



**HAL**  
open science

# Synthèse et évaluation de traceurs peptidiques heterobivalents pour l'imagerie moleculaire

Thibaud Bailly

► **To cite this version:**

Thibaud Bailly. Synthèse et évaluation de traceurs peptidiques heterobivalents pour l'imagerie moleculaire. Cristallographie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2022. Français. NNT : 2022UBFCK095 . tel-04445611

**HAL Id: tel-04445611**

**<https://theses.hal.science/tel-04445611v1>**

Submitted on 8 Feb 2024

**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'UNIVERSITÉ BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ**

PRÉPARÉE À L'INSTITUT DE CHIMIE MOLÉCULAIRE DE L'UNIVERSITÉ DE  
BOURGOGNE UMR CNRS 6302

École doctorale n°553  
Carnot-Pasteur

Doctorat de Chimie

Par  
M. Thibaud Bailly

---

**Synthèse et évaluation de traceurs peptidiques hétérobivalents pour  
l'imagerie moléculaire**

---

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 30 novembre 2022

**Composition du Jury :**

Dr. Dominique Bonnet	Directeur de recherche CNRS, Strasbourg	Président
Dr. Lucie Sancey	Directrice de recherche CNRS, Grenoble	Rapportrice
Dr. Florine Cavelier	Directrice de recherche CNRS, Montpellier	Rapportrice
Pr. Franck Denat	Professeur à l'université de Bourgogne	Directeur de thèse
Dr. Victor Goncalves	Maître de conférences à l'université de Bourgogne	Co-directeur de thèse
Dr. Ibai Valverde	Chargé de recherche CNRS, Dijon	Co-directeur de thèse



# Table des matières

<b>Introduction générale</b> .....	<b>9</b>
<b>I. Imagerie médicale du cancer</b> .....	<b>11</b>
1. Les différentes modalités d'imagerie .....	11
2. Vectorisation des agents d'imagerie et de thérapie du cancer .....	25
<b>II. Agents d'imagerie et de thérapie hétérobivalents</b> .....	<b>35</b>
1. Introduction au concept d'hétérobivalence .....	35
2. Ligands hétérobivalents pour l'imagerie et la thérapie.....	43
3. Conception et synthèse de ligands hétérobivalents.....	50
<b>III. Description du projet de recherche</b> .....	<b>54</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>55</b>
<b><i>Ligands hétérobivalents : Méthodologie, synthèse, et caractérisation biologique de traceurs ciblant GRPR et PSMA</i></b> .....	<b>67</b>
<b>I. Introduction</b> .....	<b>70</b>
1. Réactivité de la 3,6-dichlorotétrazine .....	70
2. La 3,6-dichlorotétrazine comme précurseur de plateforme pour l'imagerie moléculaire .....	72
3. PSMA et GRPR : deux cibles de choix pour l'imagerie du cancer de la prostate .....	77
<b>II. Synthèse d'une librairie de ligands hétérobivalents ciblant PSMA et GRPR</b> .....	<b>96</b>
1. Conception des ligands.....	96
2. Optimisation et synthèse des ligands.....	98
<b>III. Évaluation de NODAGA-HBL1 pour l'imagerie du cancer de la prostate</b> .....	<b>113</b>
1. Études in vitro.....	113
2. Études in vivo et ex vivo .....	114
<b>IV. Synthèse de ligands hétérobivalents présentant 3, 4 et 5 itérations de <math>\beta</math> Alanine</b> .....	<b>127</b>
1. Synthèse des espaceurs et couplage à KuE et JMV594 .....	127
2. Assemblage des ligands hétérobivalents.....	129
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	<b>130</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>131</b>
<b><i>Synthèse de radiopharmaceutiques ciblant les protéines CXCR4 et FAP</i></b> .....	<b>143</b>
<b>I. Introduction</b> .....	<b>145</b>
1. Le récepteur à chimiokine C-X-C de type 4 (CXCR4) .....	145
2. Protéine d'activation des fibroblastes (FAP) .....	153
3. Objectifs du projet.....	158
<b>II. Synthèse de radiotraceurs ciblant CXCR4</b> .....	<b>159</b>
1. Synthèse de [N-Me-D-Orn <sup>2</sup> ]FC131 protégé .....	159
2. Voie de synthèse alternative <i>grâce au synthon</i> Fmoc-N(Me)-D-Orn(Dde)-OH et synthèse de Pentixafor.....	161
3. Synthèse de ligands hétérobivalents et monovalents ciblant CXCR4.....	163
<b>III. Synthèse de FAPI-04</b> .....	<b>166</b>
1. Synthèse des <i>building blocks</i> .....	166
<b>Conclusion</b> .....	<b>171</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>172</b>



<b>Caractérisation des interactions ligand-récepteur par imagerie de cellules vivantes .....</b>	<b>179</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>181</b>
1. Généralités .....	181
2. Méthode conventionnelle : utilisation de radioligands.....	182
3. Objectifs du projet.....	185
<b>II. Synthèse des ligands fluorescents de référence .....</b>	<b>187</b>
1. Synthèse de la cyanine-5 disulfonaté 57 .....	189
2. Synthèse des composés de référence fluorescents.....	190
<b>III. Développement de la méthode de mesure .....</b>	<b>197</b>
1. Essais cinétiques .....	197
3. Détermination du $K_D$ du composé 59 pour GRPR .....	199
4. Détermination du $K_i$ de la bombésine par compétition contre le conjugué 59.....	202
5. Détermination de l'affinité du composé 59 pour GRPR sur cellules PC3-pip .....	204
<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>206</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>208</b>
<b><i>Développement d'un nouvel agent chélatant macrocyclique du zirconium-89 pour l'immunoTEP .....</i></b>	<b>211</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>213</b>
1. Anticorps et imagerie TEP .....	213
2. Propriétés physiques du zirconium-89 .....	213
3. État de l'art des agents chélatants du zirconium-89 .....	214
4. Objectif du projet .....	217
<b>II. Synthèse et évaluation d'un chélateur modèle .....</b>	<b>219</b>
1. Synthèse du chélateur modèle .....	219
2. Évaluation préliminaire du radio marquage de Cy-HOPO (73) au zirconium-89 .....	220
<b>III. Synthèse de deux dérivés bifonctionnels de Cy-HOPO .....</b>	<b>221</b>
1. Synthèse de para-aminobenzyl-Cy-HOPO (76) .....	221
2. Formation d'un dérivé bifonctionnel par addition d'un groupement dissymétrique : synthèse de 82 222	
<b>IV. Bioconjugaison à un anticorps .....</b>	<b>224</b>
1. Bioconjugaison « site-spécifique » par cycloaddition sur une fonction azoture .....	224
2. Bioconjugaison statistique via une fonction isothiocyanate .....	226
3. Bioconjugaison <i>via</i> une fonction alkoxyquaramide .....	227
4. Conjugaison au trastuzumab et test de stabilité dans le sérum humain.....	228
<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>230</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>231</b>
<b>Conclusion Générale .....</b>	<b>235</b>
Conclusions.....	236
Perspectives.....	237
Valorisation des résultats.....	238
Remerciements.....	239
<b>Experimental section .....</b>	<b>241</b>
<b>I. Materials and methods.....</b>	<b>243</b>
<b>II. Synthesis and characterization of compounds 1 to 84 .....</b>	<b>245</b>

1.	Chapter I – compounds 1 to 32 .....	245
2.	Chapter II – compounds 34 to 56 .....	304
3.	Chapter III – Compounds <b>57A</b> to <b>66</b> .....	348
4.	Chapter IV – compounds <b>67</b> to <b>84</b> .....	370
<b>III.</b>	<b>Radiolabeling and biological evaluation of conjugates .....</b>	<b>404</b>
1.	<i>In vitro</i> evaluation of conjugates [ <sup>68</sup> Ga]Ga- <b>13</b> , [ <sup>68</sup> Ga]Ga- <b>16</b> and [ <sup>68</sup> Ga]Ga- <b>17</b> .....	404
2.	<i>In vivo</i> evaluation of conjugates [ <sup>68</sup> Ga]Ga- <b>12</b> , [ <sup>68</sup> Ga]Ga- <b>13</b> , [ <sup>68</sup> Ga]Ga- <b>16</b> and [ <sup>68</sup> Ga]Ga- <b>17</b> .....	405
3.	Fluorescence-based <i>in vitro</i> evaluation of conjugates .....	407

## Abbreviations

2-CTC	<i>2-chlorotrityl chloride</i>
2-MPPA	<i>2-(3-Mercaptopropyl)pentanedioic acid</i>
2-PMPA	<i>2-(Phosphonomethyl)pentandioic acid</i>
ACP	<i>Acid phosphatase</i>
APTS	<i>Acide para-toluènesulfonique</i>
BBN	<i>Bombésine</i>
BCN	<i>Bicyclononyne</i>
Boc	<i>Tert-butoxycarbonyl</i>
BODIPY	<i>Bore-dipyrrrométhène</i>
BRS2	<i>Bombesine-receptor subtype 2</i>
CAM	<i>Cell adesion molecules</i>
Cbz	<i>Carboxybenzyle</i>
CCK	<i>Cholecystokinine</i>
CCM	<i>Chromatographie sur couche mince</i>
CLI	<i>Cherenkov luminescence imaging</i>
CT	<i>Computed tomography</i>
CuAAC	<i>Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i>
CXCR4	<i>C-X-C Chimiokine receptor 4</i>
Cy	<i>Cyanine</i>
DBU	<i>1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undéc-7-ène</i>
DCM	<i>Dichlorométhane</i>
Dde	<i>1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl</i>
DFO	<i>Deferroxamine</i>
DIC	<i>N,N'-Diisopropylcarbodiimide</i>
DIEA/DIPEA	<i>Diisopropyléthylamine</i>
DMF	<i>N,N-diméthylformamide</i>
DODT	<i>2,2'-(Ethylendioxy)diethanethiol</i>
DOL	<i>Degree of labeling</i>
DOTA	<i>2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl)tetraacetic acid</i>
DOTAGA	<i>2,2',2''-(10-(2,6-dioxotetrahydro-2H-pyran-3-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid</i>
DPPA	<i>Diphenylphosphoryl azide</i>
DTPA	<i>Diethylenetriaminepentaacetic acid</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EMA	<i>European medical agency</i>
EPR	<i>Enhanced permeability and retention</i>
FAP	<i>Fibroblast activation protein</i>
FAPI	<i>Fibroblast activation protein inhibitor</i>
FDA	<i>Food and drugs administration</i>

FDG	<i>Fluorodeoxyglucose</i>
Fmoc	<i>Fluorenylmethyloxycarbonyl</i>
FR $\alpha$	<i>Folate receptor <math>\alpha</math></i>
GIP	<i>Glucose-dependent insulinotropic polypeptide</i>
GLP	<i>Glucagon-like peptide</i>
GMP	<i>Good manufacturing practice</i>
GRPR	<i>Gastrin-releasing peptide receptor</i>
HATU	Hexafluorophosphate de (diméthylamino)-N,N-diméthyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy)méthaniminium
HBED	<i>Hydroxybenzyl ethylenediamine</i>
HBL	<i>Heterobivalent ligand</i>
HBTU	Hexafluorophosphate de (diméthylamino)-N,N-diméthyl(3H-[1,2,3]triazolophényloxy)méthaniminium
HE	<i>Histidine-acide glutamique</i>
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HOPO	<i>N-hydroxypyridin-2-one</i>
HPLC-MS	<i>High performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry</i>
HRMS	<i>High resolution mass spectrometry</i>
IA	<i>Injected activity</i>
IC50	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
ID	<i>Injected dose</i>
IEDDA	<i>Inverse electron demand Diels-Alder</i>
IgG	<i>Immunoglobuline G</i>
IRM	<i>Imagerie par résonance magnétique</i>
KuE	<i>Lysine-urée-acide glutamique</i>
LRMS	<i>Low resolution mass spectrometry</i>
mAb	<i>Monoclonal antibody</i>
MC1R	<i>Melanocortin receptor 1</i>
MET	<i>Micro-environnement tumoral</i>
MIP	<i>Mean intensity projection</i>
MVL	<i>Monovalent</i>
NAAG	<i>N-acétyl-L-aspartyl-L-glutamate</i>
NHS	<i>N-hydroxysuccinimide</i>
NIR	<i>Near-infrared</i>
NK1	<i>Neurokinin-1</i>
NMBR	<i>Neuromedin B receptor</i>
NODAGA	2,2'-(7-(4-((2-aminoethyl)amino)-1-carboxy-4-oxobutyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetic acid
NPY	<i>Neuropeptide Y</i>
Ns	<i>Nosyle</i>
p.i.	<i>Post injection</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
Pca	<i>Prostate cancer</i>
PEG	<i>Polyéthylène glycol</i>

PSA	<i>Prostate specific antigen</i>
PSMA	<i>Prostate specific membrane antigen</i>
RCPG	<i>Récepteur couplé aux protéines G</i>
RGD	<i>Arginine-Glycine-Acide aspartique</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RP-HPLC	<i>Reverse-phase high performance liquid chromatography</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDF1- $\alpha$	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
S <sub>N</sub> Ar	<i>Substitution nucléophile aromatique</i>
SPAAC	<i>Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition</i>
SPION	<i>Super paramagnetic iron oxide nanoparticles</i>
SPPS	<i>Solid-phase peptide synthesis</i>
Sq	<i>Squaramate</i>
SST	<i>Somatostatine</i>
TA	<i>Température ambiante</i>
TEMP	<i>Tomographie par emission monophotonique</i>
TEP	<i>Tomographie par émission de positrons</i>
TFA	<i>Acide trifluoroacétique</i>
TIS	<i>Triisopropylsilane</i>
Trt	<i>Trityle</i>
TSTU	<i>N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(N-succinimidyl)uronium tetrafluoroborate</i>
Tz	<i>Tétrazine</i>
UV-Vis	<i>Ultra-violet-visible</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
VIH	<i>Virus de l'immunodéficience humaine</i>
VPAC	<i>Vasoactive intestinal polypeptide receptor</i>

# **Introduction générale**

# Table des matières

<b>I. Imagerie médicale du cancer.....</b>	<b>11</b>
<b>1. Les différentes modalités d'imagerie .....</b>	<b>11</b>
A. Imagerie structurale .....	11
a. Imagerie par absorption des rayons X .....	11
b. Imagerie par résonance magnétique (IRM) .....	13
c. Imagerie par réflexion des ultrasons .....	14
B. Imagerie moléculaire.....	14
a. Les différentes modalités d'imagerie moléculaire.....	14
b. Nouvelles modalités d'imagerie .....	22
c. Imagerie moléculaire multimodale.....	23
<b>2. Vectorisation des agents d'imagerie et de thérapie du cancer.....</b>	<b>25</b>
A. Les différentes cibles en cancérologie.....	25
a. Les protéines de transport.....	25
b. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) .....	26
c. Les protéines d'adhésion cellulaire .....	27
d. Les enzymes membranaires.....	28
e. Autres récepteurs membranaires.....	28
B. Les différents vecteurs .....	28
a. Les petites molécules.....	29
b. Peptides et peptidomimétiques .....	29
c. Anticorps et leurs fragments .....	31
<b>II. Agents d'imagerie et de thérapie hétérobivalents .....</b>	<b>35</b>
<b>1. Introduction au concept d'hétérobivalence .....</b>	<b>35</b>
A. Contexte .....	35
a. Hétérogénéité tumorale .....	35
b. Surexpression concomitante de certains biomarqueurs .....	38
c. Agents d'imagerie et de thérapie hétérobivalents .....	39
B. Les premiers ligands multivalents .....	41
a. Premiers pas : les ligands homobivalents .....	41
b. Les premiers ligands hétérobivalents .....	42
<b>2. Ligands hétérobivalents pour l'imagerie et la thérapie.....</b>	<b>43</b>
A. Ligand hétérobivalents ciblant GRPR et $\alpha_v\beta_3$ .....	43
a. Agents d'imagerie hétérobivalents ciblant GRPR et $\alpha_v\beta_3$ .....	43
b. Ligands hétérobivalents pour la radiothérapie ciblée de GRPR et $\alpha_v\beta_3$ .....	47
B. Ligand hétérobivalents ciblant GRPR et PSMA.....	47
C. Autres combinaisons pour le diagnostic et la thérapie du cancer de la prostate .....	47
D. Autres combinaisons pour le diagnostic et la thérapie du cancer du sein .....	48
E. Autres combinaisons intégrant des ligands de $\alpha_v\beta_3$ .....	49
<b>3. Conception et synthèse de ligands hétérobivalents .....</b>	<b>50</b>
A. L'approche linéaire .....	50
B. L'approche « branchée » .....	51
<b>III. Description du projet de recherche .....</b>	<b>54</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>55</b>

## I. Imagerie médicale du cancer

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le terme de cancer désigne une large gamme de maladies caractérisées par la multiplication rapide de cellules anormales<sup>1</sup>. Les masses ainsi formées sont appelées des tumeurs. Les cellules tumorales ont la capacité de se détacher de la tumeur primitive et de migrer vers d'autres organes en empruntant les vaisseaux sanguins et lymphatiques formant ainsi des métastases qui constituent la principale cause de décès par cancer<sup>1</sup>.

En 2018 en Europe, près de 4 millions de personnes ont été diagnostiquées avec un cancer et près de 2 millions de personnes ont succombé de cette maladie<sup>2</sup>. Les quatre cancers les plus diagnostiqués en 2018 étaient : les cancers du sein (522 500 cas), les cancers colorectaux (499 700 cas), les cancers de la prostate (449 800 cas) et les cancers des poumons (470 000 cas). Ces quatre cancers combinés ont causé cette même année la mort de 875 400 personnes<sup>2</sup>.

Cependant, le diagnostic précoce de ces maladies permet de nettement réduire leur mortalité. L'imagerie médicale fait partie des outils à disposition des médecins pour détecter la présence de tumeurs et/ou de métastases chez un individu.

### 1. Les différentes modalités d'imagerie

On peut diviser les différentes modalités d'imagerie en deux catégories distinctes : l'imagerie structurelle, qui donne une information anatomique comme la localisation et la taille des tissus, et l'imagerie moléculaire qui procure des informations fonctionnelles, à l'échelle de la molécule.

Contrairement aux techniques d'imagerie structurelle, l'imagerie moléculaire donne une information fonctionnelle sur un événement moléculaire particulier, par exemple : l'interaction entre une cible avec un traceur, ou agent d'imagerie, doté d'une sonde capable d'émettre un signal détectable et ainsi de localiser précisément le processus biologique d'intérêt<sup>3,4</sup>.

#### A. Imagerie structurelle

##### a. Imagerie par absorption des rayons X

La découverte des rayons X et l'étude de leurs propriétés sont le fait du physicien allemand Wilhelm Röntgen<sup>5</sup>. Cette découverte lui valut le prix Nobel de physique en 1901 et signa les prémices de l'imagerie médicale. Les rayons X sont des rayonnements électromagnétiques dont les courtes longueurs d'onde (< 10 nm) leur permettent de traverser des matériaux (ou des tissus) dont la densité est faible.

L'imagerie par absorption des rayons X repose sur la différence de densité entre les tissus : les tissus les moins denses comme la peau, les muscles ou encore les vaisseaux sanguins sont transparents aux rayons X tandis que les tissus très denses comme les os les absorbent<sup>6</sup> (*Figure 1*).





Figure 1 : Radiographie de la main d'Anna Bertha Röntgen, effectuée par son mari Wilhelm Röntgen en 1895. On y discerne nettement ses os ainsi que son alliance. Il s'agit de la toute première radiographie.

Ce rayonnement ionisant est produit à l'aide des tubes à rayons X (Crookes, Coolidge, à anode tournante). La décélération des électrons émis par un filament en tungstène (cathode) par les atomes constituant l'anode (en tungstène également) génère un rayonnement continu de freinage (*Bremsstrahlung*) constitué de rayons X<sup>7</sup>. Les rayons X non absorbés heurtent alors le détecteur permettant ainsi la génération d'images contrastées dévoilant l'anatomie du patient ayant subi l'examen (Figure 2).

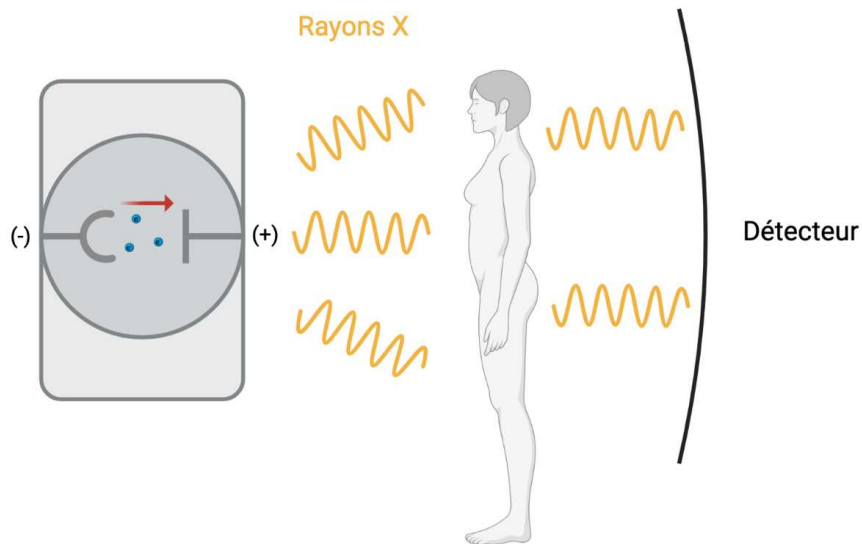


Figure 2 : Schéma représentatif du déroulement d'une radiographie. À gauche, le tube de Coolidge, les électrons sont représentés en bleu. À droite, le détecteur, autrement appelé « cassette ».

Les progrès effectués dans le développement d'appareils et de logiciels de traitement informatique toujours plus performants ont mené à la création de la tomodensitométrie (*Computed Tomography*, autrement appelé *CT scan*) permettant de produire des images à haute résolution en trois dimensions<sup>8</sup>.

