3.725 ± 2.181	0.103 ± 0.022
Gallbladder	3.347 ± 3.208	4.240 ± 1.786	0.108 ± 0.071
Kidneys	2.525 ± 0.641	4.775 ± 1.055	5.705 ± 1.457
Spleen	0.408 ± 0.085	1.610 ± 0.147	0.113 ± 0.026
Heart	0.555 ± 0.102	3.518 ± 0.843	0.053 ± 0.019



Lungs	1.060 ± 0.164	4.675 ± 0.429	0.173 ± 0.036
Muscle	0.348 ± 0.345	0.985 ± 0.114	0.025 ± 0.010
Intestine	1.093 ± 2.507	2.018 ± 0.497	0.405 ± 0.072
Carcass	1.125 ± 0.098	4.253 ± 0.621	0.160 ± 0.022
Tumor	7.825 ± 0.560	11.238 ± 1.704	1.655 ± 0.497
Tumor-to-organ ratios	n=4	n=4	n=4
Blood	7.540 ± 2.938	1.243 ± 0.279	19.08 ± 5.778
Muscle	33.68 ± 19.10	11.59 ± 2.478	57.50 ± 10.04
Kidneys	3.125 ± 0.695	2.393 ± 0.346	0.300 ± 0.110

(Top) *Ex vivo* biodistribution of [<sup>68</sup>Ga]Ga-3BP-228, [<sup>68</sup>Ga]Ga-3BP-227 and [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-NT-20.3, 2 h p.i. Values are expressed as the percentage of injected dose per gram of tissue (%ID/g ± SD). (Bottom) Tumor-to-organ ratios from the *ex vivo* biodistribution. Values are expressed as means ± SD.

Overall, these results showed that NTS<sub>1</sub> small molecule antagonists have a good potential for <sup>68</sup>Ga-PET diagnosis but that their pharmacokinetics needed to be further optimized.

Next, we undertook the evaluation of our seven novel derivatives. All these compounds showed important differences in terms of biodistribution. For instance, administration of the THP-derivative gave a much stronger signal in lungs, spleen and liver (12.7 ± 4.1%ID/g, 46.4 ± 9.3%ID/g, 42.0 ± 8.1%ID/g respectively) than all the other compounds (0.5-1.3%ID/g) (Figure 2). Moreover, the tumor uptake of [<sup>68</sup>Ga]Ga-THP-16 was very low (1.33 ± 0.35%ID/g) (Tables S2 and S3, Figure S49). We assume that this behavior results from the lipophilicity of the THP moiety.<sup>52</sup> Indeed, [<sup>68</sup>Ga]Ga-THP-16 has a log*D* of -1.17 while the other compounds have log*D*s between -1.75 and -3.62 (Table 1).

The other four compounds, labeled with a single macrocyclic chelator, gave fairly similar profiles for most organs. The main

difference was observed in the gallbladder and intestines (Figure 2, Figure 3). Indeed, the NOTA/NODAGA-compounds showed a much stronger signal in these organs than DOTA/DOTAGA-compounds, suggesting a partial hepatobiliary excretion pathway for these derivatives. This may limit their interest for the imaging of abdominal tumors. Concerning tumor uptake, we observed on PET images that the compounds [<sup>68</sup>Ga]Ga-NODAGA-16 and [<sup>68</sup>Ga]Ga-3BP-228 showed a better accumulation in the tumor than [<sup>68</sup>Ga]Ga-NOTA-16 and [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-16 (Figure 2). Indeed, for the NODAGA- and DOTA-based compound, a signal of about 8%ID/g 2 h p.i. was observed while the NOTA- and DOTAGA-based compounds gave only 3-4%ID/g (Figure 3). However, the best tumor-to-organ ratios were observed for the tracers [<sup>68</sup>Ga]Ga-3BP-228 and [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-16 (Table 3).

Next, the introduction of two chelating agents on a same molecule was attempted with the objective to speed-up the clearance of the tracer from non-targeted tissues. The corresponding PET images revealed a cleaner profile with almost no circulating signal after 2 hours (Figure 2). The bisDOTAGA derivative, [<sup>68</sup>Ga]Ga-bisDOTAGA-16, showed very little signal in all organs but also a rather low tumor uptake (1.305 ± 0.062 %ID/g) leading to tumor-to-organ ratios quite similar to those obtained with the corresponding single-chelator [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-16 (Figure 3, Table 3). We assume that the limited retention in the tumor tissue is probably related to its reduced affinity for NTS<sub>1</sub> (*K<sub>i</sub>* = 61.9 nM) compared to the other molecules. In contrast, [<sup>68</sup>Ga]Ga-bisNODAGA-16 showed a remarkably clean biodistribution profile with less signal in all non-targeted organs, while retaining a good tumor uptake value of 4.917 ± 0.776%ID/g, leading to the best tumor-to-organ ratios (Figure 2, Figure 3, Table 3). Interestingly, this compound did not accumulate in the gallbladder and intestines.

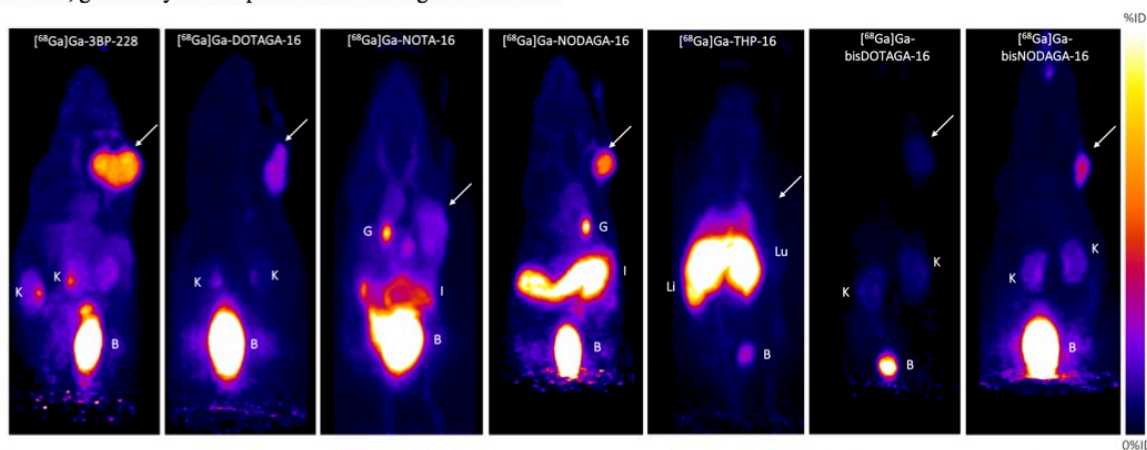


Figure 2. Maximum intensity projection (MIP) images obtained between 1.5 h and 2 h p.i. of [<sup>68</sup>Ga]Ga-3BP-228, [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-16, [<sup>68</sup>Ga]Ga-NOTA-16, [<sup>68</sup>Ga]Ga-NODAGA-16, [<sup>68</sup>Ga]Ga-THP-16, [<sup>68</sup>Ga]Ga-bisDOTAGA-16, and [<sup>68</sup>Ga]Ga-bisNODAGA-16. The tumor is showed by a white arrow. Abbreviations: G, gallbladder; I, intestines; K, kidneys; B, bladder; Li, liver; Lu, lungs.

**Table 3. Tumor-to-organ ratios from the *ex vivo* biodistribution at 2 h p.i.**

	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-3BP-228	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-DOTAGA-16	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-NOTA-16	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-NODAGA-16	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-bis-DOTAGA-16	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-bisNODAGA-16	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-DOTA-NT-20.3
Tumor-to-organ ratios	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4
Blood	7.540 ± 2.938	6.093 ± 1.173	2.788 ± 1.172	4.468 ± 1.085	10.028 ± 2.189	13.190 ± 4.216	19.083 ± 5.778
Liver	8.493 ± 1.681	6.355 ± 3.481	2.763 ± 0.534	8.225 ± 0.815	5.443 ± 1.342	12.767 ± 0.485	16.455 ± 5.499
Gallbladder	3.075 ± 2.966	1.533 ± 0.442	N.D.	1.755 ± 2.381	2.540 ± 2.129	5.907 ± 4.996	12.337 ± 4.645
Kidneys	3.125 ± 0.695	2.158 ± 0.655	1.288 ± 0.244	2.555 ± 1.116	0.393 ± 0.051	1.450 ± 0.053	0.300 ± 0.110
Spleen	19.360 ± 5.319	15.683 ± 6.892	7.770 ± 2.449	19.230 ± 4.444	11.355 ± 2.131	23.893 ± 3.485	15.255 ± 6.235
Heart	14.640 ± 5.641	11.965 ± 2.251	6.683 ± 2.103	11.543 ± 2.797	13.123 ± 2.672	29.800 ± 2.376	26.483 ± 2.214
Lungs	7.480 ± 2.430	6.300 ± 2.023	3.000 ± 0.896	6.718 ± 1.469	5.205 ± 0.962	11.280 ± 0.520	9.903 ± 3.965
Muscle	33.675 ± 19.096	20.353 ± 6.295	8.080 ± 2.482	4.814 ± 2.069	12.058 ± 6.012	24.940 ± 8.603	57.500 ± 10.037
Intestine	7.145 ± 2.064	6.125 ± 2.026	0.808 ± 0.167	1.900 ± 0.177	8.843 ± 5.184	19.747 ± 5.633	4.290 ± 1.899
Carcass	7.548 ± 2.582	4.233 ± 1.444	2.840 ± 0.898	5.345 ± 1.351	4.220 ± 0.528	8.250 ± 1.533	10.290 ± 2.606

Values are expressed as mean ± SD. Data for THP-16 are shown in table S3.

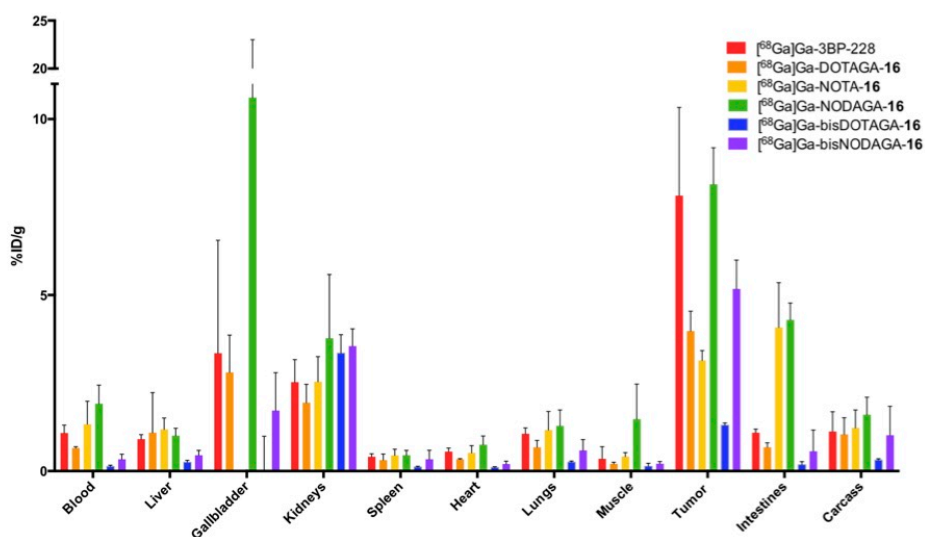


Figure 3. *Ex vivo* biodistribution data of <sup>68</sup>Ga-compounds 2 h p.i. Values are expressed as the percentage of injected dose per gram (%ID/g, mean ± SD) for each collected organ. Data for [<sup>68</sup>Ga]Ga-THP-16 are presented in table S2.

In order to evaluate the specificity for NTS<sub>1</sub>, a blocking experiment (in the presence of a 100-fold molar excess of SR142948A) was carried out with the tracers [<sup>68</sup>Ga]Ga-bisNODAGA-16, [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-16 and [<sup>68</sup>Ga]Ga-3BP-228. The uptake in all isolated organs remained essentially unchanged, apart from tumor uptake whose value decreased by a factor of 2 to 5 (

Figure 4, Table S4). PET-MRI imaging confirmed the biodistribution results (Figure S50). These results demonstrate the specificity of these tracers for neurotensin receptor-positive tumors.



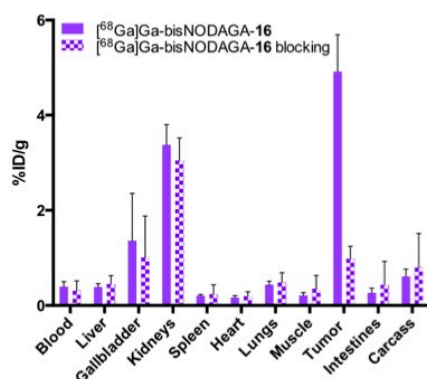


Figure 4. *Ex vivo* biodistribution of [<sup>68</sup>Ga]Ga-bisNODAGA-16 2 h p.i., with or without a 100-fold excess of SR142948A.

## CONCLUSION

In a seminal paper published in 2012, Fani *et al.* stated that “the chelate makes the difference”, stressing that the structure of a chelating agent can greatly influence the biodistribution of a tracer.<sup>53</sup> Since then, numerous teams confirmed this observation.<sup>34–37,39,54–58</sup> Here, we investigated this effect on a series of NTS, small molecule antagonists. By evaluating seven different chelating agents introduced on the same NTS<sub>1</sub> antagonist molecule, we were able to identify a promising PET tracer, [<sup>68</sup>Ga]Ga-bisNODAGA-16, that showed rapid accumulation in the tumor ( $4.917 \pm 0.776\%ID/g$ , 2 h p.i.), and a fast clearance from blood and other organs. This behavior led to contrasted PET-MRI images, with tumor-to-organ ratios of  $1.45 \pm 0.05$ ,  $13.2 \pm 4.2$  to  $24.9 \pm 8.6$  for kidneys, blood and muscle respectively. This antagonist showed a biodistribution profile similar to that of the agonist peptide analogue [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-NT-20.3, with comparable or even better tumor-to-organ ratios for organs such as kidneys, spleen, heart, lungs and intestines.