Il est également possible d'observer des tissus habituellement transparents aux rayons X en administrant au patient un agent de contraste contenant un élément dont le numéro atomique est élevé et possédant une haute densité, tels que l'iode<sup>9</sup> (I<sub>127</sub>) ou le baryum (BaSO<sub>4</sub>), capable d'absorber ces rayonnements.

### b. Imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'imagerie par résonance magnétique nucléaire tire profit des propriétés magnétiques des noyaux atomiques pour fournir des informations structurales tridimensionnelles tout en bénéficiant d'une résolution spatiale élevée. Contrairement à la tomodensitométrie, l'imagerie par résonance magnétique est particulièrement indiquée pour l'imagerie de tissus peu denses qui contiennent de l'eau.

Lors d'un examen de type IRM, le patient est placé au centre d'un aimant supraconducteur. Le puissant champ magnétique appliqué dans l'enceinte de l'appareil a pour conséquence la polarisation du moment magnétique de spin de chacun des atomes possédant un spin non nul (et en particulier l'hydrogène-1 constituant les molécules d'eau). Les spins, alignés par le champ magnétique, sont ensuite à nouveau perturbés au moyen d'une impulsion électromagnétique. Lorsque celle-ci cesse d'être appliquée, les moments magnétiques de spin cessent d'être polarisés et retournent à leur état initial suivant des temps dits de relaxation  $t_1$  (temps de relaxation longitudinal) et  $t_2$  (temps de relaxation transversal) qui dépendent de l'environnement physico-chimique de l'atome concerné. C'est la mesure de ces temps de relaxation qui permet de générer des images bien définies (Figure 3)<sup>10</sup>.



Figure 3 : Coupe sagittale d'un genou obtenue par IRM (image tirée d'un ouvrage<sup>10</sup>).

L'excellente résolution spatiale de cette technique (25-100  $\mu\text{m}^{11}$ ) s'accompagne malheureusement d'une faible sensibilité, nécessitant des temps d'acquisition pouvant être supérieurs à 20 minutes. Pour pallier ce problème, des agents de contraste peuvent être

utilisés. Leur rôle est de raccourcir les temps de relaxation des spins des atomes d'hydrogène des molécules d'eau présentes dans leur environnement<sup>12</sup>. Aujourd'hui, la quasi-totalité des agents de contraste utilisés en clinique sont des complexes de gadolinium (III). Cependant, en raison de leur toxicité, la tendance est maintenant à la recherche d'agents de contraste basés sur d'autres éléments comme le manganèse ou le fer<sup>12</sup>.

### c. Imagerie par réflexion des ultrasons

La dernière modalité d'imagerie structurelle que nous aborderons dans cette introduction est l'imagerie par réflexion des ultrasons, communément désignée sous le nom d'échographie. Cette technique repose sur la réflexion d'ultrasons qui, une fois appliqués par une sonde à la surface d'un tissu, vont se répandre dans la zone à imager et être réfléchis au contact d'obstacles denses. La mesure du temps écoulé entre l'émission et la détection du signal émis est traitée informatiquement pour donner une cartographie bidimensionnelle de la zone traitée (Figure 4).

En raison de son faible coût et de son innocuité, l'échographie est un examen couramment pratiqué. L'utilisation de l'échographie reste cependant limitée par la faible profondeur de pénétration des ultrasons dans les tissus (quelques cm). L'administration d'agents de contraste échogènes avant l'examen, comme des microbulles, permet d'obtenir des images plus résolues<sup>13</sup>.

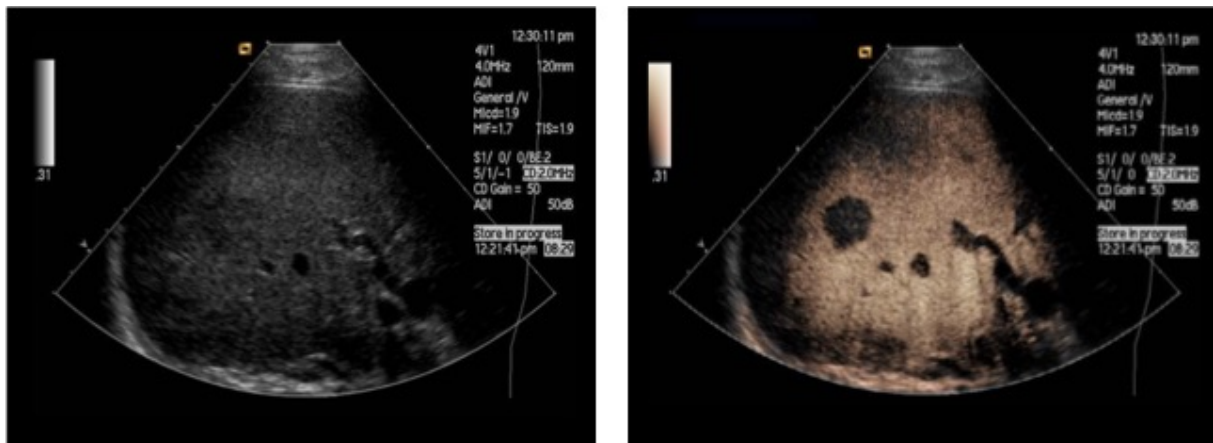


Figure 4 : Échographie du foie d'un patient possédant plusieurs métastases hépatiques. Images acquises sans agent de contraste (gauche) et avec agent de contraste (droite) (tiré de la littérature<sup>14</sup>).

## B. Imagerie moléculaire

### a. Les différentes modalités d'imagerie moléculaire

Comme précédemment décrit, l'imagerie moléculaire donne des informations fonctionnelles plutôt que structurelles. Ce type d'imagerie repose sur l'administration d'une sonde capable d'émettre un signal, et permettant ainsi le suivi de son parcours au sein de l'organisme par imagerie.

Il existe différentes modalités d'imagerie moléculaire qui conditionnent le type de sondes utilisées. Les deux principales modalités d'imagerie sont : l'imagerie nucléaire, où la sonde est

un radionucléide émetteur de positrons ou de rayons gamma, et l'imagerie optique, où la sonde est un fluorophore.

### *Imagerie nucléaire*

L'imagerie nucléaire (ou scintigraphie) est la modalité d'imagerie moléculaire qui nous a tout particulièrement intéressés tout au long de cette thèse. Comme décrit dans le paragraphe précédent, l'imagerie nucléaire repose sur l'emploi d'un traceur radioactif.

L'imagerie nucléaire a pour avantage sa très forte sensibilité qu'elle doit à la transparence de tous les tissus pour les rayonnements gamma. Elle possède néanmoins une résolution spatiale inférieure à celle de l'IRM (1-2 mm<sup>11</sup>). La très haute énergie de ces rayonnements fait des traceurs d'imagerie nucléaire des composés particulièrement radiotoxiques, ne pouvant être administrés en des quantités trop importantes et dont la manipulation doit respecter des réglementations en termes de radioprotection.

Il existe deux modalités d'imagerie nucléaire : la tomographie par émission monophotonique (TEMP, en anglais *SPECT*) utilisant des radioéléments qui sont des émetteurs directs de rayonnements gamma et la tomographie par émission de positrons (TEP, en anglais *PET*), basée sur l'emploi de radioéléments émetteurs de positrons (particules  $\beta^+$ ). Les positrons ainsi émis, lorsqu'ils rentrent en contact avec un électron de leur environnement, subissent une annihilation ayant pour conséquence l'émission de deux photons gamma de 511 keV à 180° (*Figure 5*).

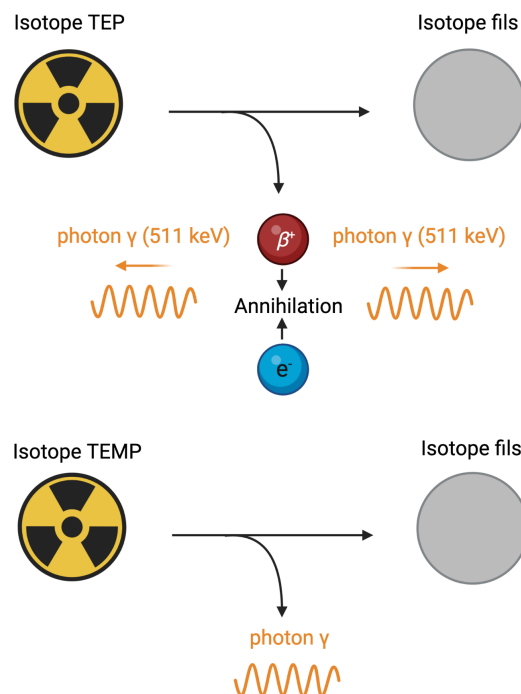


Figure 5 : Schéma représentatif de l'émission de rayonnement gamma dans le cadre de l'imagerie TEP (haut) et TEMP (bas). L'isotope fils peut être radioactif ou non.

Bien que ces deux techniques reposent sur la détection de rayonnements gamma, elles nécessitent des équipements différents. Lors d'un examen TEMP, le patient est placé au centre

d'une unique caméra  $\gamma$  en rotation autour de lui. En imagerie TEP, ce sont deux caméras, face à face, en rotation qui sont utilisées afin de détecter les deux photons émis par l'annihilation des positrons. En clinique, ces deux techniques sont avantageusement utilisées en combinaison avec la tomodensitométrie pour l'imagerie d'un large éventail de pathologies<sup>15,16</sup>.

Il existe différents radioéléments disponibles pour effectuer ce type d'imagerie (*Tableau 1*). La demi-vie du radionucléide choisi doit être en adéquation avec le type de vecteur utilisé. Par exemple, si l'on souhaite utiliser un anticorps comme vecteur pour de l'imagerie nucléaire, il est préférable de choisir un radionucléide dont la demi-vie est longue, comme le zirconium-89 ou l'indium-111, en raison du temps de circulation élevé des anticorps dans l'organisme. Au contraire, lorsque l'on souhaite utiliser un vecteur peptidique, on peut se contenter de radioéléments dont la durée de vie est plus courte, comme le gallium-68, le fluor-18 ou encore le technétium-99 métastable (*Tableau 1*).

En imagerie TEMP, le technétium-99 métastable est le radioélément le plus couramment utilisé en clinique (20 millions de procédures/an) en raison de sa disponibilité. En effet, ce radioélément peut être produit en cyclotron, mais également obtenu à partir de générateurs au molybdène-99<sup>11</sup>. Il est cependant nécessaire de souligner que le molybdène-99 n'est produit que dans deux sites en Europe (Paris et Bruxelles) et cinq dans le monde entier.

En imagerie TEP, c'est le fluor-18 (utilisé pour produire le [<sup>18</sup>F]F-FDG) qui est le radioisotope le plus commun<sup>16</sup>. Ces deux dernières décennies, un intérêt grandissant pour le gallium-68 a émergé. Contrairement au fluor-18, il peut être obtenu à partir d'un générateur au germanium-68<sup>17</sup>.

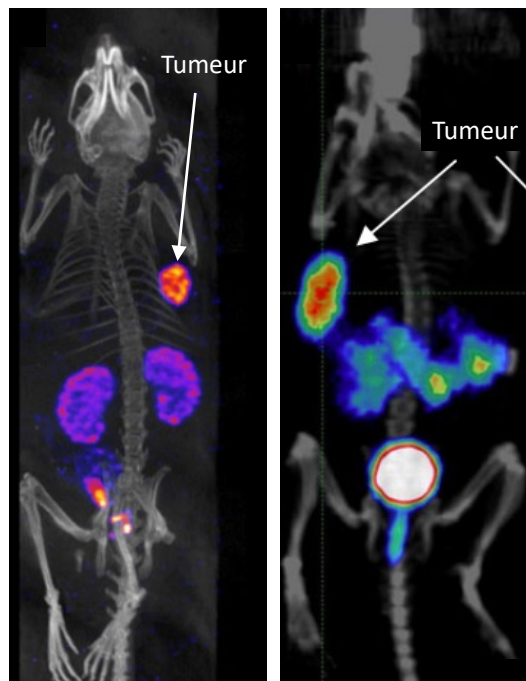


Figure 6 : Image micro TEMP/CT obtenue 24 h p.i. de [<sup>111</sup>In]In-RM2 sur souris xénotransplantée avec des cellules de lignée PC3 (gauche) et image micro TEP/CT obtenue 1 h p.i. de [<sup>68</sup>Ga]Ga-RM2 sur souris xénotransplantées avec des cellules de lignée PC3 (droite). Les tumeurs sont indiquées par des flèches (tiré de la littérature<sup>18</sup>)

Modalité	Radionucléide	Demi-vie	Énergie des particules (MeV)
TEMP	$^{123}\text{I}$	13,2 h	0,16
	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6 h	0,14
	$^{111}\text{In}$	67,9 h	0,17/0,25
	$^{67}\text{Ga}$	78,3 h	0,09/0,19/0,30
	$^{201}\text{Tl}$	6,7 j	0,17
	$^{177}\text{Lu}$	6,7 h	0,17
TEP	$^{18}\text{F}$	109,8 min	0,633
	$^{68}\text{Ga}$	67,6 min	1,900
	$^{89}\text{Zr}$	3,3 j	0,897
	$^{64}\text{Cu}$	12,7 h	0,653
	$^{44}\text{Sc}$	3,9 h	1,474
	$^{52\text{g}}\text{Mn}$	5,5 j	0,576
	$^{82}\text{Rb}$	1,3 min	3,350
	$^{11}\text{C}$	20,4 min	0,960
	$^{13}\text{N}$	9,97 min	1,198

Tableau 1 : Listes non exhaustives de radioéléments utilisables en TEP et en TEMP, leur demi-vie et l'énergie des particules émises lors de la désintégration<sup>11,17,19</sup>

Que ce soit en imagerie TEMP ou en imagerie TEP, on peut séparer les radioéléments en deux catégories distinctes. La première catégorie inclut les radioéléments non métalliques ( $^{18}\text{F}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{11}\text{C}$ ...). Ces éléments peuvent être liés au vecteur de manière covalente, parfois après dérivatisation avec un groupement dit « prosthétique » (Figure 7)<sup>20</sup>. Ils peuvent également être introduits directement dans la molécule d'intérêt comme c'est le cas pour le [ $^{18}\text{F}$ ]F-FDG<sup>21</sup>.

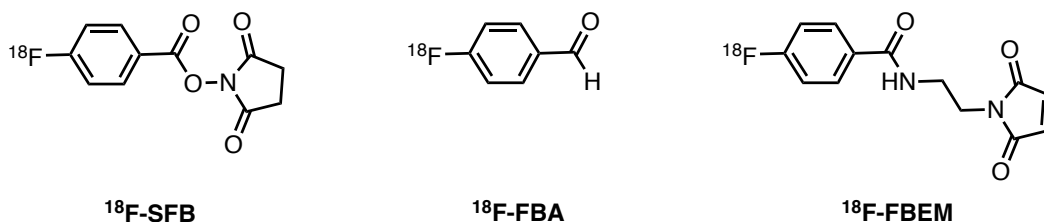


Figure 7 : Exemple de trois groupements prosthétiques utilisés pour le marquage au fluor-18 : 4- $^{18}\text{F}$ ]fluorobenzoate de N-succinimidyl, 4- $^{18}\text{F}$ ]fluorobenzaldéhyde et N-maleoyléthyle-4- $^{18}\text{F}$ ]fluorobenzamide.

La seconde catégorie est composée des radioéléments métalliques ( $^{111}\text{In}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ...). Contrairement aux autres éléments, ces radionucléides ne peuvent être conjugués au vecteur de manière covalente. Ils sont intégrés au traceur par complexation par un agent chélatant que l'on appelle aussi chélateur<sup>22,23</sup>. Le choix de l'agent chélatant est d'une importance capitale

dans le développement d'un radiotracer. Ce dernier doit pouvoir former des complexes stables non seulement *in vitro*, mais aussi *in vivo* avec le radionucléide envisagé<sup>24</sup>. De plus, la présence du chélateur peut avoir une influence majeure sur l'affinité du traceur pour sa cible, mais également sur la pharmacocinétique et la biodistribution de ce dernier<sup>25,26</sup>. La Figure 8 donne les structures des agents chélatants les plus utilisés en médecine nucléaire.

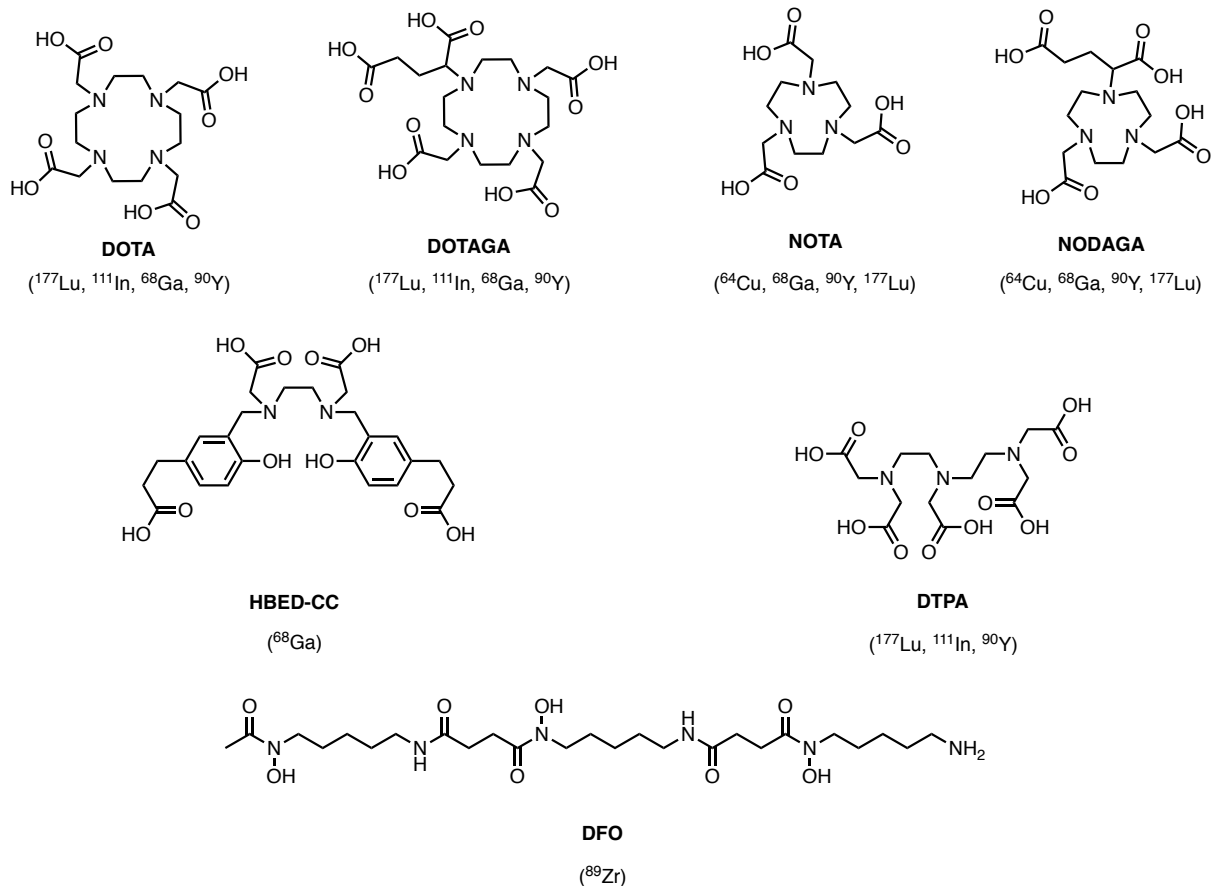


Figure 8 : Exemple d'agents chélatants bifonctionnels usuellement utilisés en médecine nucléaire, les pointillés représentent le site de conjugaison au vecteur. Entre parenthèses, les principaux radionucléides avec lesquels ils sont compatibles.

En raison de la capacité de certains agents chélatants à former des complexes avec différents radionucléides, comme le DOTA (Figure 8), il est possible de radiomarquer les traceurs fonctionnalisés avec ce type de chélates au moyen de différents radioéléments présentant des propriétés différentes. Ainsi, certains composés peuvent être marqués avec des radionucléides émetteurs  $\beta^+$  ou  $\gamma$  pour être utilisés comme agents d'imagerie, mais également être marqués à l'aide d'isotopes dits thérapeutiques.

Les isotopes thérapeutiques sont des émetteurs de particules  $\beta^-$  (électrons) ou  $\alpha$  (noyau d'hélium) dont le rayonnement fortement ionisant dépose une grande quantité d'énergie et qui, de ce fait, présentent une forte toxicité cellulaire (Tableau 2).

Les traceurs ayant la capacité d'être marqués à la fois avec un isotope d'imagerie et un radionucléide thérapeutique (et, de fait, utilisés à la fois pour la thérapie et le diagnostic) sont appelés des composés « théranostiques » (contraction des mots thérapeutique et diagnostique). Parmi les composés théranostiques, on compte notamment le DOTA-TATE (et son analogue le DOTA-TOC) pouvant être marqué à la fois au lutétium-177, mais également au

gallium-68 pour des applications diagnostiques en TEP<sup>27</sup>. Le [<sup>177</sup>Lu]Lu-DOTA-TATE est approuvé par la FDA et l'EMA sous le nom de Lutathera®.

Il existe d'autres radiotraceurs pouvant être utilisés dans le cadre d'un couple théranostique. C'est par exemple le cas de NeobOMB1 (ciblant le GRPR) et du composé PSMA-617 (approuvé par la FDA)<sup>28,29</sup>.

Radionucléide	Demi-vie	Particule émise
<sup>177</sup> Lu	6,7 j	β <sup>-</sup>
<sup>90</sup> Y	64,8 h	β <sup>-</sup>
<sup>131</sup> I	8 j	β <sup>-</sup>
<sup>225</sup> Ac	9,9 j	α
<sup>212</sup> Pb	10,64 h	α
<sup>213</sup> Bi	45 min	β <sup>-</sup>
<sup>211</sup> At	7,2 h	α
<sup>161</sup> Tb	6,9 j	β <sup>-</sup>

Tableau 2 : Liste non exhaustive de radioéléments utilisés en radiothérapie interne vectorisée avec leur type d'émission.

### *Imagerie optique*

La dernière modalité d'imagerie fonctionnelle que nous aborderons dans cette introduction est l'imagerie optique. L'imagerie optique repose sur l'utilisation d'un traceur émettant des photons appartenant au domaine du visible ou du proche infrarouge.

On dénombre trois mécanismes permettant l'émission de photons utilisables en imagerie optique : la chimiluminescence ou bioluminescence (le photon est émis à l'issue d'une réaction chimique)<sup>30</sup>, la luminescence Cherenkov (le photon est émis lorsqu'une particule se déplace à une vitesse supérieure à celle de la lumière dans un milieu diélectrique donné)<sup>31</sup> et la fluorescence (le photon est émis à la suite du retour d'un électron d'un état excité à son état fondamental). Dans cette introduction, nous développerons uniquement le concept d'imagerie par fluorescence.

La fluorescence, à ne pas confondre avec la phosphorescence, est un phénomène physique au cours duquel une molécule va absorber un photon d'une longueur d'onde donnée, appelée longueur d'onde d'absorption ( $\lambda_{abs}$ ) générant un transfert énergétique d'un état fondamental  $S_0$  à un état excité  $S_1$ . Le retour de cet état excité à l'état fondamental est accompagné de l'émission d'un photon à une longueur d'onde dite d'émission ( $\lambda_{em}$ ). La différence entre la longueur d'onde d'émission et la longueur d'onde d'absorption est appelée le déplacement de Stokes et est due à des relaxations non radiatives qui surviennent à l'état excité (Figure 9).



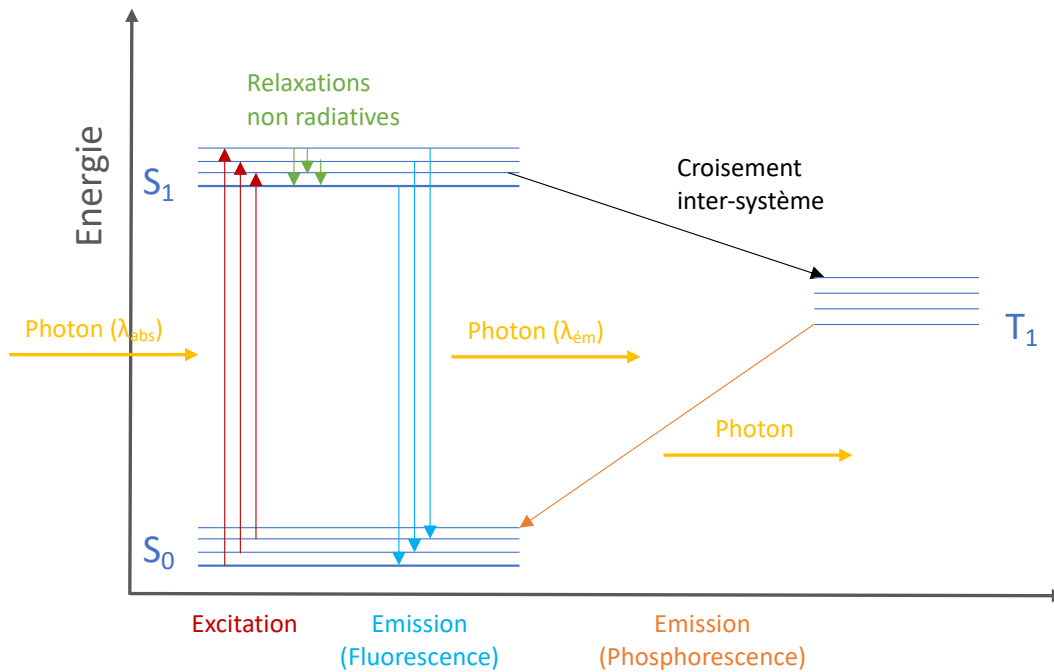


Figure 9 : Diagramme de Perrin-Jablonski décrivant les phénomènes de fluorescence et de phosphorescence.  $S_0$  désigne l'état singulet fondamental,  $S_1$  l'état singulet excité et  $T_1$  un état triplet excité.

Afin d'effectuer de l'imagerie par fluorescence, l'administration au patient d'une molécule fluorescente, suivi de l'irradiation du patient avec un rayonnement correspondant à une longueur d'onde d'excitation du fluorophore, sont nécessaires. Il existe pléthore de molécules capables d'émettre des photons par fluorescence. Parmi elles on retrouve les rhodamines, les fluorescéines, les coumarines, les dérivés du pyrène, les cyanines, etc...<sup>32</sup>

Cependant, pour qu'un fluorophore puisse être utilisé en tant que sonde d'imagerie, il doit répondre à plusieurs critères. Premièrement, le fluorophore doit avoir ses longueurs d'onde d'absorption et d'émission dans une gamme où les tissus et l'hémoglobine absorbent peu et où le phénomène d'autofluorescence des cellules est faible. Cette gamme de longueurs d'onde est communément appelée la « fenêtre de transparence des tissus » et se situe dans les domaines du proche infrarouge (en anglais : *near-infrared*) *NIR-I* (650-900 nm) et *NIR-II* (900-1400 nm) (Figure 10)<sup>33,34</sup>.

Deuxièmement, le fluorophore doit posséder une bonne solubilité en milieu aqueux. En effet, la majorité des fluorophores sont des molécules organiques planes souvent constituées de cycles aromatiques ou de chaînes hydrocarbonées insolubles dans l'eau. Les rendre solubles en milieu aqueux constitue donc un défi de taille<sup>35</sup>.

Pour finir, un tel fluorophore se doit d'être stable en milieu biologique (émission stable dans une large gamme de pH centrée autour de la neutralité, résistance aux nucléophiles présents dans les milieux biologiques comme le glutathion) et suffisamment résistant au photoblanchiment<sup>36</sup>.

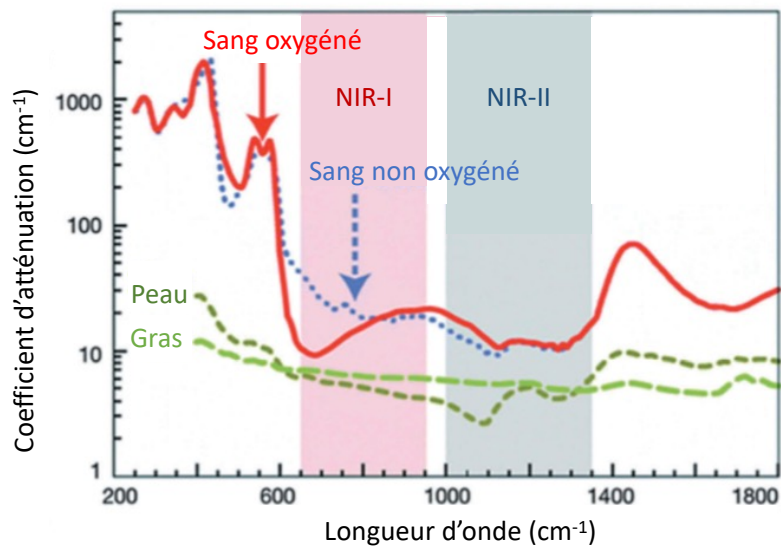


Figure 10 : Coefficients d'absorption de l'eau et de différentes molécules endogènes présentes dans les tissus, représentation des fenêtres de transparence des tissus NIR-I et NIR-II (adapté de la littérature<sup>37</sup>).

L'imagerie par fluorescence est forte de plusieurs atouts. La sensibilité des appareils de mesure permet l'utilisation de très faibles concentrations de traceur (quelques nanomoles en utilisant des fluorophores à forte brillance) limitant ainsi la toxicité potentielle du fluorophore. De plus, par rapport à l'imagerie nucléaire qui exploite des rayonnements ionisants, les rayonnements visibles et infrarouges ne constituent aucun danger ni pour le patient ni pour le personnel soignant. Cependant, malgré la sensibilité des appareils de mesure et l'innocuité des traceurs, l'imagerie par fluorescence demeure à ce jour une technique d'imagerie de surface (jusqu'à 1 cm), et ce même en utilisant un fluorophore répondant aux conditions précédemment évoquées. Ce type d'imagerie est largement utilisé en imagerie préclinique, sur petits animaux<sup>38,39</sup>, mais également de plus en plus en clinique pour des opérations de chirurgie guidée par fluorescence<sup>40</sup>.

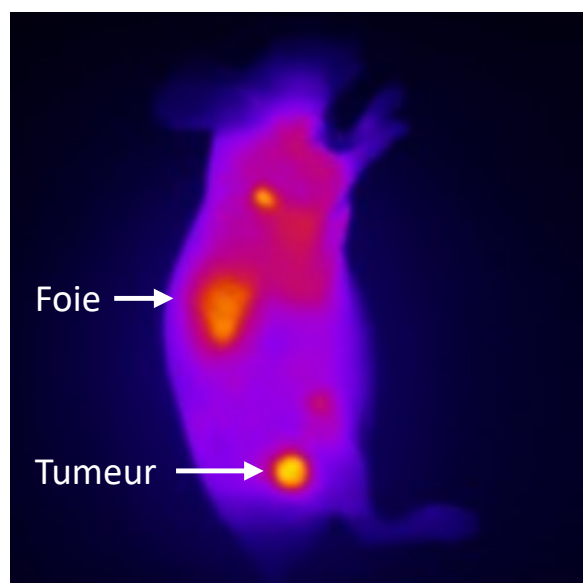


Figure 11 : Image obtenue par imagerie de fluorescence 72 h après injection d'un traceur NIR-II sur une souris xénotransgénée avec des cellules cancéreuses de lignée U87MG (tiré de la littérature<sup>39</sup>).

## b. Nouvelles modalités d'imagerie

Le développement des appareillages et des connaissances de certains phénomènes physico-chimiques ont permis aux chercheurs d'établir de nouvelles modalités d'imagerie, donnant accès à de nouveaux types d'informations fonctionnelles ou facilitant l'accès à ces dernières.

Parmi elles on peut citer l'imagerie photo-acoustique qui repose sur l'émission d'un signal acoustique induit par une radiation lumineuse, issue bien souvent d'un laser à lumière pulsée. Cette modalité d'imagerie émergente est souvent comparée à l'imagerie optique qu'elle surpasse en termes de profondeur de pénétration dans les tissus (quelques cm). L'utilisation d'agents de contraste photo-acoustique, usuellement appelés chromophores photo-acoustiques, tels que le vert d'indocyanine ou le bleu de méthylène, permet d'améliorer le contraste des images ainsi générées<sup>41</sup>.

On peut également citer l'imagerie par luminescence Cherenkov (en anglais *CLI*), qui rentre également dans le cadre de l'imagerie optique. Cette modalité repose sur un principe physique appelé la radiation Cherenkov qui se produit lorsqu'une particule chargée se déplace à une vitesse supérieure à celle de la lumière dans un milieu donné, phénomène découvert en 1934 par Pavel Alekseyevich Cherenkov. Les positrons émis par le fluor-18 ainsi que d'autres radioéléments comme le zirconium-89 ou le gallium-68 produisent une radiation de ce type. La majorité des traceurs valables pour la TEP sont donc également utilisables en imagerie Cherenkov. Cependant les photons émis par cette radiation appartiennent au domaine du visible, faisant de cette modalité d'imagerie une technique de surface<sup>42</sup> (Figure 12). Cette modalité d'imagerie rentre par exemple en compétition avec la bimodalité nucléaire/optique pour la chirurgie guidée par fluorescence (ici par radiation Cherenkov)<sup>43</sup>.

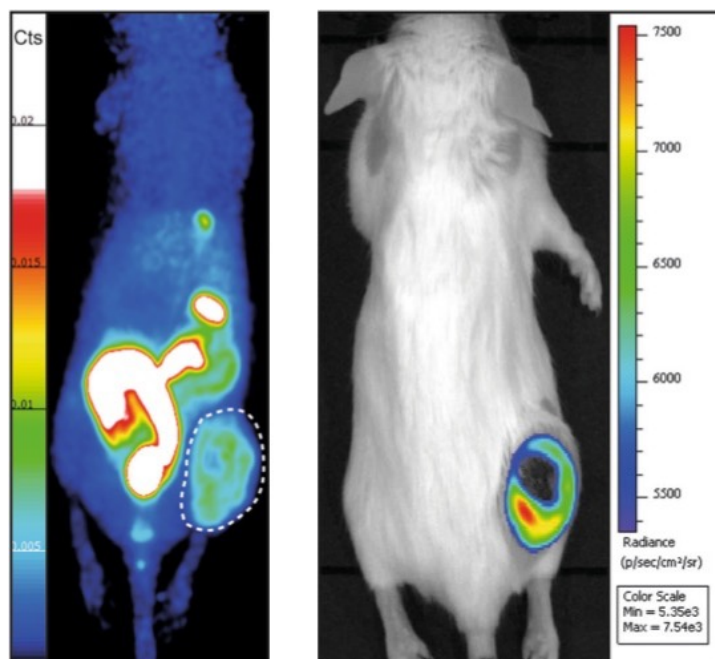


Figure 12 : Images TEP (gauche) et CLI (droite) obtenues 120 min p.i. de  $[^{18}\text{F}]$ F-fluoromisonidazole sur souris xénogreffées avec des cellules tumorales CT26 (tiré de la littérature<sup>44</sup>).

### c. Imagerie moléculaire multimodale

L'imagerie moléculaire multimodale résulte de la combinaison de deux modalités d'imagerie moléculaire, permettant l'acquisition simultanée de données résultant de deux phénomènes physiques distincts. Bien que le terme multimodal puisse être attribué à la combinaison entre une modalité d'imagerie structurelle et une modalité d'imagerie fonctionnelle (TEP/CT, TEMP/CT...), on entend ici par imagerie moléculaire multimodale la combinaison de deux modalités d'imagerie moléculaire.

Deux approches permettent d'effectuer un examen d'imagerie multimodal. Il est en effet possible d'administrer simultanément (ou successivement) deux traceurs distincts correspondant à chacune des modalités désirées. Cependant, afin de bénéficier d'une pharmacocinétique identique, il est préférable d'utiliser des traceurs hybrides (ou bimodaux) pouvant être tracés par deux modalités différentes.

La conception de ces traceurs hybrides constitue cependant un challenge en raison des différences de sensibilité entre les différentes modalités d'imagerie moléculaire qui nécessitent par conséquent des concentrations différentes en traceur. On peut citer l'exemple de l'imagerie nucléaire qui présente une sensibilité bien supérieure à celle de l'IRM fonctionnelle. Cependant, le développement d'agents d'imagerie hybride nucléaire/optique ne présente pas ce désavantage, les deux modalités ayant des sensibilités similaires.

#### *Imagerie nucléaire/IRM*

Comme expliqué précédemment, la difficulté dans la production d'agents hybride d'imagerie nucléaire/IRM fonctionnelle réside dans la différence de sensibilité entre les deux techniques (de l'ordre de  $10^6$ )<sup>45</sup>. Cependant, la combinaison des informations quantitatives procurées par l'imagerie nucléaire avec la très haute résolution spatio-temporelle de l'IRM et l'émergence récente des nouveaux imageurs TEP-IRM constituent une opportunité pour le développement de tels agents hybrides<sup>46</sup>.

Pour pallier ce problème, l'une des solutions possibles est de marquer des agents de contraste IRM avec de très faibles activités spécifiques en radionucléide<sup>47</sup> émetteur TEP ou TEMP (*Figure 13*).

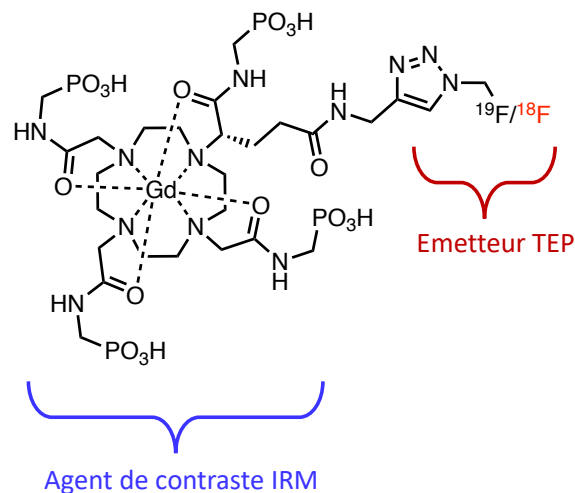


Figure 13 : Structure du traceur bimodal TEP/IRM développé par Frullano et al.<sup>47</sup>

Une autre approche consiste à fonctionnaliser des nanoparticules constituées d'éléments pouvant jouer le rôle d'agent de contraste (Gd, Mn, Fe...) avec un agent d'imagerie nucléaire. En contrôlant la quantité d'agent d'imagerie conjugué aux nanoparticules, on contrôle ainsi les problèmes liés à la différence de sensibilité des deux techniques. Cette approche a par exemple été proposée au sein de notre université, où des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique (*SPIONS*) ont été conjuguées à un chélateur permettant la complexation du cuivre-64, émetteur de positrons<sup>48</sup>.

### *Imagerie optique/IRM*

De la même manière que pour la bimodalité imagerie nucléaire/IRM, le développement d'agents hybrides optique/IRM présente la même limitation, à savoir la différence de sensibilité entre les deux techniques. Ainsi les solutions pour l'outrepasser sont les mêmes. On peut notamment citer l'exemple de Flores *et al.* qui ont proposé un agent d'imagerie basé sur un Aza-BODIPY symétrique bifonctionnalisé avec deux unités DOTA permettant la complexation de gadolinium(III)<sup>49</sup>.

### *Imagerie nucléaire/optique*

L'imagerie nucléaire et l'imagerie optique bénéficient toutes deux de sensibilités similaires facilitant le développement de sondes hybrides alliant ces deux modalités. L'imagerie nucléaire, en raison de sa pénétrabilité des tissus, permet le diagnostic, la stratification et la localisation des lésions tumorales. Dans le même temps, l'imagerie optique, forte d'une meilleure résolution spatiale, constitue un outil puissant pour la chirurgie guidée par fluorescence et notamment pour la résection des tumeurs. La combinaison de ces deux modalités sur un seul traceur hybride représente un avantage de taille, permettant de rassembler ces deux applications dans une seule entité moléculaire.

Ces dernières années ont vu se développer une multitude de traceurs hybrides de ce type, utilisant différentes familles de vecteurs, de l'anticorps à la petite molécule en passant par les peptides<sup>50</sup>. La conception de ce type de sondes est une thématique récurrente au sein de notre laboratoire<sup>51-55</sup> (*Figure 14*).

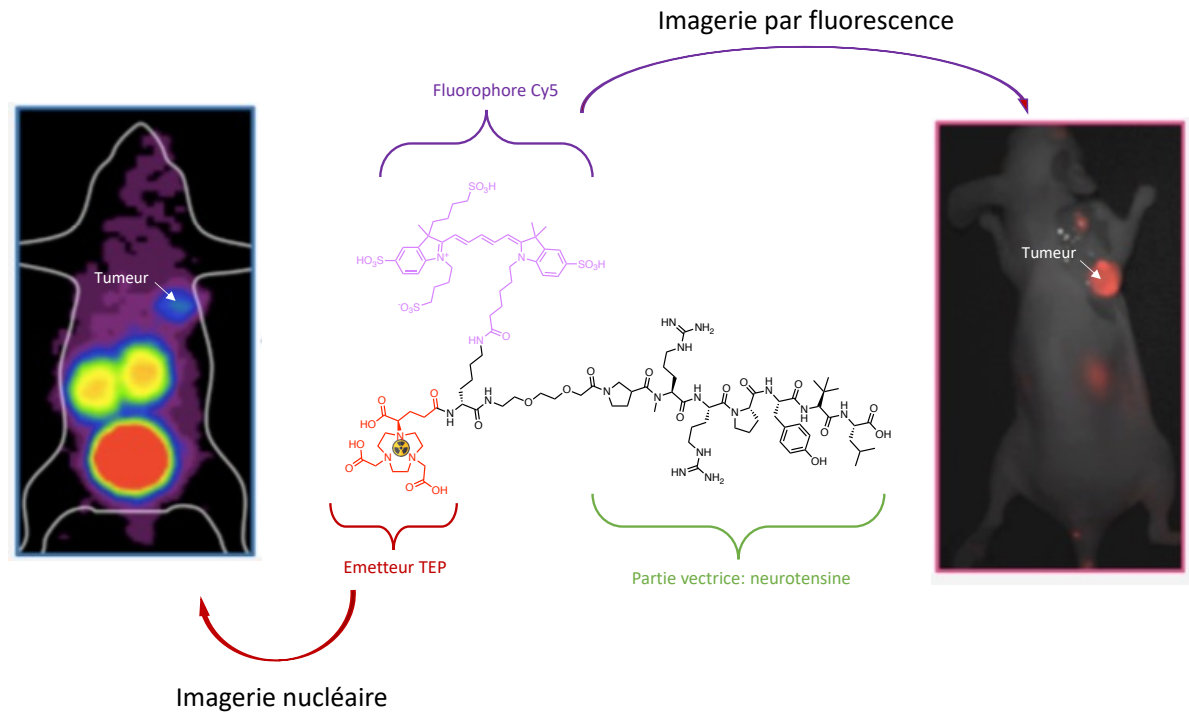


Figure 14 : Structure d'une sonde bimodale TEP/optique développée par Renard et al. et images obtenues via les deux modalités d'imagerie (figure adaptée de la littérature<sup>54</sup>).

## 2. Vectorisation des agents d'imagerie et de thérapie du cancer

Dans le point précédent, nous nous sommes intéressés aux différentes modalités d'imagerie et donc aux différents moyens de détection des traceurs d'imagerie moléculaire au sein de l'organisme. Dans ce nouveau point, il sera expliqué par quels mécanismes ces traceurs sont capables de s'accumuler spécifiquement au niveau des lésions tumorales. Dans un premier temps seront listées les différentes cibles potentielles pour les agents d'imagerie et de thérapie, puis, dans un second temps, nous nous intéresserons aux différents vecteurs utilisés.