Unfortunately, to date, the effect of the chelating agent on the pharmacokinetics of a tracer is still hard to predict and needs to be evaluated *in vivo*. For example, although a study by Young's *et al.* has shown that the introduction of THP on a PSMA-radiotracer could give very good results,<sup>59</sup> in our study, the THP derivative proved to be too lipophilic, resulting in a poor tumor uptake and unfavorable hepatobiliary elimination. Several studies have suggested that the charge of the chelate would have a major impact on the biodistribution.<sup>39,58,35</sup> In our specific case, compounds with neutral charge complexes presented a better tumor accumulation *in vivo*. On a positive note, it appears that the addition of an extra-chelator is a reliable and straightforward strategy to speed up the renal excretion of tracers, leading to better images, provided that the affinity is retained.<sup>40</sup> In addition, it facilitates radiochemistry and increases the molar activities that can be potentially achieved.

Today, with <sup>177</sup>Lu-labeled IPN01087 being tested clinically for the treatment of various cancers, we believe that the discovery of the tracer [<sup>68</sup>Ga]Ga-bisNODAGA-16 is timely. It could serve as a useful <sup>68</sup>Ga-PET diagnosis agent for multiple cancers and assist in selection of patients eligible for this therapy. Future

work will focus on the evaluation of this compound in other cancer models.

## EXPERIMENTAL SECTION

**General Information.** All chemicals were purchased from Merck, Acros Organics and Alfa Aesar and used without further purification. DOTA-NHS, DOTAGA-anhydride, NOTA-NHS, (*R*)-NODAGA-NHS, THP-NCS, DOTAGA(*t*Bu)<sub>4</sub> and NODAGA(*t*Bu)<sub>3</sub> were provided by CheMatech (Dijon, France). Moisture sensitive reactions were performed under nitrogen or argon atmosphere. The purity of final compounds was determined by RP-HPLC-MS and was > 95% for all tested compounds, unless stated.

**Experimental Procedures and Characterization Data for synthon A. 2-isopropylacetanilide (1).** A solution containing 2-isopropylaniline (5 mL, 35.3 mmol, 1 equiv.) and toluene (48 mL) was cooled in an ice bath. Acetic anhydride (3.52 mL, 37.1 mmol, 1.05 equiv.) was added slowly. After stirring for 45 minutes at RT, the reaction medium was evaporated. The red oil obtained was then taken up with petroleum ether (15 mL). The white precipitate formed was filtered and dried under vacuum to give a white solid (5.83 g, 93%, purity >99%). RP-HPLC-MS: *t*<sub>r</sub> = 3.82 min., *m/z* calculated for C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO [M+H]<sup>+</sup> 178.1, found 178.0. R<sub>f</sub>(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 98/2) = 0.26. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.25 (d, J=6.8 Hz, 6H), 2.2 (s, 3H), 3.05 (hept, J=6.8 Hz, 1H), 7-7.3 (m, 4H), 7.6 (m, 1H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 23.2 (CH<sub>3</sub>), 24.3 (CH<sub>3</sub>), 28.1 (CH), 125.4 (CH), 125.8 (CH), 126.4 (CH), 126.5 (CH), 134.1 (C), 141.1 (C), 168.9 (C) ppm. mp: 72°C.

**4-Bromo-2-isopropylacetanilide (2).** A solution of *N*-bromo succinimide (7.53 g, 42.3 mmol, 1.5 equiv.) in DMF (14 mL) was added dropwise over 45 minutes to a solution of 2-isopropylacetanilide (1) (5 g, 28.2 mmol, 1 equiv.) in DMF (14 mL). The mixture was stirred at RT overnight. The reaction mixture was evaporated to obtain a yellow oil, extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, washed with acidic water, brine and dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvent was evaporated to give a yellow solid, which was purified by flash-column chromatography (A: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, B: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1; with the following gradient program: 0% to 40% of B in 25 CV). A white solid (4.62 g, 64%, purity: 93%) was obtained. RP-HPLC-MS: *t*<sub>r</sub> = 4.26 min., *m/z* calculated for C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>BrNO [M-H]<sup>-</sup> 254.0, found 254.0. R<sub>f</sub>(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 98/2) = 0.32. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.23 (d, J=6.8 Hz, 6H), 2.19 (s, 3H), 2.98 (hept, J=6.8 Hz, 1H), 7.00 (br, 1H), 7.30 (d, J=8.5 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.53 (d, J=8.5 Hz, 1H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 23.0 (CH<sub>3</sub>), 24.3 (CH<sub>3</sub>), 28.2 (CH), 119.7 (C), 126.8 (CH), 129.0 (CH), 129.6 (CH), 133.2 (C), 143.0 (C), 168.8 (C) ppm. mp: 132°C.

**4-Cyano-2-isopropylacetanilide (3).** A mixture of 4-bromo-2-isopropylacetanilide (2) (4.8 g, 18.74 mmol, 1 equiv.), DMF (22.5 mL), cuprous cyanide (2.51 g, 28.1 mmol, 1.5 equiv.) and water (0.370 mL) was stirred under reflux overnight. After cooling, the reaction medium was concentrated under vacuum and water (58 mL) was added to the mixture under stirring. The precipitate was filtered off, rinsed with water and dried under vacuum. The grey/brown solid was purified by flash-column chromatography (A: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, B: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1; with the following gradient program: 0% to 40% of B in 25 CV). A white solid (1.23 g, 33%, purity: 95%) was obtained. RP-HPLC-MS: *t*<sub>r</sub> = 3.65 min., *m/z* calculated for C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O [M-H]<sup>-</sup> 201.1, found 201.1. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.28 (d, J=6.8 Hz, 6H), 2.24 (s, 3H), 3.01 (hept, J=6.8 Hz, 1H), 7.25 (br, 1H), 7.49 (d, J=8.5 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 8.08 (d, J=8.5 Hz, 1H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 22.6 (CH<sub>3</sub>), 24.7 (CH<sub>3</sub>), 27.8 (CH), 108.4 (C), 119.1 (C), 123.4 (CH), 129.8 (CH), 130.5 (CH), 138.5 (C), 168.4 (C) ppm. mp: 139°C.

**4-Cyano-2-isopropylaniline hydrochloride (4).** A mixture of 4-cyano-2-isopropylacetanilide (3) (2.5 g, 15.3 mmol, 1 equiv.), absolute ethanol (12 mL) and 1N HCl (12 mL) was stirred under reflux for three days. A solution of 10% NaOH (7 mL) was added to reach a pH of 10. The reaction medium was extracted three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, the organic layers were combined, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The orange oil obtained was dissolved in diethylether (36 mL)



and 1M ethereal hydrogen chloride (10 mL) was added. The white precipitate was filtered off and rinsed with diethylether to give the expected product (2.21 g, 74%, purity: 91%). RP-HPLC-MS:  $t_r$  = 4.22 min.,  $m/z$  calculated for  $C_{10}H_{13}N_2$   $[M+CH_3CN]^+$  202.3, found 202.1.  $^1H$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1.14 (d,  $J$ =6.8 Hz, 6H), 2.96 (hept,  $J$ =6.8 Hz, 1H), 6.72 (d,  $J$ =8.3 Hz, 1H), 7.28 (d,  $J$ =8.3 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H) ppm;  $^{13}C$ -NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 22.4 (CH<sub>3</sub>), 26.7 (C), 107.4 (C), 115.1 (C), 121.3 (CH), 129.7 (CH), 131.1 (CH) ppm. mp: 186°C.

**4-amino-3-isopropylbenzoic acid hydrochloride (5).** A solution of potassium hydroxide (16.8 g, 0.3 mol, 20 equiv.), water (18 mL) and 1,2-dimethoxyethane (1.5 mL) was added to 4-cyano-2-isopropylaniline hydrochloride (4) (3.0 g, 15.0 mmol, 1 equiv.). The mixture was heated to reflux for three days. After cooling, concentrated HCl (12 mL) was added to reach a pH of 1 and the mixture was then extracted three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layers were combined, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to yield an orange solid (2.42 g, 75%, purity: 97%). RP-HPLC-MS:  $t_r$  = 3.33 min.,  $m/z$  calculated for  $C_{10}H_{13}NO_2$   $[M+H+CH_3CN]^+$  221.1, found 221.0.  $R_f$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 98/2) = 0.3.  $^1H$ -NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.30 (d,  $J$ =6.8 Hz, 6H), 2.85 (hept,  $J$ =6.8 Hz, 1H), 6.66 (d,  $J$ =8.3 Hz, 1H), 7.80 (dd,  $J$ =8.3, 1.9 Hz, 1H), 7.92 (d,  $J$ =1.9 Hz, 1H) ppm;  $^{13}C$ -NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 22.1 (CH<sub>3</sub>), 27.8 (CH), 114.7 (CH), 119.1(C), 128.5 (CH), 129.8 (CH), 131.4 (C), 148.9 (C), 172.5 (C) ppm. mp: 130°C.

**3-isopropyl-4-hydrazinobenzoic acid hydrochloride (synthon A).** A solution of concentrated HCl (25 mL) and AcOH (22 mL) was added to 4-amino-3-isopropylbenzoic acid hydrochloride (5) (1.3 g, 6.0 mmol, 1 equiv.). The mixture was cooled to -5 °C and a solution of NaNO<sub>2</sub> (0.62 g, 9.0 mmol, 1.5 equiv.) in water (4.5 mL) was added dropwise over 10 minutes. The mixture was stirred at 0 °C for 3 h and then cooled to -10 °C. A solution of stannous chloride dihydrate (4.11 g, 18.0 mmol, 3.1 equiv.) in concentrated HCl (4.5 mL) was added slowly. The temperature was allowed to rise to RT and the precipitate formed was filtered off after 2 h and rinsed with 1M HCl (5 mL). A yellowish powder (1.29 g, 93%, purity: 89%) was obtained after drying over P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. RP-HPLC-MS:  $t_r$  = 0.4 min.,  $m/z$  calculated  $C_{10}H_{14}N_2O_2$   $[2M+H]^+$  389.2, found 389.2.  $^1H$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1.19 (d,  $J$ =6.8 Hz, 6H), 3.14 (hept,  $J$ =6.8 Hz, 1H), 6.98 (d,  $J$ =8.4 Hz, 1H), 7.76 (d,  $J$ =8.4 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 8.31 (br, 1H) ppm;  $^{13}C$ -NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 22.9 (CH<sub>3</sub>), 26.5 (CH), 112.6 (CH), 124.0 (C), 127.0 (CH), 128.5 (CH), 134.7 (C), 146.1 (C), 167.6 (C) ppm. mp: 245°C.

**Experimental Procedures and Characterization Data for synthon B. Ethyl-4-(2,6-dimethoxyphenyl)-4-hydroxy-2-oxobut-3-enoate (synthon B).** Sodium hydride 60% (0.40 g, 9.96 mmol, 1.2 equiv.) was added to a solution of diethyl oxalate (1.36 g, 9.96 mmol, 1.2 equiv.) in DMF (5 mL) and the mixture was stirred for 5 minutes. A solution of 2,6-dimethoxyacetophenone (1.5 g, 8.3 mmol, 1 equiv.) in DMF (5 mL) was slowly added over 15 minutes. The mixture was then stirred at RT overnight. The reaction medium was extracted with EtOAc three times, ensuring the pH remained below 6 between each extraction. The organic layers were combined, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. Following recrystallization from EtOH, a yellowish powder (1.7 g, 73%, purity: 90%) was obtained. RP-HPLC-MS:  $t_r$  = 4.90 min.,  $m/z$  calculated for  $C_{14}H_{16}O_6$   $[M+H]^+$  281.1, found 281.1.  $^1H$ -NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.37 (t,  $J$ =7.1 Hz, 3H), 3.82 (s, 6H), 4.35 (q,  $J$ =7.1 Hz, 2H), 6.59 (d,  $J$ =8.4 Hz, 2H), 6.61 (s, 1H), 7.34 (t,  $J$ =8.4 Hz, 1H), 14.33 (br 1H) ppm;  $^{13}C$ -NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 14.2 (CH<sub>3</sub>), 56.2 (CH<sub>3</sub>), 62.5 (CH<sub>2</sub>), 104.2 (CH), 106.4 (CH), 117.2 (C), 132.4 (CH), 158.0 (C), 162.6 (C), 163.9 (C), 195.9 (C) ppm. mp: 103°C.

**Experimental Procedures and Characterization Data for synthon C. Tert-butyl 3-((2-nitrophenyl)sulfonamido)propyl-carbamate (6).** A solution of *N*-Boc-1,3-propanediamine (0.5 g, 2.87 mmol, 1 equiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) and triethylamine (0.4 mL, 2.87 mmol, 1 equiv.) was cooled in an ice-water bath. 2-nitrobenzenesulfonyl chloride (0.636 g, 2.87 mmol, 1 equiv.) was added over a period of 5 min. After 5 min, the ice bath was removed and the reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 15 min. The reaction mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and washed three times with a

solution of citric acid (pH = 3). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum. The yellowish oil was purified by flash-column chromatography (A: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, B: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1; with the following gradient program: 100% to 0% of A in 20 CV). An oil, which crystallizes, was obtained (0.942 g, 90%, purity: 98%). RP-HPLC-MS:  $t_r$  = 4.46 min,  $m/z$  calculated for  $C_{14}H_{21}N_3O_6S$   $[M+H]^+$  360.1, found 260.1  $[M-Boc+H]^+$ .  $R_f$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9/1) = 0.68.  $^1H$ -NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.42 (s, 9H), 1.69 (quint,  $J$ =6.4 Hz, 2H), 3.15 (q,  $J$ =6.4 Hz, 2H), 3.21 (q,  $J$ =6.4 Hz, 2H), 4.67 (br, 1H), 5.87 (br, 1H), 7.72 (m, 2H), 7.84 (m, 1H), 8.16 (m, 1H) ppm;  $^{13}C$ -NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 28.4 (CH<sub>3</sub>), 30.6 (CH<sub>2</sub>), 37.2 (CH<sub>2</sub>), 40.8 (CH<sub>2</sub>), 125.3 (CH), 130.9 (CH), 132.7 (CH), 133.4 (CH) ppm. (Note: three quaternary carbons not detected).

**Tert-butyl 3-((N-(3-(dimethylamino)propyl)-2-nitrophenyl)sulfonamido)propyl)carbamate (7).** To a solution of tert-butyl 3-((2-nitrophenyl)sulfonamido)propyl)carbamate (6) (0.94 g, 2.6 mmol, 1 equiv.) in DMF (10 mL) was added K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.08 g, 7.8 mmol, 3 equiv.). To the stirred suspension was added 3-dimethylamino-1-propyl hydrochloride (0.45 g, 2.86 mmol, 1.1 equiv.) over a period of 5 min. The resulting suspension was heated to 60 °C overnight. The reaction mixture was cooled to RT, diluted with water (50 mL), and extracted three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layers were combined, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum. A yellowish oil (1.15 g, 99%, purity: 96%) was obtained. RP-HPLC-MS:  $t_r$  = 3.6 min,  $m/z$  calculated for  $C_{19}H_{32}N_4O_6S$   $[M+H]^+$  445.2, found 445.2.  $^1H$ -NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.41 (s, 9H), 1.66 (quint,  $J$ =6.9 Hz, 2H), 1.74 (quint,  $J$ =6.9 Hz, 2H), 2.13 (s, 6H), 2.19 (t,  $J$ =7.0 Hz, 2H), 3.14 (m, 2H), 3.32 (t,  $J$ =7.4 Hz, 2H), 3.36 (t,  $J$ =7.4 Hz, 2H), 4.91 (br, 1H), 7.62 (m, 2H), 7.98 (m, 2H) ppm;  $^{13}C$ -NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 26.5 (CH<sub>2</sub>), 28.4 (CH<sub>3</sub>), 37.3 (CH<sub>2</sub>), 45.3 (CH<sub>2</sub>), 45.4 (CH<sub>3</sub>), 45.9 (CH<sub>2</sub>), 56.5 (CH<sub>2</sub>), 79.2 (C), 124.2 (CH), 130.6 (CH), 131.7 (CH), 133.4 (CH), 133.5 (C), 148.1 (C), 156.0 (C) ppm.

**Tert-butyl 3-((3-(dimethylamino)propyl)amino)propyl-carbamate (synthon C).** To a solution of tert-butyl 3-((N-(3-(dimethylamino)propyl)-2-nitrophenyl)sulfonamido)propyl)carbamate (7) (1.1 g, 2.5 mmol, 1 equiv.) in DMF (10 mL) was added cesium carbonate (3.3 g, 10 mmol, 4 equiv.). Thiophenol (0.51 mL, 5 mmol, 2 equiv.) was then added to the suspension and the reaction mixture was stirred at 40 °C for 5 h. The reaction medium was extracted in a solution of citric acid (pH = 3) and washed three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. After basification with a solution of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, the compound was extracted four times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layers were combined, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum. The yellowish oil was purified by semi-preparative HPLC on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA; with the following gradient program: 0% of B for 10 min, 0% to 40% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min) to obtain a white solid as 3 TFA salt (0.681 g, 56%). RP-HPLC-MS:  $t_r$  = injection peak,  $m/z$  calculated for  $C_{13}H_{29}N_3O_2$   $[M+H]^+$  260.2, found 260.3.  $^1H$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1.38 (s, 9H), 1.70 (quint,  $J$ =7.8 Hz, 2H), 1.95 (quint,  $J$ =7.8 Hz, 2H), 2.78 (s, 6H), 2.89 (m, 2H), 2.96 (m, 2H), 2.99 (m, 2H), 3.11 (m, 2H) ppm;  $^{13}C$ -NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 21.3 (CH<sub>2</sub>), 26.7 (CH<sub>2</sub>), 28.8 (CH<sub>3</sub>), 37.5 (CH<sub>2</sub>), 42.7 (CH<sub>2</sub>), 44.3 (CH<sub>3</sub>), 45.2 (CH<sub>2</sub>), 54.2 (CH<sub>2</sub>), 78.3 (C) ppm. (Note: one quaternary carbon not detected).

**Experimental Procedures and Characterization Data for synthon D. 2-aminoadamantane-2-carbonitrile (8).** A mixture of 2-adamantanone (2 g, 13.3 mmol, 1 equiv.), NaCN (0.784 g, 16 mmol, 1.2 equiv.), aqueous ammonia 25% solution (2.4 mL) and ammonium chloride (1.423 g, 26.6 mmol, 2 equiv.) was dissolved in water (12 mL) and EtOH (24 mL). The resulting solution was stirred at 50 °C overnight. The solution was cooled to RT, extracted with Et<sub>2</sub>O (120 mL) and concentrated. The white solid obtained was then purified on a silica plug (heptane/EtOAc 7:3). A white powder (2.16 g, 92%) was obtained. RP-HPLC-MS:  $t_r$  = 4.9 min.,  $m/z$  calculated for  $C_{11}H_{16}N_2$   $[M+H+MeCN]^+$  218.1, found 218.1.  $R_f$  (heptane/EtOAc, 7/3) = 0.4.  $^1H$ -NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.54 (m, 1H), 1.70 (m, 1H), 1.72 (m, 1H), 1.76 (m, 1H), 1.84 (m, 1H), 1.87 (m, 1H), 1.90 (m, 1H), 1.93 (m, 1H), 1.96 (m, 1H), 1.98 (m, 1H), 2.06 (m, 1H), 2.14 (m, 1H), 2.23 (d, 1H), 2.51 (m, 1H) ppm;  $^{13}C$ -NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 26.5 (CH<sub>2</sub>),



26.8 (CH), 27.5 (CH), 30.3 (CH<sub>2</sub>), 35.0 (CH<sub>2</sub>), 36.4 (CH<sub>2</sub>), 36.6 (CH), 37.6 (CH<sub>2</sub>), 39.3 (CH<sub>2</sub>), 56.4 (C), 125.5 (C) ppm. mp: 186°C.

***N*-(2-cyanoadamantan-2-yl)benzamide (9)**. To a solution of 2-aminoadamantane-2-carbonitrile (**8**) (1.5 g, 8.5 mmol, 1 equiv.) in THF (15 mL) was added a solution of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.78 g, 12.9 mmol, 1.52 equiv.) in water (15 mL). To the resulting solution was added dropwise, over 30 min, a solution of benzoyl chloride (1.48 mL, 12.8 mmol, 1.5 equiv.) in THF (15 mL) with vigorous stirring at RT. After 5 min, a white precipitate began to form. After a further 2 h, the white solid was isolated by filtration and dried under vacuum. The solid was purified on a silica plug (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5) to obtain a white powder (1.64 g, 69%, purity: 90%). RP-HPLC-MS: *t*<sub>r</sub> = 4.79 min., *m/z* calculated for C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O [M+H]<sup>+</sup> 281.2, found 281.1. R<sub>f</sub> (heptane/EtOAc, 7/3) = 0.31. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.76 (m, 3H), 1.85-2.02 (m, 8H), 2.05 (m, 1H), 2.32 (d, 1H), 2.65 (m, 1H), 6.12 (br, 1H), 7.43 (td, J=8.5, 1.7 Hz, 2H), 7.52 (t, J=8.5, 1.7 Hz, 1H), 7.77 (dt, J=8.5, 1.7 Hz, 2H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 26.2 (CH), 26.5 (CH), 27.6 (CH<sub>2</sub>), 31.5 (CH<sub>2</sub>), 33.9 (CH), 34.2 (CH<sub>2</sub>), 37.3 (CH<sub>2</sub>), 39.4 (CH<sub>2</sub>), 47.1 (CH), 57.3 (C), 120.2 (C), 127.2 (CH), 128.9 (CH), 132.3 (CH), 134.0 (C), 166.6 (C) ppm. mp: 250°C.

**2-aminoadamantane-2-carboxylic acid hydrochloride (10)**. To *N*-(2-cyanoadamantan-2-yl)benzamide (**9**) (1 g, 3.6 mmol, 1 equiv.) was added acetic acid (18 mL), concentrated HCl (5 mL) and water (3 mL). The white suspension was then heated to reflux for 5 days. The reaction mixture was concentrated under vacuum to obtain a white solid which was triturated twice in hot Et<sub>2</sub>O (40 mL) and twice in hot MeCN (25 mL). A white powder (0.768 g, 92%) was obtained. RP-HPLC-MS: *t*<sub>r</sub> = 0.5 min, *m/z* calculated for C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 196.1, found 196.3. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.6-2.2 (m, 14H), 8.59 (br, 2H), 13.84 (br, 1H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 26.2 (CH), 31.2 (CH<sub>2</sub>), 32.2 (CH), 34.4 (CH<sub>2</sub>), 37.5 (CH<sub>2</sub>), 63.9 (C), 171.4 (C) ppm. mp: 271°C.

***tert*-butyl-2-aminoadamantane-2-carboxylate (synthon D)**. A suspension of 2-aminoadamantane-2-carboxylic acid hydrochloride (**10**) (0.7 g, 3.0 mmol, 1 equiv.) in *tert*-butyl acetate (25 mL) was cooled to 0 °C. HClO<sub>4</sub> (0.42 mL, 4.8 mmol, 1.6 equiv.) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at RT overnight. 2M NaOH (40 mL) was added slowly at 0 °C to quench the reaction until the pH reached 9-10. The mixture was then extracted with EtOAc (4 × 100 mL) and washed with brine. After being dried with MgSO<sub>4</sub>, the organic layer was filtered and concentrated under vacuum to obtain a white solid, which was purified by flash-column chromatography (A: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, B: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1; with the following gradient program: 0% to 20% of B in 10 CV, 20% of B for 10 CV). A white solid (0.3 g, 40%, purity: 96%) was obtained. RP-HPLC-MS: *t*<sub>r</sub> = 3.7 min., *m/z* calculated for C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 252.2, found 252.2. R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 98/2) = 0.34. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.35 (m, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.47 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.69 (m, 6H), 1.97 (m, 2H), 2.15 (m, 2H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 26.9 (CH), 27.2 (CH<sub>3</sub>), 27.9 (CH), 32.0 (CH<sub>2</sub>), 34.1 (CH), 35.1 (CH<sub>2</sub>), 37.8 (CH<sub>2</sub>), 61.8 (C), 79.9 (C), 176.0 (C) ppm. mp: 99°C.

**Experimental Procedures and Characterization Data for synthon E. Benzyl methyl(3-(methyl(3-(methylamino)propyl)-amino)propyl)carbamate (synthon E)**. A solution of *N,N*-bis[3-(methylamino)propyl]methylamine (2 mL, 11 mmol, 5 equiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) was cooled to -78 °C. To this solution was added dropwise a solution of benzyl chloroformate (0.3 mL, 2.2 mmol, 1 equiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 mL) over 1 h. The reaction was stirred at -78 °C for 1.5 h before warming to room temperature and stirred for another 15 h. The white suspension obtained was washed twice with a solution of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5%, twice with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum. The colorless oil obtained was purified by semi-preparative RP-HPLC. A colorless oil (0.542 g, 80%, purity: 94%) was isolated. RP-HPLC-MS: *t*<sub>r</sub> = 0.32 min, *m/z* calculated for C<sub>17</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 308.2, found 308.2. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.95 (m, 2H), 2.21 (m, 2H), 2.66 (s, 3H), 2.76 (m, 4H), 2.91 (s, 3H), 3.07 (m, 5H), 3.34 (m, 2H), 5.09 (s, 2H), 5.76 (br, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 7.3-7.4 (m, 5H), 9.30 (br, NH<sup>+</sup>) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 21.1 (CH<sub>2</sub>), 22.4 (CH<sub>2</sub>), 33.3 (CH<sub>3</sub>), 39.8 (CH<sub>3</sub>), 45.9 (CH<sub>3</sub>), 46.2 (CH<sub>2</sub>), 53.1 (CH<sub>2</sub>),

54.3 (CH<sub>2</sub>), 67.6 (CH<sub>2</sub>), 116.0 (q, TFA), 127.6 (CH), 128.2 (CH), 128.6 (CH), 136.4 (C), 157.2 (C), 161.3 (q, TFA) ppm.