### A. Les différentes cibles en cancérologie

Comme nous l'avons décrit en préambule, les tumeurs sont caractérisées par des anomalies à la fois au niveau des cellules cancéreuses ainsi qu'au niveau du micro-environnement tumoral (surexpression de biomolécules, métabolisme accéléré) qui permettent la multiplication rapide de ces cellules. Ces phénomènes constituent des cibles biologiques de choix pour l'imagerie et la thérapie des tumeurs cancéreuses. Parmi eux, on compte entre autres la surexpression, par les cellules cancéreuses, ou par leur micro-environnement, de protéines de transport, de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), de récepteurs à activité tyrosine kinase, de protéines d'adhésion cellulaire ainsi que des enzymes membranaires<sup>56</sup>.

#### a. Les protéines de transport

Le rôle physiologique des protéines de transport est de garantir l'accès au cytoplasme à des molécules ou des ions essentiels au développement cellulaire, par-delà la membrane cellulaire qui leur est par nature imperméable<sup>57</sup> (Figure 15).

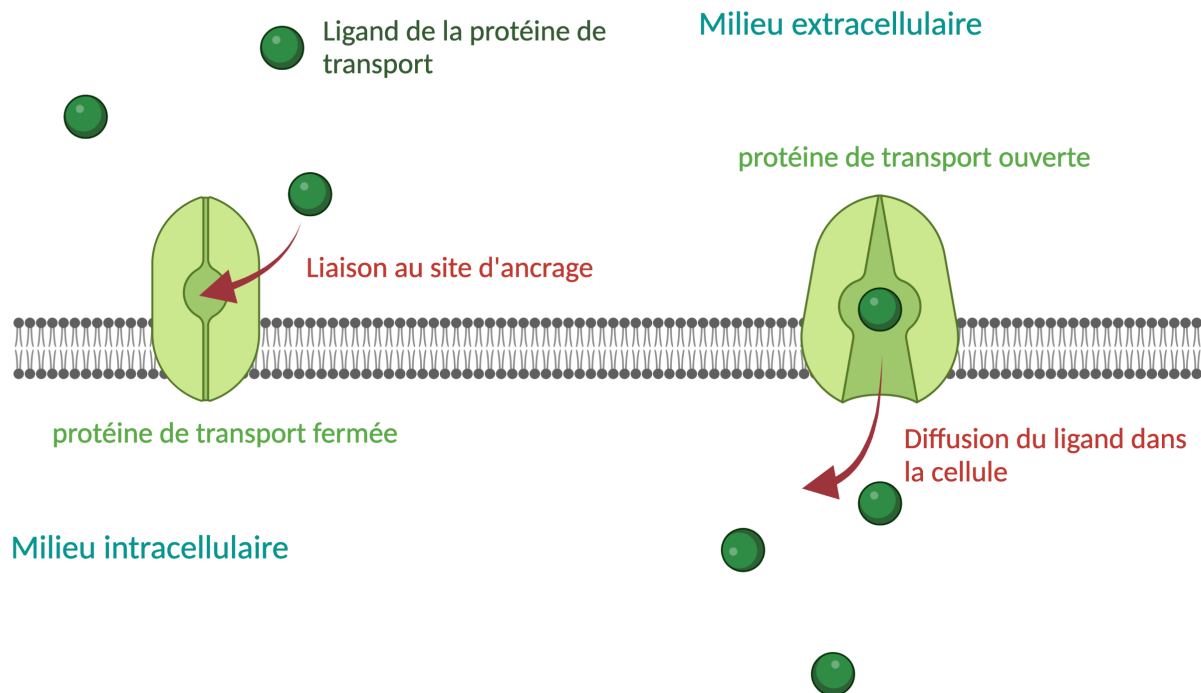


Figure 15 : Représentation schématique de l'action d'une protéine de transport lorsqu'elle entre en liaison avec son ligand. À gauche, la protéine est fermée. La fixation de son ligand va provoquer son ouverture, ce qui a pour conséquence de permettre la diffusion du ligand dans le cytoplasme.

Les cellules tumorales présentent une activité métabolique accrue qui est due à la surexpression de certaines de ces protéines. On peut notamment citer les transporteurs de glucose (protéines GLUT1, GLUT3 et GLUT12) surexprimés par une large variété de tumeurs et qui constituent une cible de choix en imagerie<sup>58</sup>. Ces protéines sont la cible du traceur le plus utilisé en imagerie TEP, le [<sup>18</sup>F]F-FDG qui reste piégé au sein des cellules tumorales une fois phosphorylé dans le cytoplasme. Il est à noter que les transporteurs de glucose sont également surexprimés dans le cadre d'inflammation<sup>59</sup>. En dépit de ces avantages, le [<sup>18</sup>F]F-FDG ne peut être utilisé pour le ciblage de tumeurs primaires ou de métastases cérébrales en raison du fort métabolisme glucidique des cellules du cerveau. Par conséquent, ces protéines ne constituent pas un marqueur spécifique des cellules tumorales, mais demeurent tout de même une cible de choix en imagerie des lésions cancéreuses.

Certains transporteurs d'acides aminés sont également surexprimés dans de nombreuses tumeurs. Ainsi, une large variété de dérivés d'acides aminés radiofluorés (comme la [<sup>18</sup>F]F-fluoroéthyl-L-tyrosine ou la 3-O-méthyl-6-[<sup>18</sup>F]F-fluoro-L-3,4-dihydroxyphenylalanine) ont été évalués pour l'imagerie de différentes tumeurs<sup>60</sup>.

#### b. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Les RCPG sont des protéines transmembranaires composées d'une unique chaîne polypeptidique qui traverse sept fois la membrane cellulaire. Ces récepteurs constituent la plus grande famille de récepteurs transmembranaires et sont impliqués dans une large diversité de mécanismes comme la vue et l'odorat<sup>57</sup>. Cette classe de récepteurs a été nommée ainsi, car le changement de conformation qu'ils subissent lors de leur stimulation permet l'activation des sous-unités des protéines G qui vont se dissocier et pouvoir remplir leurs rôles de signalisation intracellulaire (activation d'une enzyme, ouverture de canaux ioniques...) (Figure 16).

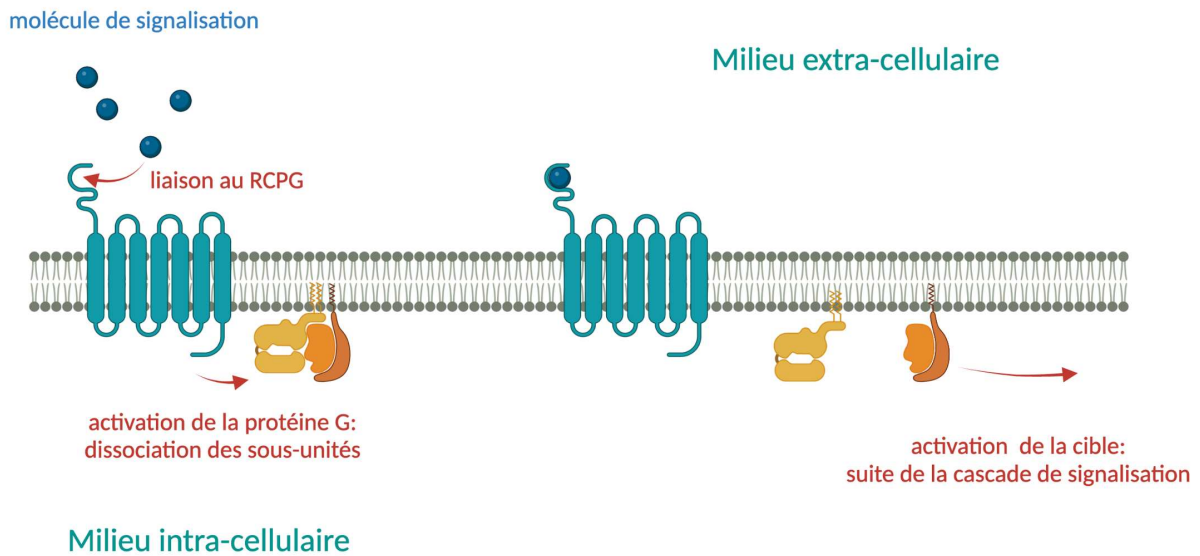


Figure 16 : Représentation schématique de l'activation d'un RCPG par une molécule de signalisation

Une multitude de ces récepteurs sont surexprimés à la surface des cellules tumorales et constituent de ce fait des cibles de choix pour le ciblage des tumeurs. Ces récepteurs sont notamment associés à la prolifération des cellules tumorales, la neoangiogenèse (création de vaisseaux sanguins) et la migration cellulaire ayant pour conséquence l'apparition de métastases<sup>61,62</sup>.

Parmi les RCPG surexprimés par les cellules tumorales, nous pouvons citer CXCR4, qui sera développé dans le chapitre 2, surexprimé par une large gamme de cellules tumorales et qui est impliqué dans la croissance tumorale et le développement des métastases<sup>63</sup>. Le *Gastrin-releasing peptide receptor* (GRPR) est également un RCPG qu'on retrouve surexprimé principalement dans les tumeurs du sein, du pancréas et de la prostate<sup>62</sup> et auquel nous nous intéresserons dans le chapitre 1. On retrouve également les récepteurs à somatostatine (SSTR) surexprimés majoritairement dans les tumeurs neuroendocrines et dont plusieurs ligands sont aujourd'hui commercialisés et utilisés en clinique<sup>64</sup>.

Le ciblage des RCPG présente l'avantage, contrairement aux transporteurs de glucose, d'être très spécifique des cellules tumorales. Cependant, l'expression des RCPG varie d'une pathologie à l'autre, ce qui a pour conséquence qu'aucune de ces cibles n'est commune à l'ensemble des cancers.

### c. Les protéines d'adhésion cellulaire

Les protéines d'adhésion cellulaire (*cell adhesion molecules, CAMs*) sont des protéines impliquées dans l'adhésion intercellulaire et l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. Ces protéines peuvent être divisées en 4 familles : les intégrines, les immunoglobulines, les sélectines et les cadhérines<sup>65</sup>.

Parmi elles, les intégrines, qui constituent une classe de glycoprotéines hétérodimériques notamment impliquées dans l'embryogenèse et la réponse immunitaire<sup>66</sup>, contribuent à la



progression de différents types de tumeurs<sup>67</sup>. L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  constitue une cible de choix du fait de sa surexpression par différents cancers (glioblastome, sein, prostate et pancréas)<sup>68</sup>.

Dans la grande famille des immunoglobulines, on retrouve les molécules d'adhésion cellulaire vasculaire (*vascular cell adhesion molecule*, *VCAM-1*) protégeant notamment les cellules tumorales qui les surexpriment du système immunitaire<sup>69</sup>. VCAM-1 est généralement surexprimée dans le cancer du sein et des poumons où elle facilite la formation des métastases<sup>70</sup>.

#### d. Les enzymes membranaires

Les enzymes surexprimées à la surface des cellules constituent également des cibles potentielles pour l'imagerie des cancers. Il s'agit d'un groupe hétérogène de protéines qui assurent des rôles variés au sein de l'organisme comme l'homéostasie cellulaire ou encore de protéolyse. Une multitude de ces enzymes sont surexprimées à la surface des cellules cancéreuses et en particulier celles impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire<sup>56</sup>.

Une de ces enzymes nous a particulièrement intéressés au cours de cette thèse : la *prostate-specific membrane antigen* (PSMA, autrement appelée *folate hydrolase 1* ou encore *glutamate carboxypeptidase 2*). Cette enzyme a la particularité d'être surexprimée dans les tissus cancéreux de la prostate, où elle est associée à un stade avancé de la maladie<sup>71</sup>. Cette protéine, qui sera plus extensivement développée dans le chapitre 1, constitue une cible de choix pour l'imagerie et la thérapie du cancer de la prostate et a été largement étudiée dans ce cadre<sup>72</sup>.

D'autres enzymes de ce type sont également surexprimées dans le cadre de cancers. C'est par exemple le cas de l'aminopeptidase N (CD13)<sup>73</sup> et de la protéine d'activation des fibroblastes (*FAP- $\alpha$* , Chapitre 2), cibles d'intérêt qui sont surexprimées dans le micro-environnement tumoral<sup>56</sup>.

#### e. Autres récepteurs membranaires

D'autres types de récepteurs membranaires, qui ne sont pas associés aux protéines G, sont également surexprimés par les cellules tumorales. C'est le cas des récepteurs à tyrosine kinase, catégorie à laquelle appartient le récepteur HER2, surexprimé dans 20 à 30 % des cancers du sein et dans 10 à 20 % des cancers de l'estomac<sup>74</sup>.

### B. Les différents vecteurs

Le vecteur est la partie du radiotracer qui a pour rôle de se lier de manière spécifique à la cible choisie. Ainsi un bon vecteur doit répondre à différents critères : avoir une forte affinité pour sa cible, être spécifique de sa cible et être stable en milieu biologique. Enfin, la pharmacocinétique de ce dernier conditionne le choix du radioélément (diagnostique ou thérapeutique) à utiliser. Dans cette introduction, nous avons choisi de classer les vecteurs en différentes classes selon leur nature : les petites molécules, les peptides et peptidomimétiques, les anticorps et leurs fragments, et les nanoparticules.

### a. Les petites molécules

L'utilisation de petites molécules (< 500 Da) pour l'imagerie et la thérapie présente de nombreux avantages. Premièrement, ces molécules disposent généralement d'une forte affinité pour leur cible et, du fait de leur petite taille, elles peuvent être synthétisées à grande échelle dans des laboratoires de chimie organique. Leur taille et leurs propriétés physico-chimiques confèrent également à certaines de ces molécules la capacité de traverser la barrière hématoencéphalique, en faisant de bons candidats pour atteindre des cibles situées dans le cerveau. Ces molécules bénéficient usuellement d'une diffusion rapide dans les tissus cibles et, pour la plupart, d'une clairance rapide des organes non-ciblés et d'une excrétion rapide, ce qui est particulièrement approprié pour l'imagerie.

Leur petite taille est à l'origine cependant d'un inconvénient majeur : la conjugaison de ces molécules à des sondes d'imagerie ou à des agents thérapeutiques mène bien souvent à des pertes conséquentes d'affinité. Bien souvent, il est nécessaire de se tourner vers des marquages *via* un seul atome comme le fluor-18 ou le carbone-11 qui n'induisent pas de modification structurelle majeure<sup>75</sup>.

L'exemple le plus connu de petite molécule utilisée pour l'imagerie nucléaire des tumeurs est le [<sup>18</sup>F]F-FDG, ciblant les transporteurs de glucose qui est extensivement utilisé en imagerie TEP. Parmi ces molécules, on compte également des analogues d'acides aminés comme la [<sup>18</sup>F]F-fluoroéthyltyrosine ou des inhibiteurs de récepteurs comme FAP- $\alpha$  tel que FAPI-01, marqué à l'iode-125 (*Figure 17*).

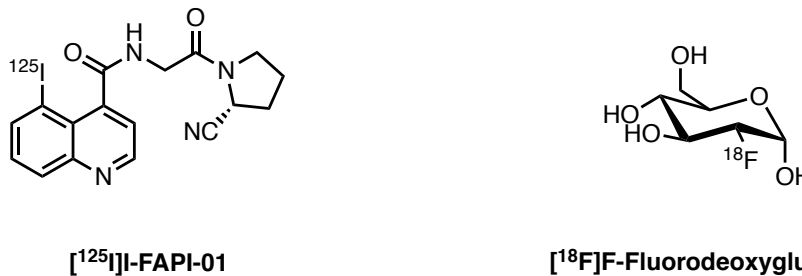


Figure 17 : Structure de [<sup>125</sup>I]I-FAPI-01 et de [<sup>18</sup>F]F-FDG, deux traceurs appartenant à la famille des petites molécules.

### b. Peptides et peptidomimétiques

Tout comme les protéines, les peptides sont des polymères d'acides aminés liés entre eux par des liaisons amides, mais qui diffèrent de ces dernières par leur faible poids moléculaire. Leur définition reste vague mais il est usuellement admis qu'on peut considérer en tant que peptide une séquence d'acides aminés de moins de 50 résidus. Les peptides peuvent être synthétisés de manière endogène dans l'organisme où ils jouent bien souvent un rôle de signalisation en se liant à leur récepteur. Une grande variété de récepteurs, et en particulier de RCPGs, ont pour ligand endogène un ou plusieurs peptides et notamment ceux surexprimés par les cellules tumorales. Parmi eux, on peut citer le GRPR ainsi que les récepteurs à la somatostatine<sup>76</sup>.

Les peptides jouissent de différents avantages quant à leur utilisation pour cibler les cellules tumorales. Ils disposent d'une très forte affinité pour leur cible et leur petite taille leur assure une bonne pénétration des tissus ainsi qu'une circulation rapide dans l'organisme jusqu'à leur

cible. En plus d'être facilement accessibles par synthèse peptidique sur phase solide, les peptides sont facilement conjuguables à une sonde d'imagerie ou à un agent thérapeutique.

En revanche, la plupart des peptides, notamment les peptides de régulation, souffrent d'une très forte instabilité *in vivo* car ils sont rapidement métabolisés par différents types d'enzymes. Il est possible de contourner ce problème en modifiant la séquence peptidique afin de ralentir leur digestion<sup>77</sup>. On peut citer quatre approches communément utilisées pour augmenter la stabilité des peptides en milieu biologique :

- L'incorporation d'acides aminés non-naturels au sein de la séquence au niveau des liaisons peptidiques identifiées comme sensibles, en substituant un acide aminé naturel de série L par son équivalent de série D ou encore en le substituant par un acide aminé non protéinogène.
- La cyclisation du peptide
- La modification des extrémités du peptide par alkylation et/ou par acylation
- La modification de la nature des liaisons peptidiques : remplacement par des liens urées, déplacement des chaînes latérales du carbone en  $\alpha$  sur l'azote de l'amide (peptoïdes), N-alkylation des amides ou encore remplacement par un triazole<sup>78</sup>.

On appelle peptidomimétique toute molécule mimant l'action d'un peptide, mais qui n'en est pas un au sens chimique du terme<sup>77</sup>. On peut notamment prendre pour exemple le ligand lysine-urée-acide glutamique (KuE), inhibiteur de la PSMA<sup>79</sup> composé de deux acides aminés liés l'un à l'autre par une fonction urée. Les peptides et peptidomimétiques sont aujourd'hui largement utilisés en tant que vecteurs pour l'imagerie et la thérapie d'une multitude de pathologies. Des exemples de molécules utilisées dans cette optique sont donnés dans la *Figure 18*.

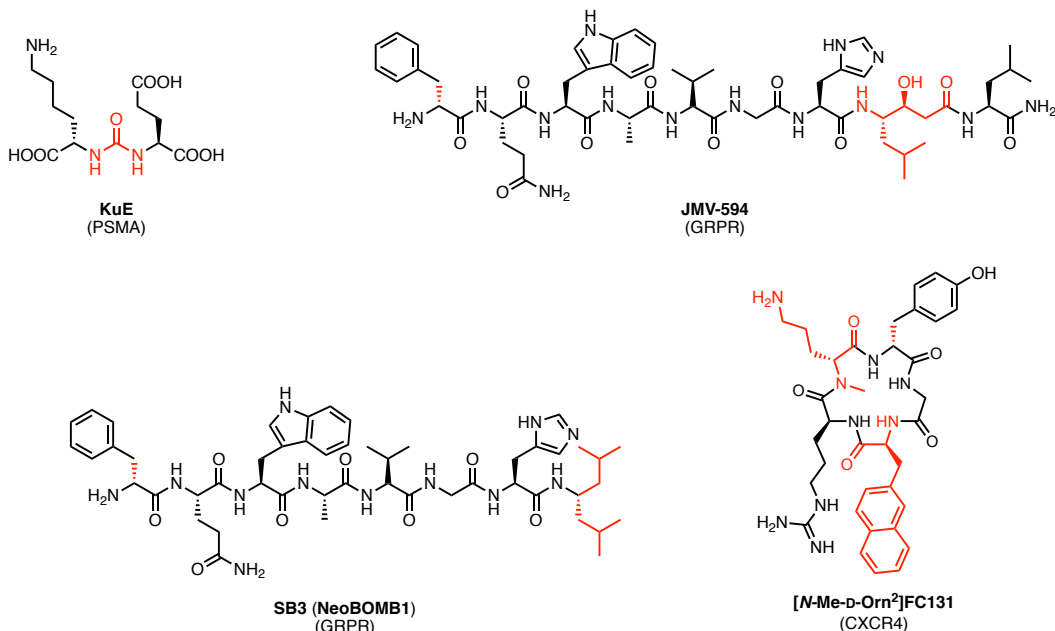


Figure 18 : Structure de quatre vecteurs peptidiques/peptidomimétiques utilisés en imagerie et thérapie du cancer. En rouge sont représentées les modifications structurales améliorant leur stabilité métabolique. Entre parenthèses, leurs cibles

### c. Anticorps et leurs fragments

#### *Anticorps*

Les anticorps, ou immunoglobulines G (IgG), représentent une classe de protéines faisant partie de l'arsenal immunitaire des vertébrés. Ils interviennent dans la réponse immunitaire adaptative. Leur rôle premier est de reconnaître et neutraliser les agents pathogènes qui pénètrent dans l'organisme. Leur structure est formée, chez l'homme, de deux chaînes légères et de deux chaînes lourdes reliées entre elles au moyen de ponts disulfures (*Figure 19*). Chacune de ces chaînes est composée d'un domaine constant et d'un domaine variable. Les domaines variables (ou paratopes) ont pour rôle de se lier à la cible appelée antigène (ou épitope)<sup>80</sup>.