**Experimental Procedures and Characterization Data for 3BP-227. 4-(5-(2,6-dimethoxyphenyl)-3-(ethoxycarbonyl)-1H-pyrazol-1-yl)-3-isopropylbenzoic acid (11)**. A mixture of 3-isopropyl-4-hydrazinobenzoic acid hydrochloride (**synthon A**) (0.56 g, 2.4 mmol, 1.05 equiv.) and ethyl-4-(2,6-dimethoxyphenyl)-4-hydroxy-2-oxobut-3-enolate (**synthon B**) (0.65 g, 2.3 mmol, 1 equiv.) in AcOH (8.5 mL) was stirred under reflux for 4 days. The brownish suspension was poured into 15 mL of ice-bath water and the yellow precipitate was filtered off and washed with water. The yellow solid was purified on a silica plug (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) to obtain the expected product (0.8 g, 80%, purity: 92%). RP-HPLC-MS: *t*<sub>r</sub> = 5.1 min, *m/z* calculated for C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 439.2, found 439.2. R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9/1) = 0.52. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 0.96 (d, J=5.3 Hz, 6H), 1.31 (t, J=7.1 Hz, 3H), 2.65 (m, 1H), 3.61 (s, 6H), 4.31 (q, J=7.1 Hz, 2H), 6.60 (d, J=8.5 Hz, 2H), 6.83 (s, 1H), 7.28 (d, J=8.2 Hz, 1H), 7.31 (t, J=8.5 Hz, 1H), 7.76 (dd, J=8.2, 1.8 Hz, 1H), 7.85 (d, J=1.8 Hz, 1H), 13.19 (br, 1H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 14.7 (CH<sub>3</sub>), 27.6 (CH<sub>3</sub>), 40.6 (CH), 56.0 (CH<sub>3</sub>), 60.8 (CH<sub>2</sub>), 104.3 (CH), 106.1 (C), 111.2 (CH), 127.0 (CH), 127.4 (CH), 128.6 (CH), 132.20 (C), 132.2 (CH), 139.2 (C), 141.2 (C), 143.7 (C), 146.0 (C), 158.4 (C), 162.2 (C), 167.1 (C) ppm.

**Ethyl 1-(4-(3-(3-((benzyloxy)carbonyl)(methylamino)propyl)-(methylamino)propyl)(methyl)carbamoyl)-2-isopropylphenyl)-5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1H-pyrazole-3-carboxylate (12)**. To a solution of **11** (200 mg, 0.46 mmol, 1 equiv.) in anhydrous DMF (2 mL) was added DIPEA (96 μL, 0.55 mmol, 1.2 equiv.) and HATU (228 mg, 0.6 mmol, 1.3 equiv.). The solution was stirred 20 min at RT. A solution of benzyl methyl(3-(methyl(3-(methylamino)propyl)amino)propyl)carbamate (TFA salt) (**Synthon E**) (169 mg, 0.55 mmol, 1.2 equiv.) in DMF (2 mL) and DIPEA (289 μL, 1.66 mmol, 3.6 equiv.) was added to the reaction mixture. The yellow solution was stirred 7 h at RT. The reaction mixture was evaporated to obtain a brown oil which was taken up in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and washed four times with brine. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum. The oil was purified by flash-column chromatography (A: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, B: MeOH; with the following gradient program: 0% to 100% of B in 30 CV). An orange oil was obtained (110 mg, 33%, purity: 98%). RP-HPLC-MS: *t*<sub>r</sub> = 4.55 min, *m/z* calculated for C<sub>41</sub>H<sub>53</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> 728.9, found 728.4. R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95/5) = 0.23. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.96 (s, 6H), 1.39 (t, J=7.1 Hz, 3H), 2.00 (m, 2H), 2.06 (m, 2H), 2.71 (m, 1H), 2.76 (m, 2H), 2.90 (s, 3H), 2.93 (s, 3H), 3.12 (m, 5H), 3.38 (m, 2H), 3.55 (m, 2H), 3.63 (s, 6H), 4.41 (q, J=7.1 Hz, 2H), 5.10 (s, 2H), 6.44 (d, J=8.3 Hz, 2H), 6.92 (s, 1H), 7.2-7.4 (m, 9H) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 12.5 (CH<sub>3</sub>), 14.4 (CH<sub>3</sub>), 21.8 (CH<sub>2</sub>), 22.6 (CH<sub>2</sub>), 25.4 (CH), 27.6 (CH<sub>3</sub>), 34.3 (CH<sub>3</sub>), 37.7 (CH<sub>3</sub>), 39.4 (CH<sub>3</sub>), 43.5 (CH<sub>2</sub>), 44.4, 45.6 (CH<sub>2</sub>), 50.8 (CH<sub>3</sub>), 53.4, 53.8 (CH<sub>2</sub>), 55.5 (CH<sub>3</sub>), 60.9 (CH<sub>2</sub>), 103.5 (CH), 106.5 (C), 111.2 (CH), 116.6 (CH), 124.3 (CH), 124.9 (CH), 127.7 (CH), 128.2 (CH), 128.6 (CH), 131.6 (C), 135.8 (C), 136.5 (C), 139.1 (C), 139.4 (C), 143.9 (C), 146.7 (C), 158.3 (C), 162.8 (C), 175.0 (C) ppm.

**1-(4-(3-(3-((benzyloxy)carbonyl)(methylamino)propyl)-(methylamino)propyl)(methyl)carbamoyl)-2-isopropylphenyl)-5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid (13)**. To a solution of **12** (0.1 g, 0.14 mmol, 1 equiv.) in dioxane (2 mL) was added a solution of 5M KOH (0.274 mL, 1.4 mmol, 10 equiv.). The yellow solution was stirred overnight at 40°C. The reaction mixture was concentrated under vacuum. The residue was dissolved in water and acidified to a pH of 2 with 1M HCl. The aqueous phase was extracted three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum to obtain a yellow oil (91 mg, 95%, purity: 98%). RP-HPLC-MS: *t*<sub>r</sub> = 4.12 min, *m/z* calculated for C<sub>39</sub>H<sub>49</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> 700.3, found 700.3. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.96 (m, 6H), 2.03 (m, 4H), 2.69 (m, 1H), 2.77 (m, 2H), 2.90 (s, 3H), 2.93 (s, 3H), 3.0-3.2 (m, 5H), 3.4 (m, 2H), 3.5 (m, 2H), 3.6 (s, 6H), 5.11 (s, 2H), 6.44 (d, J=8.3 Hz, 2H), 6.95 (s, 1H), 7.2-7.4 (m, 9H) ppm.

**2-(5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1-(2-isopropyl-4-(methyl(3-(methylamino)propyl)-amino)propyl)-carbamoyl)-phenyl)-1H-pyrazole-3-carboxamido-adamantane-2-carboxylic acid (14)**. To a



solution of **13** (75 mg, 0.11 mmol, 1 equiv.) in DMF (2 mL) was added NEt<sub>3</sub> (45 µL, 3.21 mmol, 3 equiv.) and HATU (44.9 mg, 0.12 mmol, 1.1 equiv.). The yellowish solution was stirred 20 min at RT. A solution of *tert*-butyl-2-aminoadamantane-2-carboxylate (**Synthon D**) (29.7 mg, 0.12 mmol, 1.1 equiv.) in DMF (1 mL) and NEt<sub>3</sub> (29.8 µL, 0.21 mmol, 2 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred for 4 h at RT. The reaction mixture was concentrated under vacuum to obtain an orange oil. The intermediate was hydrogenated in EtOH (10 mL) and Pd/C 10% under an atmospheric pressure of H<sub>2</sub>. The suspension was stirred at RT for 2 days. The reaction mixture was filtered on celite, and concentrated under vacuum to give an oil. Finally, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL), TFA (1 mL) and H<sub>2</sub>O (0.1 mL) were added. The yellow solution was stirred at RT for 1.5 h. The reaction mixture was concentrated under vacuum and purified by semi-preparative RP-HPLC on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 30% of B for 5 min, 30% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min) to obtain the product as a white powder (2 TFA salt, 29 mg, 27%, purity >99%). RP-HPLC-MS: *t*<sub>r</sub> = 3.75 min, *m/z* calculated for C<sub>42</sub>H<sub>58</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 743.4, found 743.3. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 1.10 (s, 6H), 1.65-1.90 (m, 9H), 2.0-2.25 (m, 9H), 2.64 (m, 2H), 2.73 (s, 3H), 2.80 (m, 1H), 2.94 (s, 3H), 2.97 (s, 3H), 3.12 (m, 4H), 3.27 (m, 2H), 3.68 (s, 6H), 6.57 (d, J=8.5 Hz, 2H), 6.79 (s, 1H), 7.28 (t, J=8.5 Hz, 1H), 7.37 (d, J=8.1 Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.57 (s, 1H) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 18.4 (CH<sub>3</sub>), 23.1 (CH<sub>2</sub>), 23.9 (CH<sub>2</sub>), 29.0 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 29.9 (CH), 34.5 (CH<sub>2</sub>), 34.9 (CH<sub>2</sub>), 35.0 (CH<sub>2</sub>), 35.8 (CH<sub>3</sub>), 39.0 (CH<sub>2</sub>), 39.8 (CH<sub>3</sub>), 41.2 (CH<sub>3</sub>), 55.2 (CH<sub>3</sub>), 57.1 (CH<sub>2</sub>), 65.5 (CH<sub>2</sub>), 106.6 (C), 110.8 (CH), 126.2 (CH), 127.1 (CH), 130.2 (CH), 133.8 (C), 138.8 (C), 148.3 (C), 160.7 (C), 176.3 (C) ppm. HRMS: *m/z* calculated for C<sub>42</sub>H<sub>58</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 743.44972, found 743.44937; *m/z* calculated for [M+2H]<sup>2+</sup> 372.22883, found 372.22752.

**2-((1-(4-((3-((DOTA-methylamino)propyl)-methylamino)propyl)-methyl-carbamoyl)-2-isopropylphenyl)-5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1H-pyrazole-3-carbonyl)-amino)-adamantane-2-carboxylic acid (3BP-227)**. To a solution of **14** (TFA salt) (17 mg, 19.8 µmol, 1 equiv.) in anhydrous DMF (1 mL) and DIPEA (10.3 µL, 59.4 µmol, 3 equiv.) was added a solution of DOTA-NHS (30.16 mg, 39.6 µmol, 2 equiv.) in anhydrous DMF (1 mL) with DIPEA (41.5 µL, 0.24 mmol, 12 equiv.). The reaction mixture was stirred overnight at RT. The reaction medium was concentrated under vacuum and the resulting oil was purified on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 30% of B for 5 min, 30% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product **3BP-227** was obtained as a white powder (4 TFA salt, 22.8 mg, 73%, purity: 99%). RP-HPLC-MS: *t*<sub>r</sub> = 3.88 min, *m/z* calculated for C<sub>58</sub>H<sub>84</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1129.6, found 1129.8. HRMS: *m/z* calculated for C<sub>58</sub>H<sub>84</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1129.62987, found 1129.63250; *m/z* calculated for [M+2H]<sup>2+</sup> 565.30309, found 565.31998.

**Experimental Procedures and Characterization Data for precursor 16**. **Ethyl 1-(4-((3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propyl)-3-(dimethylamino)propyl)carbamoyl)-2-isopropylphenyl)-5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1H-pyrazole-3-carboxylate (15)**. To a solution of **11** (0.4 g, 0.91 mmol, 1 equiv.) in anhydrous DMF (5 mL) was added DIPEA (0.174 mL, 1.0 mmol, 1.1 equiv.) and HATU (0.38 g, 1.0 mmol, 1.1 equiv.). The orange solution was stirred 10 min at RT. A solution of *tert*-butyl 3-((3-(dimethylamino)propyl)amino)propylcarbamate (2 TFA) (**Synthon C**) (0.487 g, 1.0 mmol, 1.1 equiv.) in DMF (5 mL) and DIPEA (0.522 mL, 3.0 mmol, 3.3 equiv.) was added to the reaction mixture. The orange solution was stirred for 6 h at RT. The reaction mixture was evaporated to obtain an orange oil which was taken up in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and washed twice with brine. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum. An orange oil was obtained, which was purified by flash-column chromatography (A: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, B: MeOH; with the following gradient program: 100% to 70% of B in 30 CV). The product was isolated as an orange oil (0.602 g, 97%, purity: 96%). RP-HPLC-MS: *t*<sub>r</sub> = 4.27 min, *m/z* calculated for C<sub>37</sub>H<sub>53</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> 680.4, found 680.5. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.98 (s, 6H), 1.39 (s, 9H), 1.41 (t, J=7.1 Hz, 3H), 1.68 (m, 2H), 1.81 (m, 1H), 2.04 (m, 1H), 2.19 (m, 2H), 2.72 (m, 1H), 2.79 (s, 6H), 3.1-3.3 (m, 4H), 3.55 (m, 2H), 3.65 (s, 6H), 4.42 (q, J=7.1 Hz, 2H),

4.81 (br, 1H), 6.46 (d, J=8.4 Hz, 2H), 6.92 (s, 1H), 7.16 (d, J=7.8 Hz, 1H), 7.2-7.25 (m, 2H), 7.39 (d, J=7.8 Hz, 1H) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 12.2 (CH<sub>3</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 17.4 (CH), 18.6 (CH<sub>2</sub>), 27.6 (CH<sub>3</sub>), 28.4 (CH<sub>3</sub>), 42.3 (CH<sub>2</sub>), 43.1 (CH<sub>3</sub>), 43.6 (CH<sub>3</sub>), 54.2 (CH<sub>3</sub>), 55.5 (CH<sub>2</sub>), 60.9 (CH<sub>2</sub>), 81.5 (CH), 103.5 (CH), 111.1 (CH), 124.2 (CH), 128.8 (CH), 131.6 (CH), 133.9 (CH), 158.3 (C), 162.7 (C) ppm.

**2-((1-(4-((3-aminopropyl)-(3-dimethylaminopropyl)-carbamoyl)-2-isopropylphenyl)-5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1H-pyrazole-3-carbonyl)-amino)-adamantane-2-carboxylic acid (16)**. To a solution of **15** (0.602 g, 0.86 mmol, 1 equiv.) in dioxane (9 mL) was added a solution of 5M KOH (0.886 mL, 4.43 mmol, 5 equiv.). The yellow solution was stirred overnight at RT. The reaction mixture was concentrated under vacuum. The residue was taken up in water and washed three times with Et<sub>2</sub>O. The aqueous phase was acidified to pH 3-4 (precipitation) with a solution of 1M HCl and evaporated. EtOH was added to the residue and KCl was filtered off. The solution was concentrated under vacuum to obtain an orange oil. DMF (15 mL), NEt<sub>3</sub> (0.46 mL, 3.3 mmol, 3 equiv.) and HATU (0.46 g, 1.2 mmol, 1.1 equiv.) were added. The yellowish solution was stirred for 15 min at RT. A solution of *tert*-butyl-2-aminoadamantane-2-carboxylate (**Synthon D**) (0.302 g, 1.2 mmol, 1.1 equiv.) in DMF (5 mL) and NEt<sub>3</sub> (0.31 mL, 2.2 mmol, 2 equiv.) was added to the reaction mixture and stirred for 4 h at RT. The reaction mixture was concentrated under vacuum to obtain an orange oil. Finally, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL), TFA (5 mL) and H<sub>2</sub>O (0.5 mL) were added. The yellow solution was stirred at RT for 1.5 h. The reaction mixture was concentrated under vacuum and purified by semi-preparative HPLC on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 20% of b for 5 min, 20% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min) to obtain **16** as a white powder (2 TFA salt, 0.456 g, 55%, purity: 99%). RP-HPLC-MS: *t*<sub>r</sub> = 3.66 min, *m/z* calculated for C<sub>41</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 729.4, found 729.3. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.97 (s, 6H), 1.49 (m, 2H), 1.63 (m, 4H), 1.67-1.80 (m, 4H), 1.90 (m, 2H), 1.98 (m, 2H), 2.11 (m, 4H), 2.51 (m, 2H), 2.6-2.7 (m, 2H), 2.72 (s, 3H), 2.78 (m, 1H), 2.91 (s, 3H), 3.09 (m, 1H), 3.2-3.35 (m, 3H), 3.57 (s, 6H), 6.6 (d, J=8.4 Hz, 2H), 6.87 (s, 1H), 7.2-7.4 (m, 4H) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 11.3 (CH<sub>3</sub>), 26.4 (CH<sub>3</sub>), 27.6 (CH<sub>3</sub>), 33.4 (CH<sub>2</sub>), 36.7 (CH<sub>2</sub>), 42.6 (CH<sub>3</sub>), 42.8 (CH<sub>3</sub>), 54.5 (CH<sub>2</sub>), 55.2 (CH<sub>2</sub>), 55.6 (CH<sub>3</sub>), 63.6 (CH<sub>2</sub>), 104.0 (CH), 105.6 (C), 109.0 (CH), 123.5 (CH), 124.3 (CH), 129.9 (CH), 137.8 (C), 158.1 (C), 159.4 (C) ppm. HRMS: *m/z* calculated for C<sub>41</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 729.43407, found 729.43468; *m/z* calculated for [M+Na]<sup>+</sup> 751.41590, found 751.41378.

**General procedure for the coupling of the chelating agent**. To a solution of **16** (1 equiv.) in anhydrous DMF (0.5 mL) and DIPEA (2 equiv.), was added a solution of the chelating agent (1.5 equiv.) in anhydrous DMF (0.5 mL) with DIPEA (6-9 equiv. depending of the chelator). The reaction mixture was stirred for 2-4 h at RT until completion. The reaction medium was concentrated under vacuum and the oil was purified on a semi-preparative column.

**2-((1-(4-((3-DOTA-aminopropyl)-(3-dimethylaminopropyl)-carbamoyl)-2-isopropylphenyl)-5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1H-pyrazole-3-carbonyl)-amino)-adamantane-2-carboxylic acid (3BP-228)**. Chelator: DOTA-NHS, Reaction time : 2 h, Equiv. DIPEA : 9. Purification on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 20% of B for 5 min, 20% to 60% of B in 45 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product **3BP-228** was obtained as a white powder (3 TFA salt, 21 mg, 40%, purity: 93%). RP-HPLC-MS: *t*<sub>r</sub> = 3.83 min, *m/z* calculated for C<sub>57</sub>H<sub>82</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1115.6, found 1115.7. HRMS: *m/z* calculated for C<sub>57</sub>H<sub>82</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1115.61422, found 1115.61484; *m/z* calculated for [M+Na]<sup>+</sup> 1137.59605, found 1139.59447.

**2-((1-(4-((3-DOTAGA-aminopropyl)-(3-dimethylaminopropyl)-carbamoyl)-2-isopropylphenyl)-5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1H-pyrazole-3-carbonyl)-amino)-adamantane-2-carboxylic acid (DOTAGA-16)**. Chelator: DOTAGA anhydride, Reaction time : 4 h, Equiv. DIPEA : 6. Purification on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 30% of B for 5 min, 30% to 70% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product DOTAGA-16 was obtained as a white powder (4 TFA salt,



21.59 mg, 37%, purity: 97%). RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.82$  min,  $m/z$  calculated for  $C_{60}H_{86}N_{10}O_{15}$   $[M+H]^+$  1187.6, found 1187.6. HRMS:  $m/z$  calculated for  $C_{60}H_{86}N_{10}O_{15}$   $[M+H]^+$  1187.63535, found 1187.63587;  $m/z$  calculated for  $[M+2H]^{2+}$  594.32165, found 594.32077.

**2-((1-(4-((3-NOTA-aminopropyl)-(3-dimethylaminopropyl)-carbamoyl)-2-isopropylphenyl)-5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1H-pyrazole-3-carbonyl)-amino)-adamantane-2-carboxylic acid (NOTA-16).** Chelator: NOTA-NHS, Reaction time : 3 h, Equiv. DIPEA : 7.5. Purification on a BetaBasic-18 column (A:  $H_2O$  0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 30% of B for 5 min, 30% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product NOTA-16 was isolated as a white powder (3 TFA salt, 14.39 mg, 30%, purity: 98%). RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.85$  min,  $m/z$  calculated for  $C_{53}H_{75}N_9O_{11}$   $[M+H]^+$  1014.6, found 1014.6. HRMS:  $m/z$  calculated for  $C_{53}H_{75}N_9O_{11}$   $[M+H]^+$  1014.56654, found 1014.56629.

**2-((1-(4-((3-NODAGA-aminopropyl)-(3-dimethylaminopropyl)-carbamoyl)-2-isopropylphenyl)-5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1H-pyrazole-3-carbonyl)-amino)-adamantane-2-carboxylic acid (NODAGA-16).** Chelator: NODAGA-NHS, Reaction time : 2 h, Equiv. DIPEA : 8. Purification on a BetaBasic-18 column (A:  $H_2O$  0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 30% of B for 5 min, 30% to 70% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product NODAGA-16 was obtained as a white powder (4 TFA salt, 35.89 mg, 65%, purity: 96%). RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.9$  min,  $m/z$  calculated for  $C_{56}H_{79}N_9O_{13}$   $[M+H]^+$  1086.6, found 1086.7. HRMS:  $m/z$  calculated for  $C_{56}H_{79}N_9O_{13}$   $[M+H]^+$  1086.58767, found 1086.58672;  $m/z$  calculated for  $[M+2H]^{2+}$  543.79781, found 543.79634.

**2-((1-(4-((3-THP-aminopropyl)-(3-dimethylaminopropyl)-carbamoyl)-2-isopropylphenyl)-5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1H-pyrazole-3-carbonyl)-amino)-adamantane-2-carboxylic acid (THP-16).** Chelator: THP-NCS, Reaction time : 4 h, Equiv. DIPEA : 9. Purification on a BetaBasic-18 column (A:  $H_2O$  0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 30% of B for 5 min, 30% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product THP-16 was obtained as a white powder (7 TFA salt, 13.6 mg, 46%, purity: 97%), the peak at 3.8 min corresponds to the expected compound and the peak at 4.1 min corresponds to an Fe-adduct formed during the analysis). RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.84$  min,  $m/z$  calculated for  $C_{86}H_{112}N_{16}O_{16}S_2$   $[M+2H]^{2+}$  845.4, found 845.7. HRMS:  $m/z$  calculated for  $C_{86}H_{112}N_{16}O_{16}S_2$   $[M+2H]^{2+}$  845.38630, found 845.40299;  $m/z$  calculated for  $[M+3H]^{3+}$  563.93739, found 564.26978.

**Experimental Procedures and Characterization Data for bis-DOTAGA-16.** **Lys(DOTAGA(tBu)<sub>2</sub>).** To a solution of DOTAGA(tBu)<sub>4</sub> (40 mg, 57  $\mu$ mol, 1.9 equiv.) in anhydrous DMF (1 mL) with DIPEA (21  $\mu$ L, 120  $\mu$ mol, 4 equiv.) was added HATU (21.7 mg, 57  $\mu$ mol, 1.9 equiv.). The yellow solution was stirred for 15 min at RT and DIPEA (21  $\mu$ L, 120  $\mu$ mol, 4 equiv.) and L-lysine, monochlorhydrate (5.5 mg, 30 mmol, 1 equiv.) were added. The reaction mixture was stirred for 4 h at RT. The reaction medium was concentrated under vacuum and purified on a BetaBasic-18 column (A:  $H_2O$  0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 20% of B for 5 min, 20% to 80% of B in 70 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product was obtained as a white powder (4 TFA salt, 25.8 mg, 44%, purity: 90%). RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.88$  min,  $m/z$  calculated for  $C_{76}H_{138}N_{10}O_{20}$   $[M+H]^+$  1512.01, found 1512.1;  $[M+2H]^{2+}$  756.5, found 756.5. HRMS:  $m/z$  calculated for  $C_{76}H_{138}N_{10}O_{20}$   $[M+H]^+$  1512.01683, found 1512.01873;  $m/z$  calculated for  $[M+2H]^{2+}$  756.51239, found 756.51434.

**BisDOTAGA-16.** To a solution of Lys(DOTAGA(tBu)<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (15.7 mg, 10.4  $\mu$ mol, 1 equiv.) in anhydrous DMF (0.5 mL) was added DIPEA (5.4  $\mu$ L, 31.2  $\mu$ mol, 3 equiv.) and then HATU (3.95 mg, 10.4  $\mu$ mol, 1 equiv.). The solution was stirred 15 min at RT and a solution of 16 (8.77 mg, 10.4  $\mu$ mol, 1 equiv.) in anhydrous DMF (0.5 mL) with DIPEA (7.3  $\mu$ L, 41.6  $\mu$ mol, 4 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred 5 h at RT. The reaction medium was concentrated under vacuum and a solution of TFA:triisopropylsilane: $H_2O$  (95:2.5:2.5, v/v/v, 2 mL) was added. The reaction was stirred for 3 h at 45°C and concentrated under a flow of nitrogen gas. The solution was purified on a BetaBasic-18 column (A:  $H_2O$  0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA

with the following gradient program: 20% of B for 5 min, 20% to 60% of B in 60 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product bisDOTAGA-16 was obtained as a white powder (4 TFA salt, 7.94 mg, 34%, purity: 97%). RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.73$  min,  $m/z$  calculated for  $C_{85}H_{128}N_{16}O_{25}$   $[M+2H]^{2+}$  887.5, found 888.2;  $[M+3H]^{3+}$  592.0, found 592.5. HRMS:  $m/z$  calculated for  $C_{85}H_{128}N_{16}O_{25}$   $[M+2H]^{2+}$  887.46977, found 887.47499.

**Experimental Procedures and Characterization Data for bisNODAGA-16.** **Lys(NODAGA(tBu)<sub>2</sub>).** To a solution of NODAGA(tBu)<sub>3</sub> (75 mg, 0.138 mmol, 2.5 equiv.) in anhydrous DMF (1 mL) with DIPEA (47.9  $\mu$ L, 0.275 mmol, 5 equiv.) was added TSTU (50 mg, 0.165 mmol, 3 equiv.). The yellow solution was stirred for 30 min at RT and a suspension of L-lysine, monochlorhydrate (10 mg, 0.055 mmol, 1 equiv.) in DMF (1 mL) and DIPEA (28.7  $\mu$ L, 0.165 mmol, 3 equiv.) was added to the reaction mixture. The yellow suspension was stirred overnight at RT and heated for 4 h at 50 °C. The reaction medium was concentrated under vacuum and purified on a BetaBasic-18 column (A:  $H_2O$  0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 25% of B for 5 min, 25% to 75% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product was obtained as a white powder (3 TFA salt, 66.4 mg, 78%, purity: 92%). RP-HPLC-MS:  $t_r = 4.15$  min,  $m/z$  calculated for  $C_{60}H_{108}N_8O_{16}$   $[M+H]^+$  1197.8, found 1197.8;  $m/z$  calculated for  $[M+2H]^{2+}$  599.4, found 599.6. HRMS:  $m/z$  calculated for  $C_{60}H_{108}N_8O_{16}$   $[M+H]^+$  1197.79627, found 1197.79853;  $m/z$  calculated for  $[M+2H]^{2+}$  599.40211, found 599.40336.