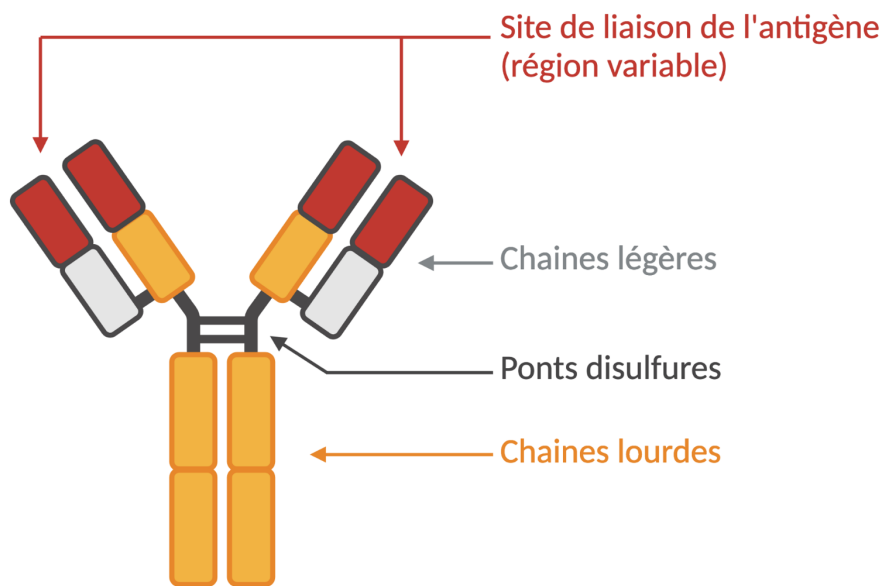


Figure 19 : Structure générale d'un anticorps de type IgG

Les anticorps jouissent d'une spécificité exceptionnelle pour leur cible, ce qui constitue un avantage de taille pour leur utilisation en tant que vecteur d'agent d'imagerie ou de thérapie. En raison de leur taille importante (> 150 kDa) les anticorps souffrent d'une circulation lente au sein de l'organisme, avec une demi-vie d'élimination qui peut aller jusqu'à plusieurs semaines<sup>81</sup>, imposant aux radiopharmaciens l'utilisation d'isotopes possédant une longue demi-vie comme l'indium-111 ou le zirconium-89 et limitant l'applicabilité générale de la radioimmunothérapie (problématique qui sera abordée dans le chapitre 4).

Outre leur spécificité, le haut poids moléculaire des anticorps et la présence de chaînes constantes non impliquées dans la liaison avec l'antigène permettent l'incorporation de la sonde d'imagerie sans modification de l'affinité pour la cible. L'utilisation d'anticorps présente cependant quelques limitations<sup>82</sup> :

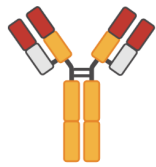

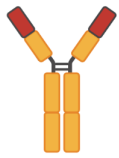



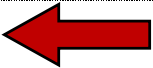
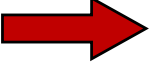

- Leur demi-vie élevée au sein de l'organisme peut engendrer des problèmes de toxicité, en particulier lorsque l'anticorps est conjugué à un composé cytotoxique.
- Les premières générations d'anticorps murins généraient une réaction immunitaire chez le patient. Il est par conséquent nécessaire d'utiliser des composés humanisés ou humains.

- En raison de la taille importante des anticorps (10 nm), certains tissus et membranes biologiques leur sont imperméables, diminuant ainsi leur chance d'accéder à leur cible.
- Leur coût de production selon les bonnes pratiques de production (cGMP) nécessaires à une mise sur le marché est très élevé.
- Les anticorps sont des molécules sensibles à la température qui nécessitent des conditions de marquage douces.
- Le marquage aléatoire avec une sonde ou une drogue est peu reproductible ce qui oblige à introduire des sites pour le marquage spécifique par ingénierie génétique ou à réaliser des marquage « site-spécifique » par utilisation d'enzymes. Cette dernière opération est néanmoins coûteuse et encore peu répandue.

Malgré ces quelques limitations, les anticorps demeurent très étudiés pour l'imagerie et la thérapie des tumeurs<sup>83</sup>. Parmi eux, [<sup>131</sup>I]-tositumomab (Bexxar®) et [<sup>90</sup>Y]Y-ibritymomab (Zevalin®) ont reçu l'approbation de la FDA et de l'EMA en tant qu'agent de radiothérapie vectorisée<sup>84</sup>. On peut également citer le trastuzumab, anti-HER2 (récepteur à tyrosine-kinase surexprimé dans 20% des cancers du sein), approuvé par la FDA et utilisé depuis les années 1980 pour la thérapie sous le nom d'Herceptin®. Le cetuximab (Erbix®), un anticorps anti-EGFR a également reçu l'approbation de la FDA en 2004 pour être utilisé pour le traitement de cancers colorectaux métastatiques. Cependant, aucun de ces deux anticorps n'a reçu d'approbation pour leur utilisation au sein d'un agent d'imagerie nucléaire ou de radiothérapie, mais sont étudiés en clinique dans cette optique.

### *Fragments d'anticorps*

Dans l'optique de développer des agents de vectorisation tout aussi spécifiques que les anticorps, mais sans les désavantages pharmacocinétiques dus à leur taille importante, les chercheurs se sont intéressés à l'étude des fragments d'anticorps (Tableau 3)<sup>85</sup>.

Nom	Anticorps entier (IgG)	F(ab) <sub>2</sub>	Minibody	Fab/Diabody	Nanobody	Affibody
Schéma de structure						
Poids moléculaire (kDa)	150	110	75	50-55	12	6
Voie d'excrétion	Hépatique	Hépatique + rénal	Hépatique	Rénal	Rénal	Rénal
Accumulation tumorale		<b>MAXIMALE</b>			<b>MINIMALE</b>	
Vitesse d'excrétion		<b>LENTE</b>			<b>RAPIDE</b>	
Pénétration tumorale		<b>MINIMALE</b>			<b>MAXIMALE</b>	

*Tableau 3 : Les différents types de fragments d'anticorps, leur structure schématique, leur poids moléculaire moyen et leurs propriétés métaboliques (adapté de la littérature<sup>85</sup>).*

Parmi les fragments d'anticorps, Charavarty *et al.* ont décrit en 2014 les *nanobodies* comme des *magic bullets* pour l'imagerie moléculaire en raison de leurs propriétés prometteuses qui combinent l'extraordinaire affinité des anticorps pour leur cible avec la clairance rapide et la forte pénétration dont bénéficient les vecteurs de faible poids moléculaire<sup>86</sup>.

Les *nanobodies* sont constitués du fragment variable d'un anticorps de *camelidae*, dont la particularité est qu'ils ne contiennent pas de chaîne légère (on parle de *camelids heavy-chain only antibodies*). Ils bénéficient notamment d'une bonne stabilité thermique, d'une accumulation rapide dans les tissus ciblés, d'une clairance rapide des vaisseaux sanguins et présentent une faible immunogénicité<sup>86</sup>. Cependant, l'excrétion rénale rapide de ces fragments d'anticorps représente également une limitation quant à leur utilisation au sein d'agents de radiothérapie vectorisée en limitant l'accumulation dans les tissus ciblés<sup>87</sup>.

Plusieurs *nanobodies* ont été évalués en préclinique pour l'imagerie de différents types de pathologies. Par exemple Broisat *et al.* ont proposé un *nanobody* marqué au technécium-99 métastable pour l'imagerie de la protéine d'adhésion cellulaire VCAM-1<sup>88</sup>. Certains *nanobodies* ciblant les récepteurs à tyrosine-kinase HER-2 sont quant à eux en cours d'évaluation en Phase I et II d'essais cliniques comme agents d'imagerie et de thérapie<sup>89,90</sup>.

### *Nanoparticules*

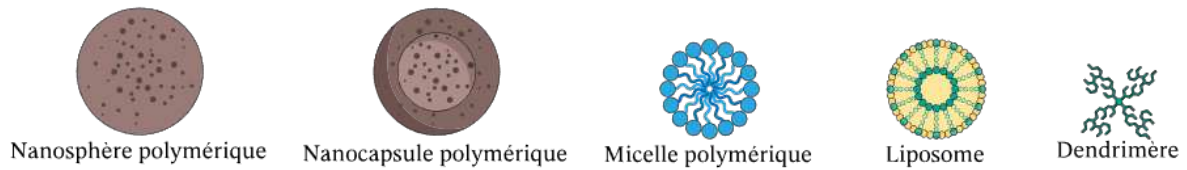
Contrairement aux petites molécules, peptides, peptidomimétiques et *nanobodies* précédemment décrits, les nanoparticules bénéficient de deux mécanismes d'accumulation au sein des tumeurs solides<sup>91</sup> :

- Une accumulation active, engendrée par la fonctionnalisation de la particule avec un des vecteurs précédemment décrits.
- Une accumulation passive, dont peuvent également bénéficier les anticorps entiers, qui résulte de l'effet *EPR* (*Enhanced permeability and retention*).

L'effet *EPR* concerne toute entité moléculaire dont la taille excède les 4 nm (ou 30 kDa), ce qui inclut donc les grosses protéines comme l'albumine et les anticorps, mais également les structures nanoparticulaires. L'accumulation tumorale par effet *EPR* est usuellement attribuée à la perméabilité des vaisseaux sanguins avoisinant les tumeurs. Les particules de taille conséquente sont capables de pénétrer les tissus tumoraux, mais s'y retrouvent bloquées en raison d'une carence en drainage lymphatique<sup>92</sup>.

On peut citer deux classes de nanoparticules : les nanoparticules inorganiques (nanoparticules d'or, d'oxyde de fer...) et les nanoparticules organiques (micelles, liposomes). Quelques exemples de ces particules sont représentés sur la *Figure 20*.

## Organiques



## Inorganiques

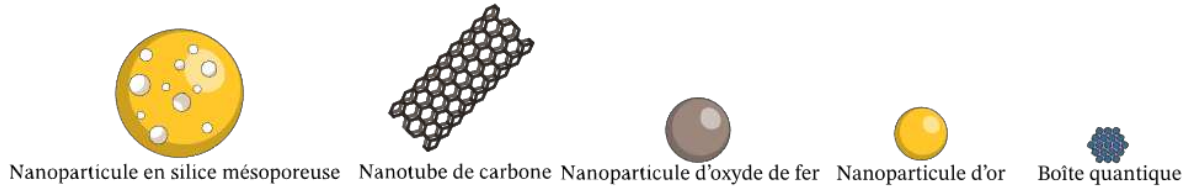


Figure 20 : Exemple de nanoparticules organiques et inorganiques (adapté d'un site internet<sup>93</sup>)

L'utilisation de nanoparticules en tant qu'agents d'imagerie présente différents avantages :

- Selon leur taille, elles peuvent bénéficier d'accumulation passive au sein des tumeurs par l'effet *EPR*.
- Selon leur composition, elles peuvent agir comme agent de contraste en IRM ou en radiographie (nanoparticules de gadolinium, d'oxyde de fer, micelles...) <sup>94,95</sup>.
- Il est possible de les fonctionnaliser avec des petites molécules ou des protéines afin de combiner ciblage passif et ciblage actif <sup>96</sup>.
- Il est possible de les fonctionnaliser avec des sondes d'imagerie et de les utiliser comme agents d'imagerie multimodale (émetteur TEP/TEMP, fluorophore) <sup>97,98</sup>.

Les nanoparticules souffrent cependant de certains désavantages : il est en effet difficile de les caractériser correctement en raison de leur inhomogénéité et de leur taille importante. Enfin, le plus grand problème des nanoparticules est souvent leur toxicité <sup>99</sup>.

## II. Agents d'imagerie et de thérapie hétérobivalents

Dans cette seconde partie de l'introduction, l'accent sera mis sur le concept d'hétérobivalence. Le terme « hétérobivalent » est entendu ici comme un agent d'imagerie (ou de thérapie) fonctionnalisé avec deux vecteurs différents. Un ligand hétérobivalent est donc un ligand ayant deux cibles distinctes. On parle aussi de ligands bispécifiques ou d'hétérodimères.

### 1. Introduction au concept d'hétérobivalence

#### A. Contexte

##### a. Hétérogénéité tumorale

Afin de comprendre l'hétérogénéité tumorale, il est nécessaire d'appréhender le développement des tumeurs comme un processus de sélection Darwinien. Au fil de leurs réplifications les cellules tumorales, qui sont caractérisées par une forte instabilité génétique subissent différentes mutations. Ces mutations peuvent se traduire par diverses variations phénotypiques : surexpression d'un nouveau récepteur, morphologie cellulaire... Les pressions environnementales exercées sur les différents clones, à l'instar de celles subies par les différentes espèces animales, constituent une force de sélection qui va favoriser la prolifération d'un ou plusieurs de ces individus (Figure 21)<sup>100</sup>.

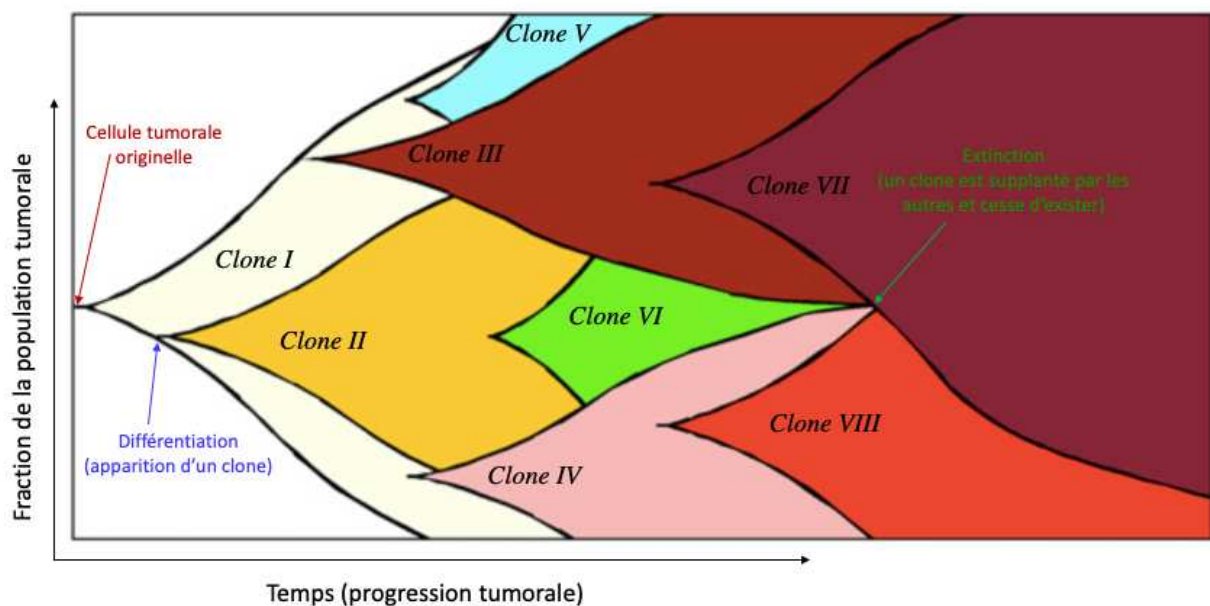


Figure 21 : Schéma représentatif de la variation phénotypique au sein d'une tumeur en fonction du temps. Ce modèle considère que la tumeur démarre avec une unique cellule tumorale originelle. La tumeur se différencie au fur et à mesure des réplifications (adapté de la littérature<sup>100</sup>).

Ce premier mécanisme explique la variation du phénotype des cellules tumorales au cours du temps. On retrouve un exemple concret de cette variation temporelle dans le cancer de la prostate, où le RCPG GRPR est surexprimé dans les stades précoces de la maladie<sup>101</sup> alors que l'expression de la PSMA témoigne d'un stade avancé de la maladie<sup>102</sup>.

Cette explication darwinienne de l'hétérogénéité tumorale permet également de justifier les variations phénotypiques dans l'espace, par exemple entre une lésion primaire et ses métastases. L'environnement d'une cellule localisée au niveau de la tumeur primaire étant



différent de celui d'une cellule métastatique, elles reçoivent une pression de sélection différente qui peut favoriser des clones différents.

Cependant, les variations spatiales de phénotypes tumoraux peuvent être expliquées par un autre mécanisme : la plasticité phénotypique<sup>100</sup>. La plasticité phénotypique désigne tout un éventail de modifications, ne dépendant pas d'un facteur génétique, présentées par les cellules tumorales en réponse à des stimulations extérieures.

La conséquence la plus marquante de ces deux phénomènes, en imagerie et en thérapie ciblée, est une distribution hétérogène des biomarqueurs tumoraux à la fois dans l'espace (intra- et intertumoral) et dans le temps (progression de la maladie). Pour pallier ce problème, trois approches sont possibles<sup>103</sup> :

- L'administration concomitante de différents traceurs : approche dite *cocktail*
- L'administration séquentielle de différents traceurs
- L'administration de traceurs multispécifiques

Bien qu'elle soit utilisée depuis plusieurs décennies en thérapie<sup>104,105</sup>, l'approche *cocktail* n'est pas une méthode couramment exploitée en imagerie. En plus de représenter un défi en matière de logistique, la co-injection de ligands dont les propriétés pharmacocinétiques sont différentes constitue la principale limitation de cette approche.

L'administration séquentielle de différents traceurs constitue déjà une approche plus crédible pour l'imagerie moléculaire. Cependant, la nécessité d'effectuer une série d'examen dans une étroite fenêtre temporelle pose le problème de la toxicité inhérente aux modalités d'imagerie (en particulier les modalités d'imagerie nucléaire). Vient également l'aspect financier : l'utilisation de différents traceurs et la nécessité de subir plusieurs examens rendent l'opération très coûteuse.

Sans surprise, c'est l'utilisation d'agents d'imagerie ou de thérapie multispécifiques qui semble être l'approche la plus efficace pour pallier le problème de l'hétérogénéité tumorale. L'utilisation de ce type de ligands permettrait une distribution homogène de l'agent d'imagerie ou de thérapie au sein de la (ou des) tumeur(s). En raison de la présence de plusieurs pharmacophores, les agents multivalents ont en général un poids moléculaire plus élevé, leur conférant un temps de circulation plus long et potentiellement une meilleure stabilité métabolique en comparaison avec leurs analogues monovalents. Enfin, ces ligands possèdent un avantage de taille en termes de réglementation puisqu'une seule molécule doit être approuvée par les autorités de régulation<sup>103</sup>. Finalement, leur utilisation implique un seul radiomarquage, une seule administration et une seule venue pour le patient, ce qui est un autre avantage par rapport aux approches séquentielles.

Quelques exemples de récepteurs coexprimés par différents types de cancers sont donnés dans le *Tableau 4*.

Type de cancer	Biomarqueurs surexprimés	Incidence
Intestins	Sst <sub>1,2,3,5</sub>	> 90 %
	CCK2	60 %
	GIP	86 %
	GLP-1	30 %
	Glucagon	35 %
Insulinomes	GLP-1	> 90 %
	GIP	100 %
	Glucagon	> 90 %
	Sst <sub>1,2,5</sub>	70 %
Cancer médullaire de la thyroïde	CCK2	> 90 %
	GIP	89 %
	Sst <sub>2</sub>	100 %
Prostate	GRPR	> 90 %
	PSMA	> 90 %
Sein	GPPR	65-75 %
	NPY	66-85 %
	Sst <sub>2</sub>	> 90 %
Sarcome d'Ewing	NT1	64 %
	NPY1	84 %
Glioblastomes	NK1	100 %
	NPY2	83 %

Tableau 4 : Exemple de biomarqueurs co-exprimés par certains cancers (tiré de la littérature<sup>103</sup>).

**b. Surexpression concomitante de certains biomarqueurs**

Dans une étude de grande ampleur publiée en 2003, Reubi et Waser ont évalué la surexpression de 13 récepteurs d'intérêt en oncologie sur des échantillons de tissus provenant de plus de 100 tumeurs neuroendocrines différentes, mesurant leur incidence et leur densité<sup>106</sup>. Dans la majorité des cas étudiés, 2 à 4 récepteurs différents étaient surexprimés dans la majorité des tissus. Par exemple, la quasi-totalité des tissus de cancers iléaux étudiés surexprimaient VPAC<sub>1</sub> et sst<sub>2</sub>, la majeure partie des insulinomes étudiés, quant à eux, surexprimaient VPAC<sub>1</sub>, CCK<sub>2</sub>, sst<sub>2</sub> et le récepteur à GLP-1 (*Tableau 5*).

Cancer Récepteurs	Iléaux	Insulinomes	Gastrinomes	Glucagonomes	Vipomes	Bronchiaux
VPAC <sub>1</sub>	26/27	26/27	6/10	3/3	4/4	26/28
VPAC <sub>2</sub>	0/27	0/26	0/10	0/3	0/4	0/27
Sst <sub>1</sub>	14/27	16/26	1/10	2/3	1/4	20/28
Sst <sub>2</sub>	26/27	18/26	10/10	2/3	4/4	19/28
Sst <sub>3</sub>	4/27	9/26	2/10	1/3	1/4	1/28
Sst <sub>4</sub>	1/27	1/26	0/10	0/3	0/4	0/28
Sst <sub>5</sub>	13/27	5/25	3/9	0/3	1/4	6/26
NMBR	11/27	0/27	0/10	0/3	0/4	1/29
GRPR	0/27	3/27	7/10	0/3	2/4	1/29
BB <sub>3</sub>	0/27	2/27	2/10	3/3	2/4	10/29
CCK <sub>1</sub>	11/27	0/26	5/11	0/3	1/4	4/29
CCK <sub>2</sub>	16/27	25/26	0/11	2/3	4/4	18/29
GLP-1R	8/27	25/27	10/10	2/4	1/4	11/29

*Tableau 5 : Incidence des récepteurs surexprimés par 6 catégories de tumeurs neuroendocrines différentes. Les cases du tableau remplies en vert représentent les récepteurs largement exprimés par la catégorie de tumeurs en question (adapté de la littérature<sup>106</sup>).*

Il ressort de ces données que le récepteur à somatostatine sst<sub>2</sub> est majoritairement surexprimé dans les tumeurs neuroendocrines, cependant on remarque également que le récepteur VPAC<sub>1</sub> constitue une cible de choix pour ce type de pathologie, bien que sa densité d'expression soit inférieure à celle de sst<sub>2</sub>.

Cette étude nous apporte également des informations spatiales à propos de la distribution de certains récepteurs. Ainsi, il a été démontré la surexpression concomitante de CCK<sub>2</sub>, sst<sub>2</sub>, GLP-1-R et VPAC<sub>1</sub> sur certains tissus d'insulinomes (*Figure 22*). La même étude sur des tissus de gastrinomes a quant à elle démontré la co-expression des récepteurs GRPR, sst<sub>2</sub> et CCK<sub>1</sub>.