**BisNODAGA-16.** To a solution of Lys(NODAGA(tBu)<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (15 mg, 12.5  $\mu$ mol, 1 equiv.) in anhydrous DMF (0.75 mL) with DIPEA (6.5  $\mu$ L, 37.5  $\mu$ mol, 3 equiv.) was added HATU (4.75 mg, 12.5  $\mu$ mol, 1 equiv.). The solution was stirred for 15 min at RT and a solution of 16 (10.5 mg, 12.5  $\mu$ mol, 1 equiv.) in anhydrous DMF (0.75 mL) with DIPEA (8.7  $\mu$ L, 50.0  $\mu$ mol, 4 equiv.) was added. The reaction mixture was left stirring for 3 h at RT. The reaction medium was concentrated under vacuum and a solution of TFA:triisopropylsilane: $H_2O$  (95:2.5:2.5, v/v/v, 2 mL) was added. The reaction was stirred for 6 h at RT and concentrated under a flow of nitrogen gas. The residue was purified on a BetaBasic-18 column (A:  $H_2O$  0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 20% of B for 5 min, 20% to 60% of B in 40 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product bisNODAGA-16 was obtained as a white powder (4 TFA salt, 12.0 mg, 47%, purity: 98%). RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.90$  min,  $m/z$  calculated for  $C_{77}H_{114}N_{14}O_{21}$   $[M+2H]^{2+}$  786.4, found 786.4. HRMS:  $m/z$  calculated for  $C_{77}H_{114}N_{14}O_{21}$   $[M+H]^+$  1571.83624, found 1571.83830;  $m/z$  calculated for  $[M+2H]^{2+}$  786.42209, found 786.42406.

**General procedure for the metalation with <sup>nat</sup>Ga.** The compounds were dissolved in acetate buffer (0.5 mL, 0.1 M, pH 3.48). A solution of Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (1.5 equiv. for 3BP-227, 3BP-228, DOTAGA-16, NOTA-16, NODAGA-16 and THP-16 and 4 equiv. for bisDOTAGA-16 and bisNODAGA-16) in acetate buffer (0.5 mL) was then added. The reaction mixture was stirred for 5 h at 40 °C. The excess of free gallium was removed by semi-preparative RP-HPLC.

**<sup>nat</sup>Ga-3BP-227.** Purification on a BetaBasic-18 column (A:  $H_2O$  0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 30% of B for 5 min, 30% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product was obtained as a white powder (5 TFA salt, 5.8 mg, 49%, purity: 97%). RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.85$  min. MALDI-TOF:  $m/z$  calculated for  $C_{58}H_{81}GaN_{10}O_{13}$   $[M+H]^+$  1195.532, found 1195.703.

**<sup>nat</sup>Ga-3BP-228.** Purification on a BetaBasic-18 column (A:  $H_2O$  0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 30% of B for 5 min, 30% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product was obtained as a white powder (3 TFA salt, 8.7 mg, 70%, purity: 97%). RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.77$  min. MALDI-TOF:  $m/z$  calculated for  $C_{57}H_{79}GaN_{10}O_{13}$   $[M+H]^+$  1181.516, found 1181.844.

**<sup>nat</sup>Ga-DOTAGA-16.** Purification on a BetaBasic-18 column (A:  $H_2O$  0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 30% of B for 5 min, 30% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product was obtained as a white powder (5 TFA salt, 7.1 mg, 51%, purity: 92%). RP-HPLC-MS:  $t_r = 3.87$  min. MALDI-TOF:  $m/z$  calculated for  $C_{60}H_{82}GaN_{10}O_{15}$   $[M+H]^+$  1252.530, found 1253.844.



**<sup>nat</sup>Ga-NOTA-16.** Purification on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 25% of B for 5 min, 25% to 50% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product was obtained as a white powder (3 TFA salt, 10.6 mg, 84%, purity: 99%). RP-HPLC-MS: *t<sub>r</sub>* = 3.66 min. MALDI-TOF: *m/z* calculated for C<sub>53</sub>H<sub>73</sub>GaN<sub>9</sub>O<sub>11</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 1081.476, found 1080.467.

**<sup>nat</sup>Ga-NODAGA-16.** Purification on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 30% of B for 5 min, 30% to 60% of B in 50 min, at a flow rate of 20 mL/min). The compound was obtained as a white powder (3 TFA salt, 4.35 mg, 35%, purity >99%). RP-HPLC-MS: *t<sub>r</sub>* = 3.9 min. MALDI-TOF: *m/z* calculated for C<sub>56</sub>H<sub>76</sub>GaN<sub>9</sub>O<sub>13</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1152.490, found 1152.454.

**<sup>nat</sup>Ga-THP-16.** Purification on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 35% of B for 5 min, 35% to 60% of B in 40 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product was obtained as a white powder (9 TFA salt, 6 mg, 53%, purity: 77+20%). RP-HPLC-MS: *t<sub>r</sub>* = 4.2 min. MALDI-TOF: *m/z* calculated for C<sub>86</sub>H<sub>109</sub>GaN<sub>16</sub>O<sub>16</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1755.698, found 1757.551.

**<sup>nat</sup>Ga-bisDOTAGA-16.** Purification on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 20% of B for 5 min, 20% to 60% of B in 40 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product was obtained as a white powder (3 TFA salt, 5.44 mg, 78%, purity: 97.4%). RP-HPLC-MS: *t<sub>r</sub>* = 3.73 min. MALDI-TOF: *m/z* calculated for C<sub>83</sub>H<sub>122</sub>Ga<sub>2</sub>N<sub>16</sub>O<sub>25</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1907.735, found 1908.386.

**<sup>nat</sup>Ga-bisNODAGA-16.** Purification on a BetaBasic-18 column (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA with the following gradient program: 20% of B for 5 min, 20% to 60% of B in 40 min, at a flow rate of 20 mL/min). The product was obtained as a white powder (3 TFA salt, 5.33 mg, 77%, purity: 96%). RP-HPLC-MS: *t<sub>r</sub>* = 3.72 min. MALDI-TOF: *m/z* calculated for C<sub>77</sub>H<sub>108</sub>Ga<sub>2</sub>N<sub>16</sub>O<sub>21</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1706.643, found 1706.394.

***In vitro* stability.** 15 µL of a 5 mM stock solution of compound in DMSO 50% (v/v) were stirred in a thermomixer (900 rpm, 37 °C, dark) with 135 µL of mouse serum (Sigma Aldrich, M5905, batch SLBT4412). The final concentration in peptide was 0.5 mM. After 0 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h and 24 h, a sample (15 µL) of solution was collected and diluted with 60 µL of ethanol 99%. 15 µL of a 1 mM stock solution of Fmoc-Trp(tBu)-OH was added to the suspension for internal calibration. Samples were vortexed and centrifuged (10000 rpm, 10 minutes) to remove precipitated proteins. The supernatant was analyzed by RP-HPLC-MS at a wavelength of 260 nm.

***In vitro* binding affinity.** The affinity of each compound Ga-3BP-227, Ga-3BP-228, Ga-DOTAGA-16, Ga-NOTA-16, Ga-NODAGA-16, Ga-THP-16, Ga-bisDOTAGA-16, Ga-bisNODAGA-16 for NTS<sub>1</sub> was determined on a competitive binding assay on human recombinant CHO cells overexpressing NTS<sub>1</sub>, using [<sup>125</sup>I]-Tyr<sup>3</sup>-neurotensin (0.05 nM; K<sub>d</sub> = 0.22 nM) as the radioligand (Eurofins). Non-specific binding was measured in presence of an excess of neurotensin (1 µM). Experiments were performed in duplicate. Data was fitted by non-linear regression, using GraphPadPrism, 6.0 software. The minimum was set to 0. IC<sub>50</sub> values were converted into inhibition constants (K<sub>i</sub>) using the Cheng-Prusoff equation.<sup>48</sup>

**Radiolabeling of compounds with <sup>68</sup>Ga.** Compounds were radiolabeled using a Modular-Lab PharmTracer (Eckert & Ziegler). Fractional elution of the <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator gave a solution (1.5 mL, 90 MBq) which was added to a solution of 2.99 nmol of each compound in EtOH (150 µL) and ammonium acetate buffer (1 M, pH 6.88) to adjust the pH to 3.5. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 5 min for the NOTA-, NODAGA- and THP-based compounds, and at 95 °C for 10 min for the DOTA- and DOTAGA-based compounds. The products were purified on a C<sub>18</sub> Sep-Pack cartridge (Waters, Milford, MA), eluted using 1000 µL of 80% ethanol in the second reactor, and subsequently evaporated at 70 °C for 10 min under an air flow. The final products were diluted with 0.9% sodium chloride (NaCl). HPLC quality control was performed using a HPLC system LC-2000 analyti-

cal series (Jasco) equipped with a Flowcount radioactivity detector (Bioscan). Separation was achieved using an RP C<sub>18</sub> Kinetex™ column (Phenomenex) (2.6 µm, 100 Å, 50 × 2.1 mm) with ultrapure water and HPLC-grade MeCN (A: H<sub>2</sub>O 0.1% TFA and B: MeCN 0.1% TFA). Analyses were performed with the following gradient program: 5% to 95% of B in 5 min, 95% B for 1.5 min, at a flow rate of 0.5 mL/min. The quantity of colloids was evaluated using a system of two instant thin layer chromatographies (iTLC) eluted with citrate sodium and NH<sub>4</sub>Ac/MeOH as mobile phases.

**Small animal PET imaging and biodistribution studies.** All animal studies were conducted at and approved by the Centre George François Leclerc (CGFL) in accordance with the relevant guidelines and legislation on the use of laboratory animals (directive 2010/63/EU) and were approved by accredited Ethical Committee (C2ea Grand Campus n°105) and French Ministry of Higher Education and Research (#15316). HT-29 tumor bearing mice (8 weeks old, 10x10<sup>6</sup> cells per mouse injected subcutaneously in the right flank) were intravenously injected in the tail vein with 3 to 8 MBq of each radiotracer based on a consistent number of picomoles being injected (500 pmol). Static PET and MRI images were simultaneously recorded 90 min p.i. for 30 min. The mice were awakened between the administration of the tracer and imaging times. Images were recorded in a dual-ring SiPM microPET fully integrated in a 7T preclinical MRI (MR Solutions, Guilford, UK). The animals were kept under anesthesia using 2% isoflurane in oxygen and positioned in a dedicated heating cradle during imaging. Respiratory gating was performed with abdominal pressure sensor and dedicated software (PC Sam, SAIL, Stony Brook, US). List-mode data were collected in the PET system during 30 min. Coronal T1 weighted fast spin echo MR images were acquired with respiratory gating and the following parameters: 16 slices with a time of repetition (TR) of 1000 ms, time of echo (TE) of 11 ms, 3 signal averages, 1 mm slice thickness, field of view (FOV) of 70 mm and 256x256 pixels matrix. Images were reconstructed with the 3D ordered subset expectation maximization (OSEM) algorithm implemented in the system using 2 iterations, 32 subsets and an isotropic voxel size of 0.28 mm. An energy window of 250-750 keV and a coincidence time window of 8 ns were applied to the list-mode data. The algorithm takes into account normalization, random and decay corrections. No attenuation correction was applied. Two hours post-injection, mice were sacrificed and the main organs and tissues were dissected, weighed, and γ-counted (1480 Wizard 3, PerkinElmer). Blocking experiments were performed by co-injecting an excess (100 equivalents) of SR142948A. Tumor or tissue uptake are expressed as mean ± SD percentage injected dose per gram (%ID/g), corrected for radionuclide decay.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website.

Materials and general procedures, synthesis schemes and analytical data for all compounds, *in vitro* stability data, *in vitro* binding affinity data, radiolabeling data, PET-MRI images, tables of *ex vivo* biodistribution data determined by γ-counting, blocking experiment data (PDF)

Animated 3D PET images (MP4)

SMILES formula of each compound and associated biochemical data (CSV)

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\* E-mail: [victor.goncalves@u-bourgogne.fr](mailto:victor.goncalves@u-bourgogne.fr).

### Author Contributions

All authors have given approval to the final version of the manuscript.



## ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the Plateforme d'Analyse Chimique et de Synthèse Moléculaire de l'Université de Bourgogne (<http://www.wpcm.fr>) for access to analytical instrumentation (specially Dr. M. Laly for the ionic chromatography and Dr. Q. Bonnin for the HRMS analysis). This work was partly funded by the French National Research Agency (ANR) under the French Investissements d'Avenir programs Equipex (IMAPPI, ANR-10-EQPX-05-01) and AAP Générique 2017 (ZINELABEL, ANR-17-CE18-0016-01). This work was also supported by the CNRS and the Université de Bourgogne. This work is part of the project Pharmacologie et agents théranostiques funded by the Conseil Régional de Bourgogne Franche-Comté through the Plan d'Action Régional pour l'Innovation (PARI) and by the European Union through the PO FEDER-FSE 2014/2020 Bourgogne program.

## ABBREVIATIONS

CHO, Chinese hamster ovary; DOTA, 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid; DOTAGA, 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-glutaric acid-4,7,10-triacetic acid; NCS, *N*-chlorosuccinimide; NHS, *N*-hydroxysuccinimide; NOTA, 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid; NODAGA, 1,4,7-triazacyclononane-1-glutaric acid-4,7-diacetic acid; NTS1, neurotensin receptor 1; PBS, phosphate buffer saline; PET, positron emission tomography; RP-HPLC, reverse phase high-performance liquid chromatography; RT, room temperature; SD, standard deviation

## REFERENCES

- (1) Vaquero, J. J.; Kinahan, P. Positron Emission Tomography: Current Challenges and Opportunities for Technological Advances in Clinical and Preclinical Imaging Systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2015**, *17* (1), 385–414. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071114-040723>.
- (2) 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.* **2013**, *3*, 184. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00184>.
- (3) Carraway, R. E.; Plona, A. M. Involvement of Neurotensin in Cancer Growth: Evidence, Mechanisms and Development of Diagnostic Tools. *Peptides* **2006**, *27* (10), 2445–2460. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.04.030>.
- (4) Reubi, J.; Waser, B.; Friess, H.; Buchler, M.; Laissue, J. Neurotensin Receptors: A New Marker for Human Ductal Pancreatic Adenocarcinoma. *Gut* **1998**, *42* (4), 546–550.
- (5) Seethalakshmi, L.; Mitra, S. P.; Dobner, P. R.; Menon, M.; Carraway, R. E. Neurotensin Receptor Expression in Prostate Cancer Cell Line and Growth Effect of NT at Physiological Concentrations. *The Prostate* **1997**, *31* (3), 183–192. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0045\(19970515\)31:3<183::AID-PROS7>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0045(19970515)31:3<183::AID-PROS7>3.0.CO;2-M).
- (6) Reubi, J. C.; Waser, B.; Schaer, J. C.; Laissue, J. A. Neurotensin Receptors in Human Neoplasms: High Incidence in Ewing's Sarcomas. *Int. J. Cancer* **1999**, *82* (2), 213–218. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19990719\)82:2<213::aid-ijc11>3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19990719)82:2<213::aid-ijc11>3.0.co;2-8).
- (7) Maoret, J. J.; Pospaï, D.; Rouyer-Fessard, C.; Couvineau, A.; Labois, C.; Voisin, T.; Laburthe, M. Neurotensin Receptor and Its mRNA Are Expressed in Many Human Colon Cancer Cell Lines but Not in Normal Colonic Epithelium: Binding Studies and RT-PCR Experiments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *203* (1), 465–471. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2205>.
- (8) Souazé, F.; Dupouy, S.; Viardot-Foucault, V.; Bruyneel, E.; Attoub, S.; Gespach, C.; Gompel, A.; Forgez, P. Expression of Neurotensin and NT1 Receptor in Human Breast Cancer: A Potential Role in Tumor Progression. *Cancer Res.* **2006**, *66* (12), 6243–6249. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0450>.
- (9) Reeve, J. G.; Goedert, M.; Emson, P. C.; Bleehen, N. M. Neurotensin in Human Small Cell Lung Carcinoma. *Recent Results Cancer Res.* **1985**, *99*, 175–176. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-82533-0\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-642-82533-0_18).
- (10) Carraway, R.; Leeman, S. E. The Isolation of a New Hypotensive Peptide, Neurotensin, from Bovine Hypothalamus. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248* (19), 6854–6861.
- (11) Prignon, A.; Provost, C.; Alshoukr, F.; Wendum, D.; Couvelard, A.; Barbet, J.; Forgez, P.; Talbot, J.-N.; Gruaz-Guyon, A. Pre-clinical Evaluation of <sup>68</sup>Ga-DOTA-NT-20.3: A Promising PET Imaging Probe To Discriminate Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma from Pancreatitis. *Mol. Pharmaceutics* **2019**, *16* (6), 2776–2784. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00283>.
- (12) Maschauer, S.; Prante, O. Radiopharmaceuticals for Imaging and Endoradiotherapy of Neurotensin Receptor-Positive Tumors. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2018**, *61* (3), 309–325. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3581>.
- (13) Yin, X.; Wang, M.; Wang, H.; Deng, H.; He, T.; Tan, Y.; Zhu, Z.; Wu, Z.; Hu, S.; Li, Z. Evaluation of Neurotensin Receptor 1 as a Potential Imaging Target in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Amino Acids* **2017**, *49* (8), 1325–1335. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2430-5>.
- (14) Renard, E.; Dancer, P.-A.; Portal, C.; Denat, F.; Prignon, A.; Goncalves, V. Design of Bimodal Ligands of Neurotensin Receptor 1 for Positron Emission Tomography Imaging and Fluorescence-Guided Surgery of Pancreatic Cancer. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (5), 2426–2433. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01407>.
- (15) Kitabgi, P.; De Nadai, F.; Rovère, C.; Bidard, J. N. Biosynthesis, Maturation, Release, and Degradation of Neurotensin and Neuropeptide Y. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1992**, *668*, 30–42. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb27337.x>.
- (16) Gabriel, M.; Decristoforo, C.; Wöll, E.; Eisterer, W.; Nock, B.; Maina, T.; Moncayo, R.; Virgolini, I. [<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* (5), 557–563. <https://doi.org/10.1089/cbr.2010.0952>.
- (17) Gully, D.; Canton, M.; Boigegrain, R.; Jeanjean, F.; Molimard, J. C.; Poncelet, M.; Gueudet, C.; Heaulme, M.; Leyris, R.; Brouard, A. Biochemical and Pharmacological Profile of a Potent and Selective Nonpeptide Antagonist of the Neurotensin Receptor. *PNAS* **1993**, *90* (1), 65–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.1.65>.
- (18) Myers, R. M.; Shearman, J. W.; Kitching, M. O.; Ramos-Montoya, A.; Neal, D. E.; Ley, S. V. Cancer, Chemistry, and the Cell: Molecules That Interact with the Neurotensin Receptors. *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4* (7), 503–525. <https://doi.org/10.1021/cb900038e>.
- (19) Gully, D.; Labeeuw, B.; Boigegrain, R.; Oury-Donat, F.; Bachy, A.; Poncelet, M.; Pecceu, F.; Maffrand, J. P. Biochemical and Pharmacological Activities of SR 142948A, a New Potent Neurotensin Receptor Antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *280*, 802–812.
- (20) Betancur, C.; Canton, M.; Burgos, A.; Labeeuw, B.; Gully, D.; Rostene, W.; Pelaprat, D. Characterization of Binding Sites of a New Neurotensin Receptor Antagonist, [3H]SR 142948A, in the Rat Brain. *Eur. J. Pharm.* **1998**, *343*, 67–77.
- (21) Lang, C.; Maschauer, S.; Hübner, H.; Gmeiner, P.; Prante, O. Synthesis and Evaluation of a <sup>18</sup>F-Labeled Diarylpyrazole Glycoconjugate for the Imaging of NTS1-Positive Tumors. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (22), 9361–9365. <https://doi.org/10.1021/jm401491e>.
- (22) Schulz, J.; Rohracker, M.; Stiebler, M.; Goldschmidt, J.; Stöber, F.; Noriega, M.; Pethe, A.; Lukas, M.; Osterkamp, F.; Reineke, U.; Höhne, A.; Smerling, C.; Amthauer, H. Proof of Therapeutic Efficacy of a <sup>177</sup>Lu-Labeled Neurotensin Receptor 1 Antagonist in a Colon Carcinoma Xenograft Model. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (6), 936–941. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.185140>.
- (23) Ginj, M.; Zhang, H.; Waser, B.; Cescato, R.; Wild, D.; Wang, X.; Erchegyi, J.; Rivier, J.; Mäcke, H. R.; Reubi, J. C. 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* (44), 16436–16441. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607761103>.



- (24) Fani, M.; Maecke, H. R. Radiopharmaceutical Development of Radiolabelled Peptides. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39* (Suppl 1), S11–30. <https://doi.org/10.1007/s00259-011-2001-z>.
- (25) Dash, A.; Chakraborty, S.; Pillai, M. R. A.; Knapp, F. F. R. Peptide Receptor Radionuclide Therapy: An Overview. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2015**, *30* (2), 47–71. <https://doi.org/10.1089/cbr.2014.1741>.
- (26) Schulz, J.; Rohracker, M.; Stiebler, M.; Goldschmidt, J.; Grosser, O. S.; Osterkamp, F.; Pethe, A.; Reineke, U.; Smerling, C.; Amthauer, H. Comparative Evaluation of the Biodistribution Profiles of a Series of Nonpeptidic Neurotensin Receptor-1 Antagonists Reveals a Promising Candidate for Theranostic Applications. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57* (7), 1120–1123. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.170530>.
- (27) Study to Evaluate the Safety and Activity (Including Distribution) of <sup>177</sup>Lu-3BP-227 in Subjects With Solid Tumours Expressing Neurotensin Receptor Type 1. - Tabular View - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT03525392> (accessed Apr 23, 2020).
- (28) Baum, R. P.; Singh, A.; Schuchardt, C.; Kulkarni, H. R.; Klette, I.; Wiessalla, S.; Osterkamp, F.; Reineke, U.; Smerling, C. <sup>177</sup>Lu-3BP-227 for Neurotensin Receptor 1-Targeted Therapy of Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma: First Clinical Results. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (5), 809–814. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.193847>.
- (29) Ametamey, S. M.; Honer, M.; Schubiger, P. A. Molecular Imaging with PET. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (5), 1501–1516. <https://doi.org/10.1021/cr0782426>.
- (30) Brandt, M.; Cardinale, J.; Aulsebrook, M. L.; Gasser, G.; Mindt, T. L. An Overview of PET Radiochemistry, Part 2: Radiometals. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (10), 1500–1506. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.190801>.
- (31) Price, E. W.; Orvig, C. Matching Chelators to Radiometals for Radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (1), 260–290. <https://doi.org/10.1039/C3CS60304K>.
- (32) Spang, P.; Herrmann, C.; Roesch, F. Bifunctional Gallium-68 Chelators: Past, Present, and Future. *Seminars in Nuclear Medicine* **2016**, *46* (5), 373–394. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2016.04.003>.
- (33) Tsonou, M. I.; Knapp, C. E.; Foley, C. A.; Munteanu, C. R.; Cakebread, A.; Imberti, C.; Eykyn, T. R.; Young, J. D.; Paterson, B. M.; Blower, P. J.; Ma, M. T. Comparison of Macrocyclic and Acyclic Chelators for Gallium-68 Radiolabelling. *RSC Adv.* **2017**, *7* (78), 49586–49599. <https://doi.org/10.1039/C7RA09076E>.
- (34) Malmberg, J.; Perols, A.; Varasteh, Z.; Altai, M.; Braun, A.; Sandström, M.; Garske, U.; Tolmachev, V.; Orlova, A.; Karlström, A. E. Comparative Evaluation of Synthetic Anti-HER2 Affibody Molecules Site-Specifically Labelled with <sup>111</sup>In Using N-Terminal DOTA, NOTA and NODAGA Chelators in Mice Bearing Prostate Cancer Xenografts. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39* (3), 481–492. <https://doi.org/10.1007/s00259-011-1992-9>.
- (35) Mitran, B.; Varasteh, Z.; Selvaraju, R. K.; Lindeberg, G.; Sörensen, J.; Larhed, M.; Tolmachev, V.; Rosenström, U.; Orlova, A. Selection of Optimal Chelator Improves the Contrast of GRPR Imaging Using Bombesin Analogue RM26. *Int. J. Oncol.* **2016**, *48* (5), 2124–2134. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3429>.
- (36) Mitran, B.; Thisgaard, H.; Rinne, S.; Dam, J. H.; Azami, F.; Tolmachev, V.; Orlova, A.; Rosenström, U. Selection of an Optimal Macrocyclic Chelator Improves the Imaging of Prostate Cancer Using Cobalt-Labeled GRPR Antagonist RM26. *Sci Rep* **2019**, *9* (1), 17086. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52914-y>.
- (37) Rinne, S. S.; Dahlsson Leitao, C.; Gentry, J.; Mitran, B.; Abouzayed, A.; Tolmachev, V.; Ståhl, S.; Löfblom, J.; Orlova, A. Increase in Negative Charge of <sup>68</sup>Ga/Chelator Complex Reduces Unspecific Hepatic Uptake but Does Not Improve Imaging Properties of HER3-Targeting Affibody Molecules. *Sci Rep* **2019**, *9* (1), 17710. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54149-3>.
- (38) Rinne, S. S.; Leitao, C. D.; Mitran, B.; Bass, T. Z.; Andersson, K. G.; Tolmachev, V.; Ståhl, S.; Löfblom, J.; Orlova, A. Optimization of HER3 Expression Imaging Using Affibody Molecules: Influence of Chelator for Labeling with Indium-111. *Sci Rep* **2019**, *9* (1), 655. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36827-w>.
- (39) Varasteh, Z.; Mitran, B.; Rosenström, U.; Velikyan, I.; Rosestedt, M.; Lindeberg, G.; Sörensen, J.; Larhed, M.; Tolmachev, V.; Orlova, A. The Effect of Macrocyclic Chelators on the Targeting Properties of the <sup>68</sup>Ga-Labeled Gastrin Releasing Peptide Receptor Antagonist PEG2-RM26. *Nucl. Med. Biol.* **2015**, *42* (5), 446–454. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2014.12.009>.
- (40) Roxin, Å.; Zhang, C.; Huh, S.; Lepage, M.; Zhang, Z.; Lin, K.-S.; Bénard, F.; Perrin, D. M. A Metal-Free DOTA-Conjugated <sup>18</sup>F-Labeled Radiotracer: [<sup>18</sup>F]DOTA-AMBF<sub>3</sub>-LLP2A for Imaging VLA-4 Over-Expression in Murine Melanoma with Improved Tumor Uptake and Greatly Enhanced Renal Clearance. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30* (4), 1210–1219. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjugchem.9b00146>.
- (41) Labeeuw, B.; Gully, D.; Jeanjean, F.; Molimard, J.-C.; Boige-grain, R. Patent 5,723,483. **1998**, 58.
- (42) Baxendale, I. R.; Cheung, S.; Kitching, M. O.; Ley, S. V.; Shearman, J. W. The Synthesis of Neurotensin Antagonist SR 48692 for Prostate Cancer Research. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (14), 4378–4387. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.04.075>.
- (43) Kurosawa, W.; Kan, T.; Fukuyama, T. Preparation of Secondary Amines from Primary Amines via 2-Nitrobenzenesulfonamides: N-(4-Methoxybenzyl)-3-Phenylpropylamine. *Org. Synth.* **2002**, *79*, 186. <https://doi.org/10.15227/orgsyn.079.0186>.
- (44) Battilocchio, C.; Baxendale, I. R.; Biava, M.; Kitching, M. O.; Ley, S. V. A Flow-Based Synthesis of 2-Aminoadamantane-2-Carboxylic Acid. *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16* (5), 798–810. <https://doi.org/10.1021/op300084z>.
- (45) Battilocchio, C.; Deadman, B. J.; Nikbin, N.; Kitching, M. O.; Baxendale, I. R.; Ley, S. V. A Machine-Assisted Flow Synthesis of SR48692: A Probe for the Investigation of Neurotensin Receptor-1. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19* (24), 7917–7930. <https://doi.org/10.1002/chem.201300696>.
- (46) Lang, C.; Gmeiner, P. Efficient Synthesis of Heterocyclic Neurotensin Receptor Ligands by Microwave-Assisted Aminocarbonylation. *Synthesis* **2013**, *45*, 2474–2480.
- (47) Price, T. W.; Greenman, J.; Stasiuk, G. J. Current Advances in Ligand Design for Inorganic Positron Emission Tomography Tracers <sup>68</sup>Ga, <sup>89</sup>Zr and <sup>44</sup>Sc. *Dalton Trans.* **2016**, *45* (40), 15702–15724. <https://doi.org/10.1039/C5DT04706D>.
- (48) Vita, N.; Laurent, P.; Lefort, S.; Chalon, P.; Dumont, X.; Kaghad, M.; Gully, D.; Le Fur, G.; Ferrara, P.; Caput, D. Cloning and Expression of a Complementary DNA Encoding a High Affinity Human Neurotensin Receptor. *FEBS Lett.* **1993**, *317* (1–2), 139–142. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81509-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81509-x).
- (49) Andrés, A.; Rosés, M.; Ráfols, C.; Bosch, E.; Espinosa, S.; Segarra, V.; Huerta, J. M. Setup and Validation of Shake-Flask Procedures for the Determination of Partition Coefficients (LogD) from Low Drug Amounts. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *76*, 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.05.008>.
- (50) Alshoukr, F.; Rosant, C.; Maes, V.; Abdelhak, J.; Raguin, O.; Burg, S.; Sarda, L.; Barbet, J.; Tourwé, D.; Pelaprat, D.; Gruaz-Guyon, A. Novel Neurotensin Analogues for Radioisotope Targeting to Neurotensin Receptor-Positive Tumors. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20* (8), 1602–1610. <https://doi.org/10.1021/bc900151z>.
- (51) Alshoukr, F.; Prignon, A.; Brans, L.; Jallane, A.; Mendes, S.; Talbot, J.-N.; Tourwé, D.; Barbet, J.; Gruaz-Guyon, A. 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* (7), 1374–1385. <https://doi.org/10.1021/bc200078p>.
- (52) Hosseinimehr, S. J.; Tolmachev, V.; Orlova, A. Liver Uptake of Radiolabeled Targeting Proteins and Peptides: Considerations for Targeting Peptide Conjugate Design. *Drug Discov. Today* **2012**, *17* (21–22), 1224–1232. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.07.002>.
- (53) Fani, M.; Del Pozzo, L.; Abiraj, K.; Mansi, R.; Tamma, M. L.; Cescato, R.; Waser, B.; Weber, W. A.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R. PET of Somatostatin Receptor-Positive Tumors Using <sup>64</sup>Cu- and <sup>68</sup>Ga-Somatostatin Antagonists: The Chelate Makes the Difference. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52* (7), 1110–1118. <https://doi.org/10.2967/jnumed.111.087999>.
- (54) Banerjee, S. R.; Chen, Z.; Pullambhatla, M.; Lisok, A.; Chen, J.; Mease, R. C.; Pomper, M. G. Preclinical Comparative Study