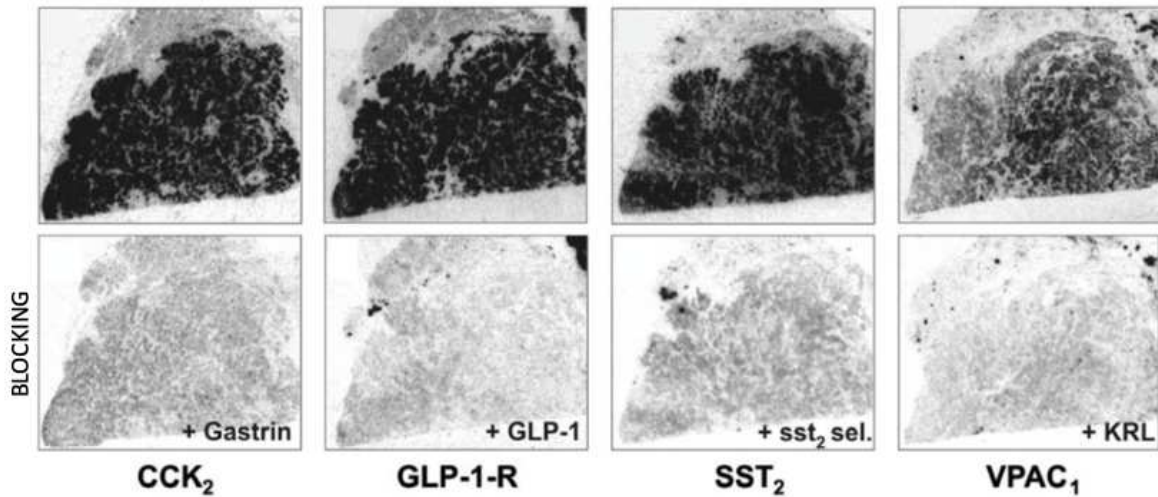


Figure 22 : Autoradiogramme d'un même tissu d'insulinome montrant la liaison de <sup>125</sup>I-CCK, de <sup>125</sup>I-GLP-1, de <sup>125</sup>I-LTT-SS-28 (sst<sub>2</sub>) et de <sup>125</sup>I-VIP (VPAC<sub>1</sub>) (ligne du haut) comparé aux images obtenues grâce à l'expérience de blocking (ligne du bas) (adapté de la littérature<sup>106</sup>).

La surexpression concomitante de biomarqueurs par les tissus tumoraux constitue un argument supplémentaire pour l'utilisation d'agents d'imagerie et de thérapie multivalents. Dans la prochaine partie de cette introduction, l'accent sera mis sur les ligands hétérobivalents et sur leurs propriétés bénéfiques pour l'imagerie et la thérapie des tumeurs.

### c. Agents d'imagerie et de thérapie hétérobivalents

#### Définition

Un agent d'imagerie ou de thérapie hétérobivalent est composé de trois entités reliées entre elles au moyen d'espacesurs (Figure 23) :

- Un premier pharmacophore, spécifique d'un biomarqueur surexprimé dans certaines tumeurs,
- Un second pharmacophore, spécifique d'un autre biomarqueur également surexprimé dans le même type de tumeur,
- Une sonde d'imagerie (ou agent thérapeutique) ayant la capacité d'émettre un signal détectable ou présentant une activité cytotoxique.

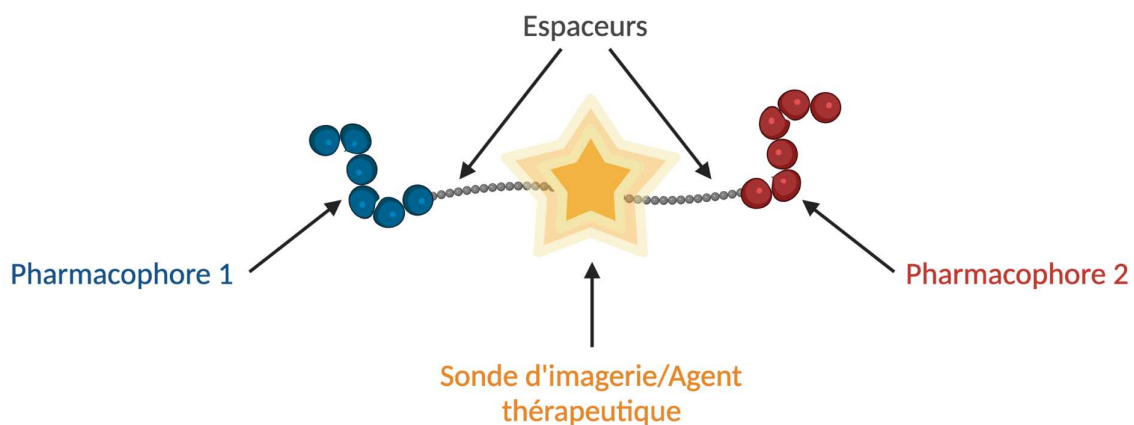


Figure 23 : Structure schématique représentant un ligand hétérobivalent.

### *Propriétés attendues pour ce type de molécules*

L'interaction d'un ligand hétérobivalent en présence de ses deux cibles a été modélisée par Vauquelin en 2013<sup>107,108</sup>. D'après ce modèle, deux mécanismes confèreraient à ces ligands des propriétés qui présenteraient un intérêt majeur pour l'imagerie moléculaire et la thérapie.

Dans un premier temps, la liaison du premier pharmacophore avec sa cible devrait avoir pour conséquence l'augmentation locale de la concentration en deuxième pharmacophore aux alentours de son récepteur. De ce fait, le second ligand bénéficierait d'une plus grande chance d'atteindre sa cible se traduisant par une amélioration de son affinité.

Deuxièmement, si un ligand hétérobivalent engagé dans une interaction monovalente avec son récepteur venait à se dissocier, la proximité du second récepteur ciblé aurait pour conséquence l'augmentation de la probabilité pour le second ligand de s'y lier. Macroscopiquement, cela se traduirait par une augmentation du temps de résidence de ce type de ligand à la surface des cellules tumorales co-exprimant les deux récepteurs ciblés.

Pour finir, si les deux récepteurs sont suffisamment proches l'un de l'autre, il est possible que les deux pharmacophores puissent se lier simultanément à leur récepteur (*Figure 24*) ce qui diminuerait ainsi la probabilité de dissociation concomitante des deux pharmacophores de leur récepteur. La conséquence macroscopique de ceci serait également un temps de résidence augmenté à la surface des cellules tumorales<sup>107,108</sup>.

Il est intéressant de noter que ce type de phénomène se retrouve et a été décrit pour les anticorps hétérobivalents sous leur forme complète (*bispecific antibodies*) ou tronquée (*diabodys*). Étant donnée la relative complexité des phénomènes menant à des effets coopératifs entre ligands au sein d'une même molécule, les spécialistes des anticorps ont proposé le terme d'avidité plutôt que d'affinité<sup>109,110</sup>.

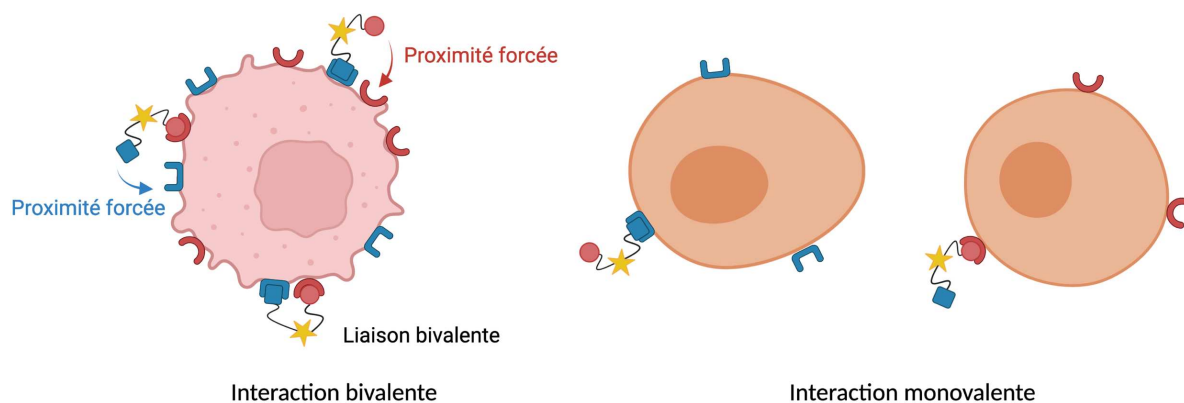


Figure 24 : Schéma représentatif de l'interaction bivalente attendue lors de l'utilisation de ligands hétérobivalents sur des cellules surexprimant les deux récepteurs ciblés (gauche) et représentation de l'interaction monovalente.

Bien que surexprimés par les cellules tumorales, les biomarqueurs ciblés en imagerie et en thérapie ont des rôles physiologiques et sont par conséquent exprimés par un certain nombre de cellules saines. L'utilisation de traceurs monovalents est bien souvent à l'origine d'accumulation spécifique dans les tissus sains. On peut ici citer l'exemple des traceurs ciblant

la PSMA qui s'accumulent de manière spécifique dans les reins, les glandes salivaires et les glandes lacrimales<sup>111</sup>.

En imagerie, l'utilisation de ligands hétérobivalents permettrait d'effectuer des acquisitions d'images tardives. Ainsi le signal spécifique dans les tissus sains, dû à des interactions monovalentes, serait fortement diminué, en raison de la clairance rapide des ligands engagés dans de telles liaisons, tandis que le signal tumoral serait toujours élevé grâce à la forte rétention tumorale due à des interactions bivalentes.

D'un point de vue thérapeutique, l'utilisation de drogues hétérobivalentes présente un intérêt double. Le premier est qu'en raison de la rétention tumorale accrue, le temps d'exposition des cellules tumorales au composé cytotoxique serait plus important et, par conséquent, les thérapies plus efficaces. Enfin, dans le cadre de la radiothérapie interne vectorisée, la sensibilité des tissus sains subissant une accumulation spécifique du radiopharmaceutique constitue bien souvent une limitation de taille<sup>111</sup>. L'emploi d'un agent thérapeutique hétérobivalent permettrait d'administrer des activités spécifiques plus faibles tout en gardant la même efficacité en comparaison à une radiothérapie ciblée à l'aide d'un ligand monovalent.

L'hétérogénéité tumorale, l'expression concomitante de différents biomarqueurs par les cellules tumorales, ainsi que les propriétés pharmacologiques envisagées pour les ligands hétérobivalents sont autant d'arguments soulignant la nécessité de développer ce nouveau type de ligands.

## **B. Les premiers ligands multivalents**

### **a. Premiers pas : les ligands homobivalents**

C'est avec l'objectif premier d'évaluer la distance entre les récepteurs aux opiacés et de créer des ligands spécifiques de certains sous-types de ces récepteurs que l'équipe de Philippe S. Portoghese a synthétisé les premiers ligands multivalents<sup>112</sup>.

Ces derniers étaient des ligands homobivalents au sein desquels deux pharmacophores identiques, antagonistes des récepteurs à opioïdes, étaient séparés à l'aide d'espaceurs de type PEG de différentes longueurs. Dans cette étude, il a été démontré que les ligands homobivalents bénéficiaient d'une affinité accrue pour les récepteurs ainsi que d'un potentiel antagoniste plus important.

Ces travaux ont également mis en lumière l'importance de la longueur de l'espaceur pour bénéficier de ces gains : l'utilisation d'espaceurs trop courts ne permet pas d'obtenir de gain en termes d'affinité ou de potentiel antagoniste tandis que l'utilisation d'un espaceur trop long limite ces gains en augmentant l'entropie nécessaire pour la liaison du second pharmacophore à son récepteur.

L'équipe de Portoghese a publié une étude dans laquelle ont été développés plusieurs ligands homobivalents : dans un premier cas réunissant deux agonistes et dans l'autre deux antagonistes des récepteurs opioïdes séparés par différentes longueurs d'espaceurs polyglycine (*Figure 25*). Dans un premier temps, ces études ont montré que le potentiel agoniste des ligands homobivalents augmentait avec la longueur des espaceurs pour atteindre

un maximal lorsque les deux vecteurs étaient séparés par deux résidus glycines. Cette observation n'a pas été effectuée avec les homobivalents antagonistes, qui présentent une affinité maximale lorsque l'espaceur ne contient aucun résidu glycine. Ces observations ont amené Portoghese et son équipe à formuler l'hypothèse selon laquelle les agonistes et antagonistes des récepteurs opioïdes ne reconnaissent pas les mêmes sites de liaison<sup>113</sup>.

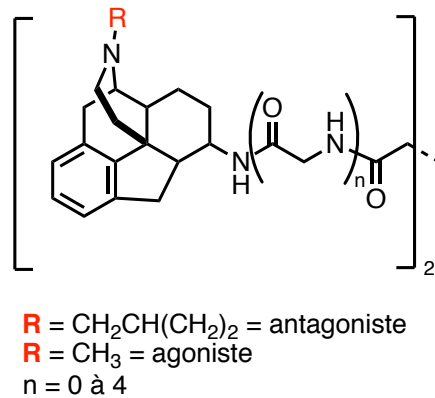


Figure 25 : Exemple de ligands homobivalents antagonistes et agonistes développé par Portoghese et al. pour étudier les propriétés des sous-récepteurs opioïdes<sup>113,114</sup>.

En plus de confirmer l'hypothèse de Portoghese, d'autres études parues quelques années plus tard ont montré que des courtes distances entre les vecteurs favorise la liaison aux sous-récepteurs  $\kappa$ <sup>114,115</sup>.

### b. Les premiers ligands hétérobivalents

Dans la continuité de leurs travaux, l'équipe de Portoghese est à l'origine des premiers ligands hétérobivalents qu'ils ont nommés « ligands bivalents hybrides ». Ces ligands étaient constitués de deux pharmacophores distincts : Le premier est un dérivé d'enképhaline, un pentapeptide endogène spécifique des récepteurs morphiniques de sous-type  $\delta$ , et un dérivé d'oxymorphamine, un opiacé plus affiné des récepteurs de sous-type  $\mu$  (Figure 26)<sup>116</sup>. L'objectif d'une telle combinaison était de développer un médicament hybride présentant de meilleures propriétés analgésiques que ses équivalents monovalents.

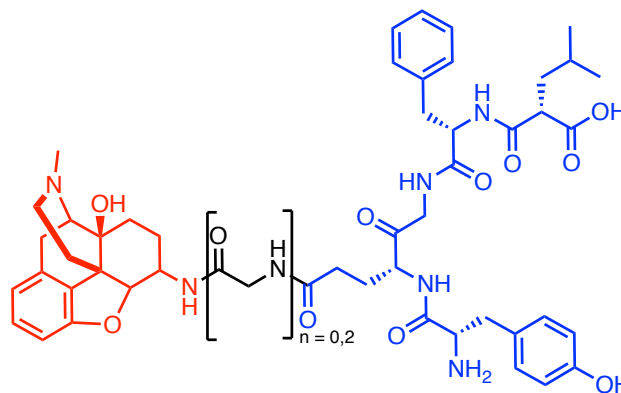


Figure 26 : Structure générale des hétérobivalents développés par Portoghese et al. En bleu, le dérivé d'enképhaline et en rouge le dérivé d'oxymorphamine.

Dans les pas de Portugese, d'autres équipes se sont mises à développer des ligands hétérobivalents ciblant différents récepteurs comme les récepteurs à cannabinoïdes<sup>117</sup> ou encore des hétérodimères de neurotransmetteurs<sup>118</sup>.

Plus tard, les travaux de Portugese ont inspiré les équipes de Hruby et Gillies, qui ont proposé la synthèse d'une série de ligands bispécifiques ciblant  $\alpha$ -MSH et CCK-8. Ces travaux ont notamment prouvé l'importance de la distance entre les deux vecteurs afin d'obtenir un gain en termes d'affinité venant d'interactions bivalentes. Les ligands pour lesquels la distance entre les deux vecteurs a été optimisée présentent des affinités 20 à 24 fois plus élevées pour chacun des récepteurs<sup>119</sup>. L'importance d'optimiser la distance entre les deux vecteurs a également été démontrée par l'équipe de Tamamura à l'aide de ligands homomultivalents ciblant CXCR4<sup>120</sup>.

## 2. Ligands hétérobivalents pour l'imagerie et la thérapie

Depuis le milieu des années 2000, l'idée d'utiliser des ligands hétérobivalents pour améliorer l'efficacité des agents d'imagerie moléculaire et de thérapie a émergé avec le développement de traceurs hétérobivalents ciblant GRPR et l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ <sup>121</sup>.

### A. Ligands hétérobivalents ciblant GRPR et $\alpha_v\beta_3$

Les hétérodimères ayant pour cibles GRPR et  $\alpha_v\beta_3$  furent les premiers à être développés au milieu des années 2000. GRPR est un RCPG surexprimé dans une grande variété de cancers parmi lesquels le cancer de la prostate, des poumons, du sein, du pancréas, mais également dans les neuroblastomes et glioblastomes<sup>122</sup>. L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est pour sa part une protéine d'adhésion cellulaire, marqueur de la néoangiogenèse<sup>123</sup>.

#### a. Agents d'imagerie hétérobivalents ciblant GRPR et $\alpha_v\beta_3$

##### *Ligands marqués au fluor-18*

C'est aux États-Unis, au sein de l'université de Stanford, qu'ont été développés les premiers radiotraceurs ciblant simultanément ces deux récepteurs. La molécule proposée par Li *et al.* rassemble la bombésine<sup>7-14</sup>, agoniste de GRPR, avec le cyclopentapeptide RGD, ciblant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ <sup>124</sup>. Les deux vecteurs sont reliés au moyen d'un espaceur acide glutamique, et l'ensemble est marqué au fluor-18 (*Figure 27*).



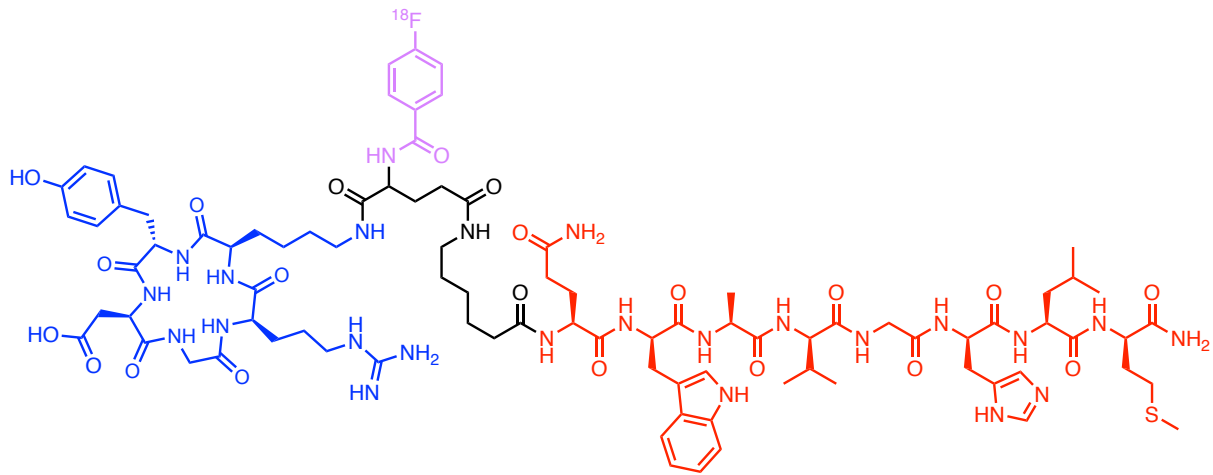


Figure 27 : Structure de  $[^{18}\text{F}]\text{F-FB-BBN-RGD}$  proposé par Li et al.<sup>124</sup>

L'affinité de  $[^{18}\text{F}]\text{F-FB-BBN-RGD}$  envers GRPR et  $\alpha_v\beta_3$  a été évaluée sur des cellules tumorales des lignées PC3 (GRPR<sup>+</sup>) et U87MG ( $\alpha_v\beta_3$ <sup>+</sup>) ( $\text{IC}_{50}(\text{GRPR}) = 32.0 \pm 1.9 \text{ nM}$ ,  $\text{IC}_{50}(\alpha_v\beta_3) : 282 \pm 34 \text{ nM}$ ) et a démontré être légèrement inférieure de celle obtenue pour les monomères correspondants ( $\text{IC}_{50}(\text{GRPR}) = 20.7 \pm 3.2 \text{ nM}$ ,  $\text{IC}_{50}(\alpha_v\beta_3) : 202 \pm 28 \text{ nM}$ ). Bien que les études *in vitro* n'aient pas mis en évidence une efficacité supérieure du composé hétérobivalent par rapport aux monomères, les études *in vivo* ont dressé un tout autre tableau.  $[^{18}\text{F}]\text{F-FB-BBN-RGD}$  a été administré à des souris porteuses de tumeurs PC3 et a montré une meilleure accumulation tumorale, un meilleur rapport tumeur/tissus sains ainsi qu'une rétention tumorale accrue (Figure 28). Les expériences de *blocking* ont par la suite permis de démontrer que les gains observés étaient dus à des interactions bivalentes.