of  $^{68}\text{Ga}$ -Labeled DOTA, NOTA, and HBED-CC Chelated Radiotracers for Targeting PSMA. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (6), 1447–1455. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00679>.

(55) Roosenburg, S.; Laverman, P.; Joosten, L.; Cooper, M. S.; Kolenc-Peitel, P. K.; Foster, J. M.; Hudson, C.; Leyton, J.; Burnet, J.; Oyen, W. J. G.; Blower, P. J.; Mather, S. J.; Boerman, O. C.; Sosabowski, J. K. PET and SPECT Imaging of a Radiolabeled Minigastrin Analogue Conjugated with DOTA, NOTA, and NODAGA and Labeled with  $(^{64}\text{Cu})$ ,  $(^{68}\text{Ga})$ , and  $(^{111}\text{In})$ . *Mol. Pharm.* **2014**, *11* (11), 3930–3937. <https://doi.org/10.1021/mp500283k>.

(56) Dahlsson Leitao, C.; Rinne, S. S.; Mitran, B.; Vorobyeva, A.; Andersson, K. G.; Tolmachev, V.; Ståhl, S.; Löfblom, J.; Orlova, A. Molecular Design of HER3-Targeting Affibody Molecules: Influence of Chelator and Presence of HEHEHE-Tag on Biodistribution of  $^{68}\text{Ga}$ -Labeled Tracers. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (5). <https://doi.org/10.3390/ijms20051080>.

(57) von Witting, E.; Garousi, J.; Lindbo, S.; Vorobyeva, A.; Altai, M.; Oroujeni, M.; Mitran, B.; Orlova, A.; Hober, S.; Tolmachev, V. Selection of the Optimal Macrocyclic Chelators for Labeling with  $^{111}\text{In}$  and  $^{68}\text{Ga}$  Improves Contrast of HER2 Imaging Using Engineered Scaffold Protein ADAPT6. *Eur J Pharm Biopharm* **2019**, *140*, 109–120. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.05.008>.

(58) Lin, M.; Welch, M. J.; Lapi, S. E. Effects of Chelator Modifications on  $^{68}\text{Ga}$ -Labeled [Tyr3]Octreotide Conjugates. *Mol. Imaging Biol.* **2013**, *15* (5), 606–613. <https://doi.org/10.1007/s11307-013-0627-x>.

(59) Young, J. D.; Abbate, V.; Imberti, C.; Meszaros, L. K.; Ma, M. T.; Terry, S. Y. A.; Hider, R. C.; Mullen, G. E.; Blower, P. J.  $^{68}\text{Ga}$ -THP-PSMA: A PET Imaging Agent for Prostate Cancer Offering Rapid, Room-Temperature, 1-Step Kit-Based Radiolabeling. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (8), 1270–1277. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.191882>.





Référence thèse	Référence ICMUB
Composé 3	ER71
Composé 4	ER57
Composé 5	ER09
Composé 6	ER08
Composé 7	ER07
[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-3	ER80
[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-4	ER79
[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-5	ER76
[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-6	ER75
[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-7	ER74
NT-20.3	ER188- ER230
DOTA-NT-20.3	ER78
[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-DOTA-NT-20.3	ER84
Composé 8	ER17
Composé 9	ER40
Composé 10	ER44
Composé 11	ER47
Composé 12	ER48
Synthon A	ER52
Synthon B	ER23
Composé 13	ER67
Composé 14	ER70
Synthon C	ER72
Composé 15	ER26
Composé 16	ER30
Composé 17	ER43
Synthon D	ER46
Composé 18	ER54
Composé 19	ER87
Composé 20	ER90
Composé 21	ER95-96
Composé 22	ER97
Composé 23	ER94-99
Composé 24	ER92-93
Composé 25	ER104-ER307
Composé 26	ER219
Composé 27	ER221
Composé 28	ER236
Composé 29	ER241

[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-21	ER101
[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-22	ER100
[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-23	ER102
[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-24	ER98
[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-25	ER109-ER123
[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-27	ER247
[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-29	ER248
Synthon E	ER49
Composé 31	ER108
Composé 32	ER110
Composé 33	ER114
Composé 3BP-227	ER116
[ <sup>nat</sup> Ga]Ga-3BP-227	ER115
Composé 34	ER260-261
Composé 35	ER268
Composé 36	ER146
Composé 37	ER155
Composé 39	ER165
Composé 40	ER161
Composé 42	ER167
Composé 43	ER168
Composé 45	ER170
Composé 46	ER182-GKJPH1
Composé 47	ER163-164-GKJPH4
Composé 48	ER181-GKJPH8
Composé 49	ER255
Composé 50	ER269



## Conception d'agents d'imagerie moléculaire et théranostiques pour la détection et la thérapie ciblée de cancers

**Mots clés :** imagerie moléculaire, imagerie nucléaire, chirurgie assistée par fluorescence, thérapie photodynamique, cancer, neurotensine

**Résumé :** Malgré des avancées considérables dans la détection et le traitement du cancer, cette maladie est à ce jour la deuxième cause de décès dans le monde. Ce projet de thèse a eu pour buts de concevoir et optimiser des agents d'imagerie pour le diagnostic et/ou la thérapie de divers cancers.

Le premier axe de cette thèse a porté sur l'élaboration d'un agent d'imagerie bimodale TEP/fluorescence peptidique capable de cibler les récepteurs à la neurotensine, NTS<sub>1</sub>, surexprimés dans certains cancers. L'imagerie TEP permettrait une détection efficace des tumeurs et de leurs métastases, tandis que l'imagerie par fluorescence faciliterait l'évaluation des marges tumorales durant la chirurgie. Plusieurs composés ont été synthétisés, marqués au gallium-68 et étudiés en préclinique sur un modèle de cancer du pancréas. Des résultats très prometteurs ont été obtenus pour un des composés, faisant de lui un bon candidat pour le diagnostic et l'aide à la chirurgie du cancer du pancréas.

Le second axe de recherche a été consacré à la conception d'un radiotracer TEP ciblant NTS<sub>1</sub>. Une molécule nommée [<sup>177</sup>Lu]Lu-IPN01087 est

actuellement évaluée dans des essais cliniques pour la radiothérapie ciblée et l'identification d'un compagnon diagnostic faciliterait la sélection des patients éligibles pour cette approche. Nous avons synthétisé et évalué *in vivo* sur un modèle de cancer colorectal différents radiotraceurs marqués au gallium-68, mettant en avant un potentiel candidat pour le diagnostic par imagerie TEP de cancers surexprimant NTS<sub>1</sub>.

Enfin, la dernière partie de cette thèse est consacrée à l'élaboration d'un agent d'imagerie théranostique TEMP/PDT ciblant le récepteur EGFR. L'imagerie TEMP permettrait de diagnostiquer et stadifier les patients, tandis que la sonde PDT permettrait l'assistance à la chirurgie et la destruction des cellules tumorales. L'emploi d'une plateforme trivalente, la dichlorotétrazine, nous a permis d'introduire un agent chélatant l'indium-111 et un photosensibilisateur *via* une réaction de bioconjugaison site-spécifique sur un *nanobody*. Le conjugué obtenu a ensuite été évalué *in vitro* puis l'étude de la biodistribution et de l'efficacité de la thérapie photodynamique a été réalisée en préclinique.

## Design of molecular imaging and theranostic agents for the detection and targeted therapy of cancers

**Keywords :** molecular imaging, nuclear imaging, fluorescence-guided surgery, photodynamic therapy, cancer, neurotensin

**Abstract :** Despite significant advances in cancer detection and treatment, cancer is now the second leading cause of death worldwide. The aim of this thesis project was to design and optimize imaging agents for the diagnosis and/or therapy of various cancers.

The first axis of this thesis focused on the development of a bimodal PET/fluorescence imaging agent capable of targeting neurotensin NTS<sub>1</sub> receptors overexpressed in certain cancers. PET imaging would allow efficient detection of tumors and their metastases, while fluorescence imaging would facilitate the evaluation of tumor margins during surgery. Several compounds were synthesized, labelled with gallium-68 and studied in preclinical studies in a pancreatic cancer model. Very promising results were obtained for one compound, making it a good candidate for the diagnosis and fluorescence guided surgery of pancreatic cancer.

The second line of research was devoted to the design of a PET radiotracer targeting NTS<sub>1</sub>. A molecule named [<sup>177</sup>Lu]Lu-IPN01087 is currently

being evaluated in clinical trials for targeted radiotherapy. The identification of a diagnostic companion agent would facilitate the selection of patients eligible for this therapy. We synthesized and evaluated *in vivo*, in a colorectal cancer model, different gallium-68 labelled tracers, highlighting a potential candidate for the diagnosis by PET imaging of NTS<sub>1</sub> overexpressing cancers.

Finally, the last part of this thesis focused on the development of a theranostic SPECT/PDT imaging agent targeting the EGFR receptor. SPECT imaging would allow the diagnosis and staging of patients, while the PDT probe would facilitate the surgical resection of the tumor and eradication of cancer cells. We used a trivalent platform, dichlorotetrazine, that allowed us to introduce an indium-111 chelating agent and a photosensitizer *via* a site-specific bioconjugation reaction on a *nanobody*. The resulting conjugate was evaluated *in vitro* and the biodistribution and efficacy of the photodynamic therapy were investigated in preclinical studies.