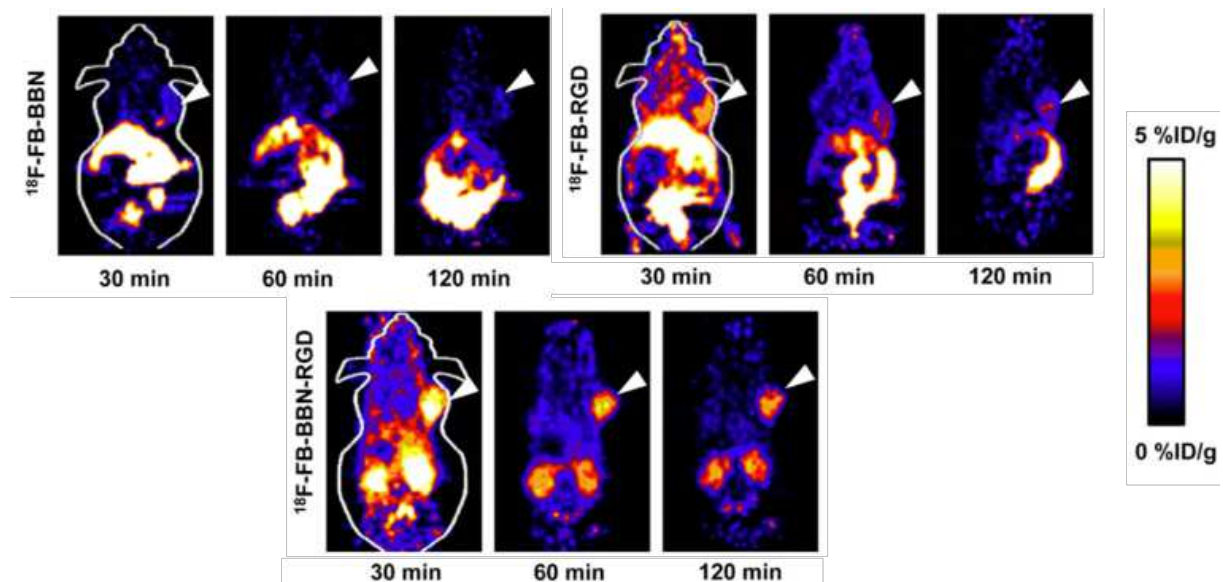


Figure 28 : Images TEP obtenues 30, 60 et 120 min après injection de  $[^{18}\text{F}]\text{F-FB-BBN}$ ,  $[^{18}\text{F}]\text{F-FB-RGD}$  et de  $[^{18}\text{F}]\text{F-FB-BBN-RGD}$ . La tumeur est indiquée par une flèche blanche (adapté de la littérature<sup>124</sup>)

La dissonance entre les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* est expliquée par la surexpression concomitante des deux récepteurs *in vivo*, l'expression de l'intégrine *in vivo* étant due au micro-environnement tumoral.

Cependant, Li *et al.* ont éprouvé des difficultés dans le radiomarquage de cette molécule. Dans une tentative d'obtenir un traceur plus facilement marquable et d'améliorer la pharmacocinétique du composé (en limitant le métabolisme hépatique de la molécule), un espaceur PEG<sub>2</sub> a été incorporé entre le groupement fluorobenzoyle et le pont acide glutamique<sup>125</sup>.

En plus de permettre un radiomarquage avec de meilleurs rendements, cette modification a également permis une nette amélioration des propriétés *in vitro*, et notamment une affinité accrue du ligand envers l'intégrine, et une légère diminution de l'affinité envers GRPR ( $IC_{50}(\text{GRPR}) = 73.3 \pm 1.6 \text{ nM}$ ,  $IC_{50}(\alpha_v\beta_3) : 13.8 \pm 1.8 \text{ nM}$ ). L'incorporation du motif PEG<sub>2</sub> au sein du radiotracer lui a également conféré une clairance rénale plus rapide *in vivo* ainsi qu'une accumulation tumorale légèrement supérieure (Figure 29).

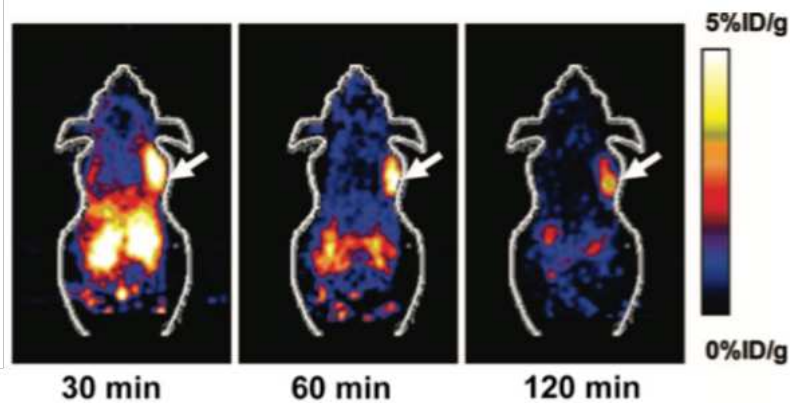


Figure 29 : Images TEP obtenues 30, 60 et 120 minutes après injection de [18F]F-FB-PEG<sub>3</sub>-BBN-RGD. La tumeur est indiquée par une flèche blanche (tiré de la littérature<sup>125</sup>)

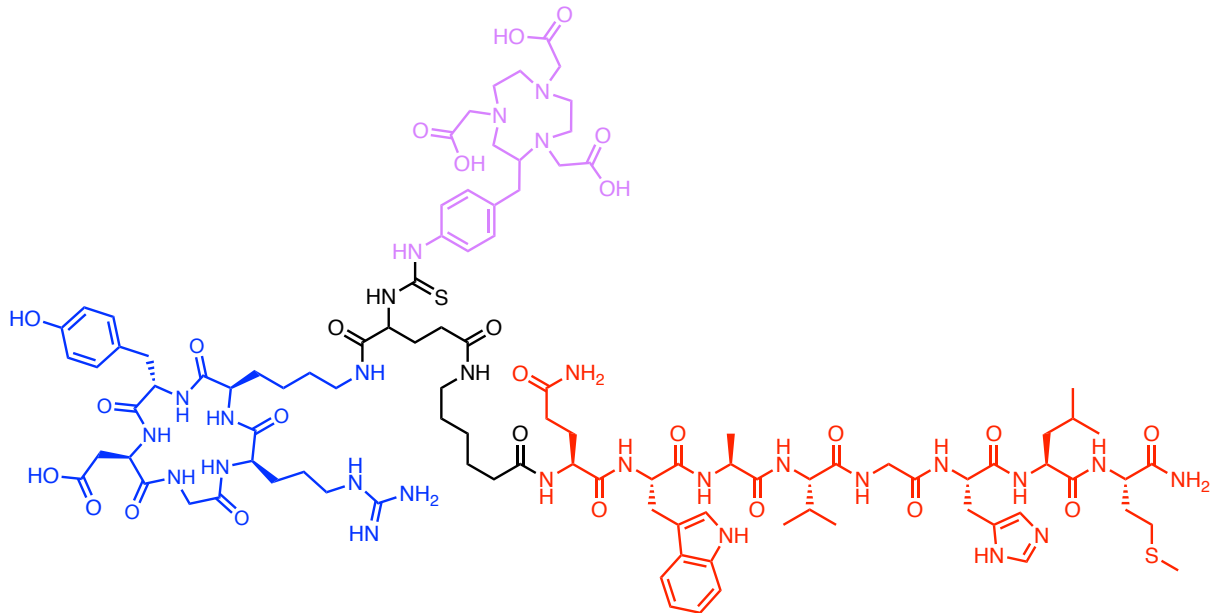
La même équipe a également proposé en 2011 une nouvelle version de [18F]F-FB-BBN-RGD, où le pont asymétrique acide glutamique a été remplacé par un espaceur symétrique, l'acide *N*-aminoéthyle-aminodipropanoïque, qui ne présente cependant aucune plus-value, sur le plan pharmacologique, en comparaison au composé précédemment décrit<sup>126</sup>.

### *Ligands marqués par des radiométaux*

En raison de leurs propriétés pharmacologiques et de leur potentiel théranostique, des traceurs hétérobivalents combinant RGD et la bombésine, fonctionnalisés avec des agents chélatants, ont été développés par le même groupe (Figure 30)<sup>127,128</sup>. [64Cu]Cu-NOTA-RGD-BBN et [68Ga]Ga-NOTA-RGD-BBN ont été évalués *in vivo* et se sont tous deux montrés capables de se lier aux tumeurs PC3 avec une accumulation et une rétention supérieure à leurs équivalents monovalents.

Les images TEP acquises après administration de [64Cu]Cu-NOTA-RGD-BBN et celles acquises après co-injection de [64Cu]Cu-NOTA-RGD et de [64Cu]Cu-NOTA-BBN démontrent la supériorité du ligand hétérobivalent face à l'approche *cocktail*. Ce dernier bénéficie en effet d'une accumulation tumorale plus importante et d'une rétention tumorale plus longue permettant l'acquisition d'images tardives ainsi que d'une pharmacocinétique plus favorable (Figure 31).

[<sup>64</sup>Cu]Cu-NOTA-RGD-BBN affiche cependant une accumulation hépatique importante suggérant une instabilité du complexe cuivre-NOTA *in vivo* qui pose problème dans le contexte d'une translation vers la clinique en raison de la forte radiotoxicité que représente le cuivre-64 pour le foie. [<sup>68</sup>Ga]Ga-NOTA-RGD-BBN représente une alternative plus sérieuse dans ce contexte, car en plus de s'accumuler davantage dans les tissus tumoraux, il est éliminé quasi exclusivement par voie rénale<sup>129</sup>.



**NOTA-RGD-BBN**

Figure 30 : Structure de NOTA-RGD-BBN synthétisé par Liu et al.<sup>127,128</sup>

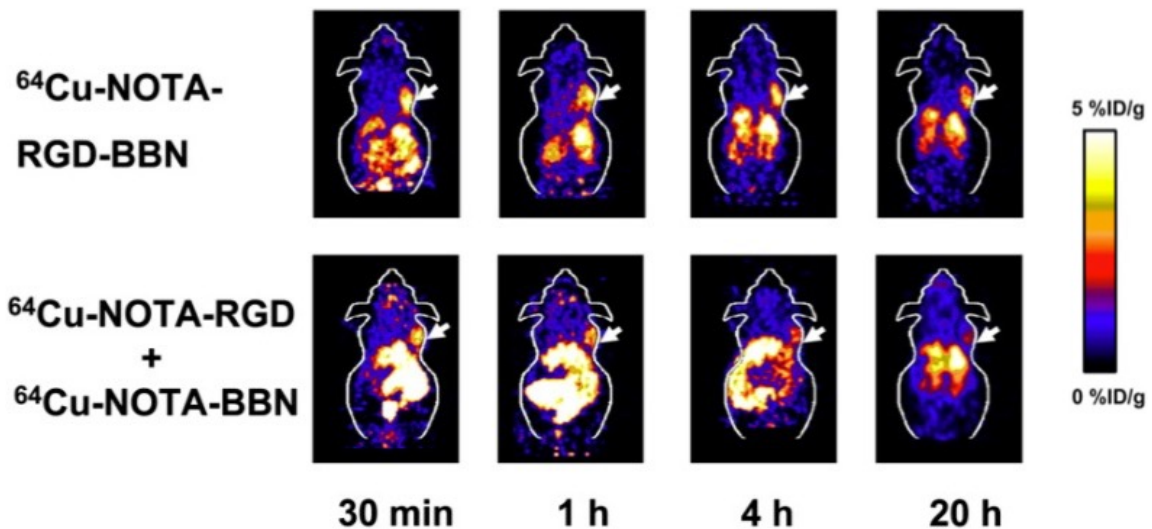


Figure 31 : Images TEP acquises 30 min, 1, 4 et 20h après injection de [<sup>64</sup>Cu]Cu-NOTA-RGD-BBN et co-injection de [<sup>64</sup>Cu]Cu-NOTA-RGD et [<sup>64</sup>Cu]Cu-NOTA-BBN (adapté de la littérature<sup>128</sup>)

[<sup>68</sup>Ga]Ga-NOTA-RGD-BBN a par ailleurs été évalué en clinique en 2017 sur une cohorte de 13 patients atteints d'un cancer de la prostate<sup>130</sup> et en 2018 pour l'imagerie du cancer du sein chez 22 patientes<sup>131</sup>. Dans chaque étude, le composé bivalent a été comparé avec un

radiotraceur monovalent ciblant GRPR et il a démontré à chaque fois sa supériorité face à ce dernier.

D'autres équipes de recherches ont également proposé des variations aux structures décrites par les chercheurs de Stanford<sup>132,133</sup>, notamment en remplaçant l'agoniste de GRPR par un antagoniste (JMV594). Cependant, les complexes marqués au cuivre-64 se sont également révélés instables *in vivo*.

Les efforts pour développer des ligands hétérobivalents ciblant GRPR et l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  ne sont pas limités aux émetteurs TEP. En effet, plusieurs exemples prometteurs pour la TEMP sont également à dénombrer<sup>134,135</sup>.

#### b. Ligands hétérobivalents pour la radiothérapie ciblée de GRPR et $\alpha_v\beta_3$

Les ligands fonctionnalisés avec des agents chélatants ont l'avantage de pouvoir être marqués par différents types de métaux permettant de les utiliser dans différentes applications. Ainsi, certains des ligands présentés dans le paragraphe précédent ont fait l'objet de radiomarquages avec des radioisotopes thérapeutiques comme l'yttrium-90<sup>136</sup>, le lutétium-177<sup>137</sup> ou encore le rhénium-188<sup>138</sup>.

### B. Ligands hétérobivalents ciblant GRPR et PSMA

La combinaison de vecteurs ciblant GRPR et PSMA en un seul traceur est d'un intérêt majeur pour l'imagerie et la thérapie du cancer de la prostate en raison du changement d'expression des récepteurs au fil de la progression de la maladie, GRPR étant surexprimé dans les stades précoces, et la PSMA dans les stades plus tardifs. Ainsi le développement de traceurs hétérobivalents ciblant ces deux marqueurs est une thématique qui a été étudiée par différentes équipes<sup>121</sup>. Le premier chapitre de cette thèse est consacré aux ligands hétérobivalents ciblant ces deux biomarqueurs et l'état de l'art de ces ligands y sera développé.

### C. Autres combinaisons pour le diagnostic et la thérapie du cancer de la prostate

Les combinaisons de vecteurs ciblant GRPR et  $\alpha_v\beta_3$  ainsi que GRPR et PSMA ne constituent pas les deux uniques stratégies pour améliorer le diagnostic et le traitement du cancer de la prostate. D'autres ligands hétérobivalents, ciblant différentes biomolécules, ont également été développés dans ce sens<sup>121</sup>.

Un agent hétérobivalent de radiothérapie ciblée marqué au lutétium-177 ciblant la PSMA et l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  a par exemple été proposé par Escudero-Castellanos *et al.*<sup>139</sup> qui, malgré une affinité élevée pour les récepteurs ciblés, n'a pas encore donné lieu à une étude préclinique.

Le récepteur VPAC<sub>1</sub> s'est également révélé être une cible de choix pour le ciblage des tumeurs primaires du cancer de la prostate et des métastases<sup>140</sup>. Ainsi, une série d'agents d'imagerie TEP hétérobivalents ciblant VPAC<sub>1</sub> et GRPR et marqués au gallium-68 ont été proposés par Lindner *et al.*<sup>141</sup> Bien que les résultats obtenus *in vitro* étaient prometteurs, les études *in vivo* ont montré une pharmacocinétique très défavorable, avec une forte accumulation rénale,

hépatique et dans une moindre mesure pulmonaire, combinée à une accumulation quasi nulle au sein de la tumeur (Figure 32)<sup>142</sup>.



Figure 32 : Images TEP obtenues (MIP) entre 60 et 90 minutes après injection du composé proposé par Lindner et al. La tumeur est entourée en rose (adapté de la littérature<sup>142</sup>).

Les ligands hétérobivalents ne se limitent pas à cibler deux récepteurs différents. On peut citer l'exemple de [<sup>99m</sup>Tc]Tc-N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-Tat(49-57)-bombesin, développé en 2009 par Santos-Cuevas *et al.*, un agent d'imagerie SPECT combinant la bombésine (pour cibler GRPR) et le nonapeptide Tat(49-57)<sup>135</sup>. Tat(49-57), souvent comparé à un cheval de Troie, est un peptide issu du VIH ayant la capacité de pénétrer la paroi cellulaire et est de plus en plus utilisé pour délivrer des principes actifs à l'intérieur des cellules<sup>143</sup>. L'objectif d'une telle structure était de générer un ligand hybride ayant une très forte capacité d'internalisation, ce qui fut un succès puisque [<sup>99m</sup>Tc]Tc-N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-Tat(49-57)-bombesin a démontré une internalisation supérieure dans les cellules PC3 et MCF-7. Malheureusement, les études *in vivo* sur souris ont montré une accumulation rénale trop importante excluant toute utilisation de ce composé en clinique<sup>135</sup>.

#### D. Autres combinaisons pour le diagnostic et la thérapie du cancer du sein

Outre le couple GRPR- $\alpha_v\beta_3$ , la combinaison d'un motif ciblant GRPR avec un motif ciblant NPY<sub>1</sub> présente un intérêt majeur pour l'imagerie et la thérapie du cancer de sein, l'un ou l'autre de ces récepteurs étant surexprimés dans la quasi-totalité de ces lésions<sup>144</sup>. Ainsi, la conception de radiotraceurs bispécifiques ciblant ces deux marqueurs de cancer du sein a intéressé différents groupes de recherche<sup>121</sup>.

Le premier essai rassemblant la bombésine et BVD15, qui cible NPY<sub>1</sub>, ne fut pas couronné de succès, le traceur proposé ne bénéficiant ni d'une affinité améliorée pour les récepteurs ciblés<sup>145</sup> ni d'une stabilité accrue dans le sérum humain<sup>146</sup>.

Dans une tentative plus heureuse de combiner ces deux vecteurs, l'équipe de Wängler a identifié une structure jouissant d'une forte affinité pour chacun des récepteurs ciblés combinée à une excellente stabilité dans le sérum humain<sup>147</sup>. Les études *in vivo* menées sur ce composé ont montré que le ligand bivalent bénéficiait d'une accumulation et d'une rétention tumorale accrue en comparaison aux ligands monovalents. Malheureusement, en raison du choix de la lignée cellulaire utilisée *in vitro*, Vall-Sagara *et al.* n'ont pas pu apporter la preuve que les interactions observées dans le cadre de cette étude étaient dues à des interactions bivalentes.

Un autre groupe s'est également intéressé au ciblage de GRPR et du récepteur à folate  $\alpha$  (FR $\alpha$ ) et a proposé deux composés qui ne diffèrent que par l'agent chélatant utilisé : le premier fonctionnalisé avec un DOTA, pour la radiothérapie ciblée au lutétium-177<sup>148</sup>, et le second fonctionnalisé avec un chélateur de technétium-99 métastable pour l'imagerie TEMP<sup>149</sup>. Les traceurs proposés ont notamment prouvé leur efficacité en tant qu'agent d'imagerie et de thérapie, étant capables de s'accumuler spécifiquement au sein des tumeurs en surpassant leurs équivalents monovalents.

### E. Autres combinaisons intégrant des ligands de $\alpha_v\beta_3$

En raison de la surexpression d' $\alpha_v\beta_3$  au sein du micro-environnement de la plupart des tumeurs, la combinaison de ligands de cette intégrine avec des motifs plus spécifiques a été envisagée par plusieurs groupes<sup>121</sup>. Les ligands bispécifiques contenant un motif ciblant  $\alpha_v\beta_3$  présentent également un intérêt thérapeutique. En effet, le ligand RGD de  $\alpha_v\beta_3$ , a un effet favorisant la mort cellulaire (proapoptotique) qui s'explique par l'activation de l'enzyme caspase-3<sup>121</sup>.

C'est dans ce contexte que Capello *et al.* ont développé un composé ciblant les récepteurs à somatostatine et  $\alpha_v\beta_3$ <sup>150</sup>. [<sup>111</sup>In]In-RGD-DTPA-octreotate a été évalué *in vitro* et *in vivo* et comparé aux monomères [<sup>111</sup>In]In-DTPA-RGD et [<sup>111</sup>In]In-DTPA-octreotate et il en est ressorti que la majorité de l'accumulation spécifique dans les tumeurs était due à la liaison avec le récepteur à la somatostatine. [<sup>111</sup>In]In-RGD-DTPA-octreotate a également prouvé sa capacité à induire une toxicité cellulaire. D'un point de vue pharmacocinétique, [<sup>111</sup>In]In-RGD-DTPA-octreotate affiche une accumulation rénale trop importante, ce qui a mené les auteurs à développer un dérivé plus lipophile de ce composé radiothéranostique<sup>151</sup>. Le composé radioiodé affiche effectivement une accumulation rénale moins importante que son équivalent marqué à l'indium, cependant cette dernière reste bien supérieure à l'accumulation tumorale, empêchant toute évaluation en clinique.

Dans la même idée, une autre équipe a développé un agent théranostique hétérobivalent marqué au technétium-99 métastable combinant le cyclopeptide RGD avec un ligand du récepteur à mélanocortine 1 (MC1R)<sup>152</sup>. Le composé affiche une accumulation tumorale élevée qui est médiée par les deux vecteurs. De plus, ce composé favorise l'apoptose des cellules cancéreuses ciblées.

D'autres exemples de traceurs bispécifiques intégrant un motif RGD ont été mis au point ces dernières années. On peut notamment citer le traceur TEP [<sup>18</sup>F]AIF-NOTA-RGD-ATWLPPR spécifique de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  et du récepteur neuropiline-1 (NRP-1) qui affiche une bonne accumulation tumorale en dépit d'une biodistribution hépatique défavorable<sup>153</sup>.



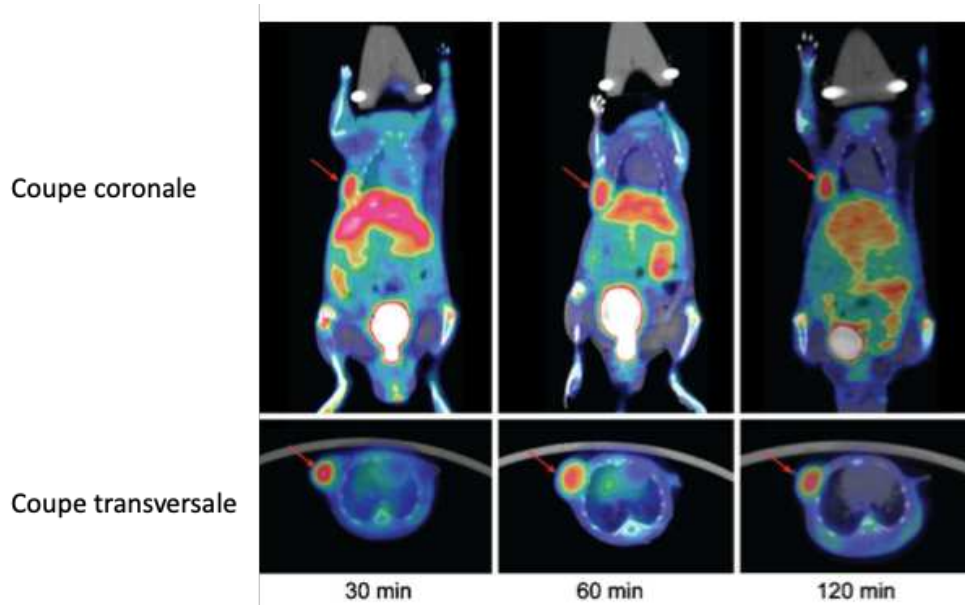


Figure 33 : Coupes coronales et transversales obtenues en TEP après injection de  $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-RGD-ATWLPPR}$ . Les tumeurs sont indiquées à l'aide de flèches rouges (adapté de la littérature<sup>153</sup>).

### 3. Conception et synthèse de ligands hétérobivalents

Bien que le choix des vecteurs constitue le premier défi dans le développement d'agents d'imagerie et de thérapie hétérobivalents, la nature tripodale de ces molécules (ligand 1, ligand 2 et sonde) représente un défi de taille en matière de synthèse chimique. Dans la dernière partie de cette introduction, nous présentons et évaluons les deux différentes approches qui s'offrent à qui souhaiterait développer de telles molécules : l'approche linéaire et l'approche branchée.

#### A. L'approche linéaire

L'approche linéaire a été utilisée de nombreuses fois pour la synthèse de ligands hétérobivalents (Figure 34). C'est notamment cette approche qui a été choisie en premier lieu par les équipes d'Orlova et de Kopka pour la synthèse de leurs hétérobivalents ciblant PSMA et GRPR (qui seront développés dans le prochain chapitre de cette thèse)<sup>154-156</sup>. C'est également cette approche qui a été utilisée par l'équipe de Portuguese à l'origine des premiers ligands bispécifiques<sup>113,115</sup>, et celle utilisée par Yang *et al.* pour synthétiser un ligand ciblant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  et le récepteur à mélanocortine 1<sup>152</sup>. Dans cette approche, vecteurs, espaceurs et sondes sont incorporés tour à tour, en phase solide ou liquide, pour former une chaîne linéaire trifonctionnelle (Figure 34).

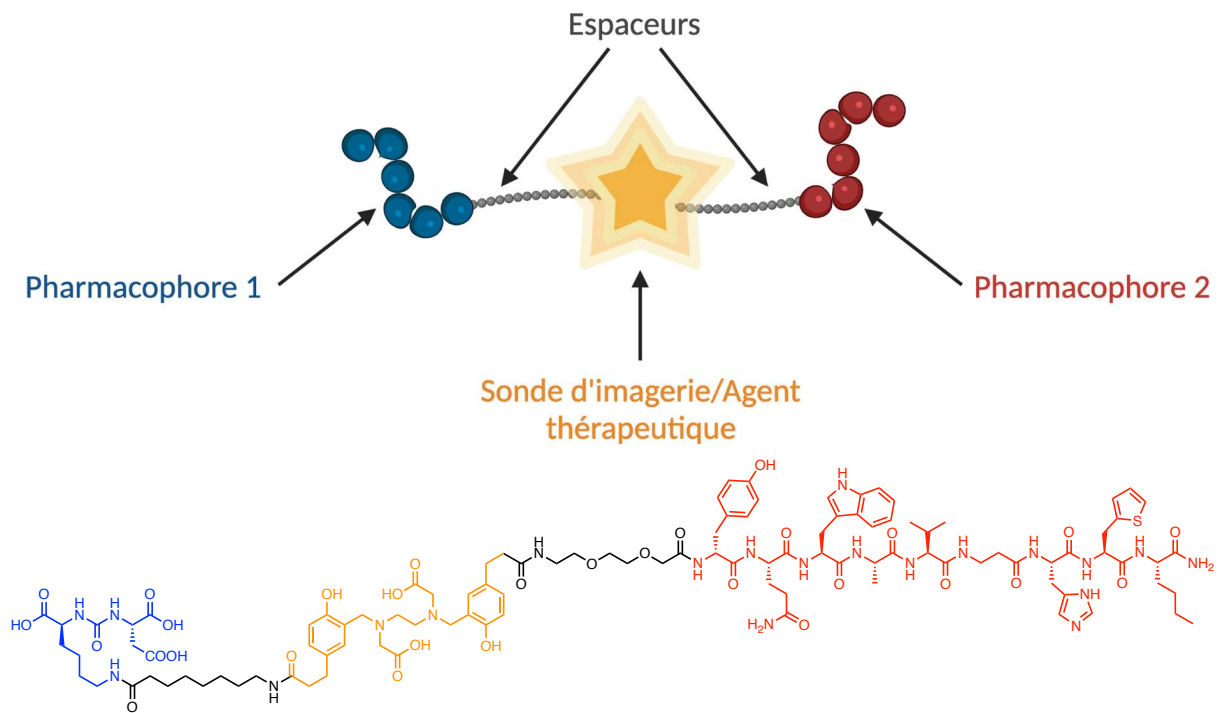


Figure 34 : Structure générale d'un agent d'imagerie ou de thérapie synthétisé au moyen de l'approche linéaire (haut). Exemple de ligand hétérobivalent ciblant GRPR et PSMA développé par l'équipe de Kopka selon une approche linéaire<sup>156</sup> (bas).

Cette approche séduit en raison de sa simplicité de mise en œuvre. Elle permet en effet la synthèse rapide d'un ligand sans nécessiter un nombre élevé d'étapes de purification qui auraient pour conséquences la diminution des rendements globaux et l'allongement du temps de production.

Cependant, l'approche linéaire souffre d'un sérieux manque de modularité. En effet, le développement d'agents hétérobivalents est un processus qui nécessite de nombreuses étapes d'optimisation : choix des vecteurs, nature et longueur des espaceurs, nature et position de la sonde d'imagerie... L'approche linéaire ne permet pas d'effectuer aisément les modifications nécessaires pour optimiser le traceur.

## B. L'approche « branchée »

Contrairement à l'approche linéaire, l'utilisation d'une plateforme trivalente (ou triorthogonale) octroie à l'approche « branchée » une très forte modularité (Figure 35). Une plateforme trivalente est définie comme un châssis moléculaire permettant l'introduction de trois fonctionnalités différentes de manière chimiospécifique.



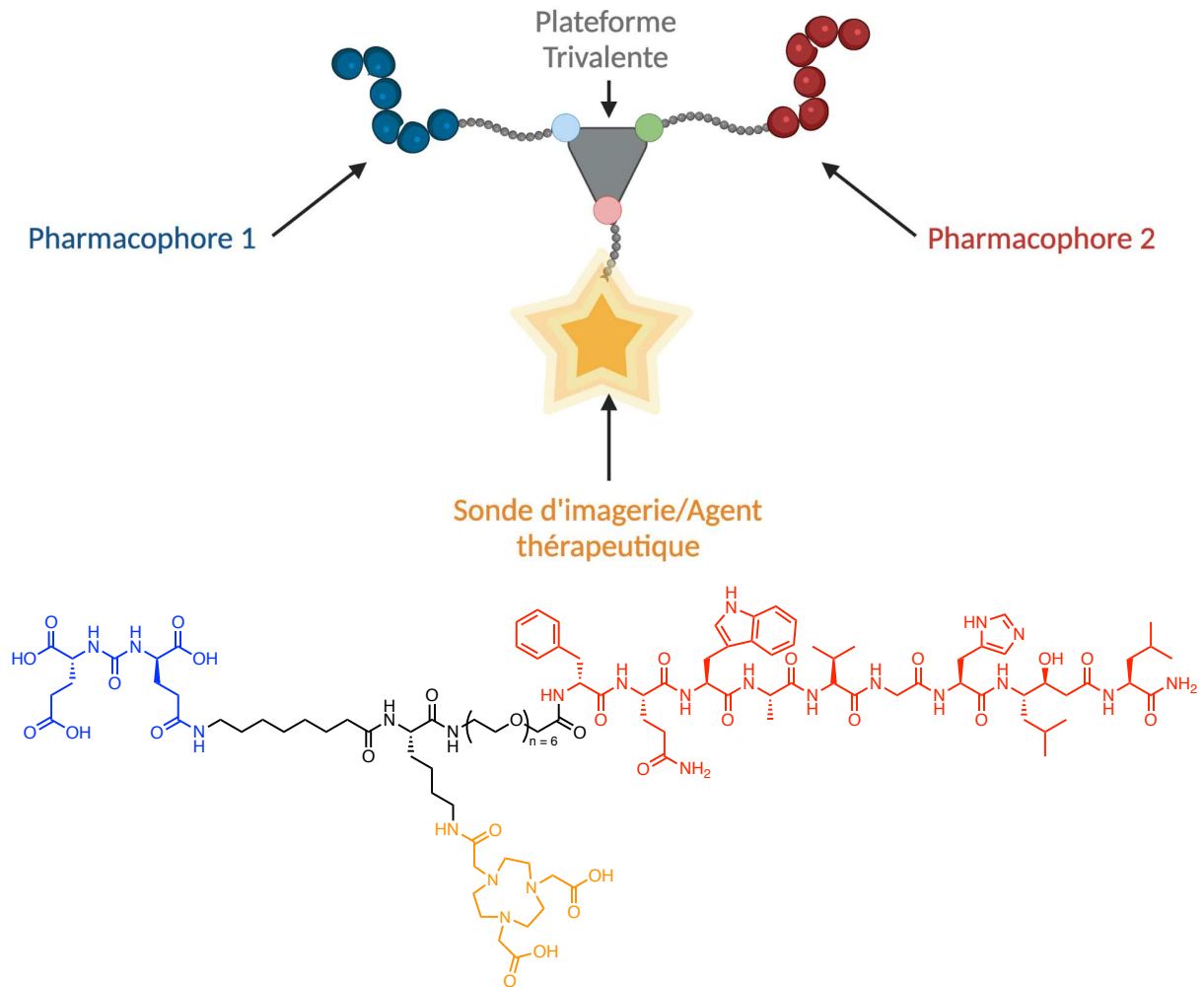


Figure 35 : Structure générale d'un ligand hétérobivalent synthétisé au moyen de l'approche branchée (haut). Structure d'un ligand hétérobivalent ciblant GRPR et PSMA développé par l'équipe d'Orlova<sup>157</sup>.

Les sites d'introduction des fonctionnalités désirées peuvent se discriminer de deux façons différentes :

- *via* l'utilisation d'une plateforme protégée de manière triorthogonale,
- *via* l'utilisation d'une plateforme contenant 3 fonctions chimiques réactives orthogonales entre elles.

Les acides aminés protégés triorthogonalement sont souvent utilisés comme plateforme trivalente<sup>158</sup>. À titre d'exemple, la plateforme Fmoc-L-Lys(Dde)-OH peut être fonctionnalisée sur l'acide carboxylique par couplage peptidique, sur l'amine  $\alpha$  après déprotection sélective en présence d'une amine secondaire et sur l'amine  $\epsilon$  après déprotection sélective en présence d'hydroazine ou d'hydroxylamine et d'imidazole<sup>26</sup> (Figure 36).

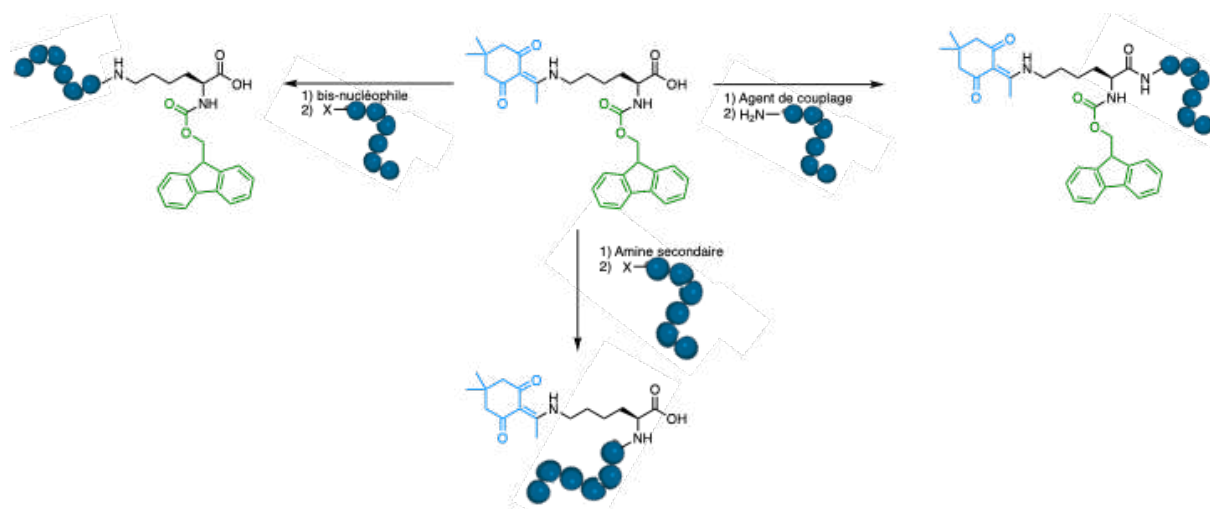


Figure 36 : La plateforme trivalente lysine et ses 3 voies de fonctionnalisation

En raison de sa modularité, l'approche « branchée » est la plus utilisée pour la synthèse de ligands hétérobivalents. On peut citer l'exemple du ligand conçu par Shrivastava *et al.* pour l'imagerie concomitante de GRPR et de NPY<sub>1</sub> et de celui développé par Lundmark *et al.* (ciblant PSMA et GRPR, Figure 35) qui sont construits autour d'une plateforme lysine<sup>145,157</sup>.

La modularité de l'approche « branchée » autorise un plus large panel de modification et d'optimisation de la molécule finale. Cependant, cette modularité se fait au prix de la simplicité de synthèse. En effet, l'emploi d'une plateforme triorthogonalement protégée implique de nombreuses étapes de déprotections/purifications qui ont pour conséquence d'allonger grandement le temps de synthèse et peuvent mener à des rendements faibles.

Le développement d'agents d'imagerie et de thérapie hétérobivalent implique un long travail d'optimisation, et en particulier pour trouver la distance optimale entre les deux vecteurs permettant de tirer le meilleur profit des interactions bivalentes. Il existe donc dans ce domaine une forte demande pour le développement d'une procédure de synthèse qui combine la simplicité et rapidité de synthèse de l'approche linéaire avec la modularité que confère l'approche branchée.

### III. Description du projet de recherche

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse s'articulent autour de l'imagerie vectorisée par des ligands hétérobivalents. Les deux objectifs principaux de ces recherches ont été, dans un premier temps, le développement d'une méthodologie de synthèse simple, directe et modulaire permettant de synthétiser rapidement et avec de bons rendements une large variété de traceurs hétérobivalents. Dans un second temps, l'objectif a été de développer une méthode de caractérisation préliminaire de ces ligands en utilisant des ligands de référence fluorescents comme alternative au recours à des essais radiochimiques.

Ainsi, le **premier chapitre** de cette thèse a pour objet le développement d'une méthode de synthèse de ligands hétérobivalents et la synthèse d'une série de traceurs bispécifiques ciblant deux biomolécules d'intérêt dans l'imagerie du cancer de la prostate : PSMA et GRPR. Les ligands hétérobivalents que nous proposons sont formés *via* la modification chimiospécifique d'une petite molécule : la 3,6-dichlorotétrazine.

Dans un second temps, comme preuve de concept, un des ligands produits par le biais de cette méthode a été caractérisé *in vitro* et *in vivo* sur des souris doublement xéno greffées.

Dans le **second chapitre**, notre méthode de synthèse a en premier lieu été éprouvée *via* la préparation de ligands bispécifiques supplémentaires, ciblant un autre récepteur d'intérêt en oncologie : CXCR4. Ce chapitre décrit notamment l'optimisation de la synthèse de ce ligand sur phase solide, ainsi que la synthèse en phase homogène d'un synthon, l'acide aminé Fmoc-N(Me)-D-Orn(Dde)-OH, dont la méthylation est usuellement effectuée sur phase solide. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au ciblage du micro-environnement tumoral en effectuant et en optimisant la synthèse d'une petite molécule inhibitrice de la protéine d'activation des fibroblastes (FAP- $\alpha$ ) : FAPI-04.

Le **troisième chapitre** porte sur la caractérisation *in vitro* des molécules précédemment synthétisées. Cette partie de la thèse décrit le développement d'une méthode innovante permettant de déterminer l'affinité d'un ligand pour son récepteur, sans avoir recours à la radioactivité.

Pour finir, le **quatrième et dernier chapitre** de cette thèse s'inscrit dans le cadre de travaux qui ont démarré avant mon arrivée en thèse, durant ma deuxième année de master. Dans ce projet, nous avons pour objectif le développement d'un agent chélatant bifonctionnel permettant la complexation du zirconium-89, radioélément présentant un intérêt majeur pour l'imagerie nucléaire vectorisée à l'aide d'anticorps.

## Bibliographie

- (1) OMS. Cancer. 2022.
- (2) Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Dyba, T.; Randi, G.; Bettio, M.; Gavin, A.; Visser, O.; Bray, F. Cancer Incidence and Mortality Patterns in Europe: Estimates for 40 Countries and 25 Major Cancers in 2018. *Eur. J. Cancer* **2018**, *103*, 356–387. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.07.005>.
- (3) Massoud, T. F. Molecular Imaging in Living Subjects: Seeing Fundamental Biological Processes in a New Light. *Gene Dev.* **2003**, *17* (5), 545–580. <https://doi.org/10.1101/gad.1047403>.
- (4) Willmann, J. K.; van Bruggen, N.; Dinkelborg, L. M.; Gambhir, S. S. Molecular Imaging in Drug Development. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2008**, *7* (7), 591–607. <https://doi.org/10.1038/nrd2290>.
- (5) Röntgen, W. Translated by Arthur Stanton from the Sitzungsberichte Der Würzburger Physik-Medik. Gesellschaft, 1895. On a New Kind of Rays. *Nature* **1896**, *53* (1369), 274–276.
- (6) 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>.
- (7) Coolidge, W. D. A Powerful Röntgen Ray Tube with a Pure Electron Discharge. *Phys. Rev.* **1913**, *2* (6), 409–430. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.2.409>.
- (8) Garvey, C. J. Computed Tomography in Clinical Practice. *BMJ* **2002**, *324* (7345), 1077–1080. <https://doi.org/10.1136/bmj.324.7345.1077>.
- (9) Christiansen, C. X-Ray Contrast Media—an Overview. *Toxicology* **2005**, *209* (2), 185–187. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.12.020>.
- (10) McRobbie, D. W., MRI from Picture to Proton 2nd ed. *Cambridge University Press: Cambridge* **2006**.
- (11) Pimlott, S. L.; Sutherland, A. Molecular Tracers for the PET and SPECT Imaging of Disease. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (1), 149–162. <https://doi.org/10.1039/B922628C>.
- (12) Wahsner, J.; Gale, E. M.; Rodríguez-Rodríguez, A.; Caravan, P. Chemistry of MRI Contrast Agents: Current Challenges and New Frontiers. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 957–1057. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00363>.
- (13) Frinking, P.; Segers, T.; Luan, Y.; Tranquart, F. Three Decades of Ultrasound Contrast Agents: A Review of the Past, Present and Future Improvements. *Ultrasound Med. Biol.* **2020**, *46* (4), 892–908. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2019.12.008>.
- (14) Wells, P. N. T. Ultrasound Imaging. *Phys. Med. Biol.* **2006**, *51* (13), R83–R98. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/51/13/R06>.
- (15) Mariani, G.; Bruselli, L.; Kuwert, T.; Kim, E. E.; Flotats, A.; Israel, O.; Dondi, M.; Watanabe, N. A Review on the Clinical Uses of SPECT/CT. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2010**, *37* (10), 1959–1985. <https://doi.org/10.1007/s00259-010-1390-8>.
- (16) Hoh, C. K. Clinical Use of FDG PET. *Nucl. Med. Biol.* **2007**, *34* (7), 737–742. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2007.07.001>.
- (17) 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>.
- (18) Mansi, R.; Wang, X.; Forrer, F.; Waser, B.; Cescato, R.; Graham, K.; Borkowski, S.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R. Development of a Potent DOTA-Conjugated Bombesin Antagonist for Targeting GRPr-Positive Tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, *38* (1), 97–107.

<https://doi.org/10.1007/s00259-010-1596-9>.

(19) Pichler, V.; Berroterán-Infante, N.; Philippe, C.; Vranka, C.; Klebermass, E.-M.; Balber, T.; Pfaff, S.; Nics, L.; Mitterhauser, M.; Wadsak, W. An Overview of PET Radiochemistry, Part 1: The Covalent Labels  $^{18}\text{F}$ ,  $^{11}\text{C}$ , and  $^{13}\text{N}$ . *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (9), 1350–1354. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.190793>.

(20) Krishnan, H. S.; Ma, L.; Vasdev, N.; Liang, S. H.  $^{18}\text{F}$ -Labeling of Sensitive Biomolecules for Positron Emission Tomography. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (62), 15553–15577. <https://doi.org/10.1002/chem.201701581>.

(21) Fowler, J. S.; Ido, T. Initial and Subsequent Approach for the Synthesis of  $^{18}\text{F}$ FDG. *Semin. Nucl. Med.* **2002**, *32* (1), 6–12. <https://doi.org/10.1053/snuc.2002.29270>.

(22) Wangler, B.; Schirmacher, R.; Bartenstein, P.; Wangler, C. Chelating Agents and Their Use in Radiopharmaceutical Sciences. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2011**, *11* (11), 968–983. <https://doi.org/10.2174/138955711797068445>.

(23) Heskamp, S.; Raavé, R.; Boerman, O.; Rijpkema, M.; Goncalves, V.; Denat, F.  $^{89}\text{Zr}$ -Immuno-Positron Emission Tomography in Oncology: State-of-the-Art  $^{89}\text{Zr}$  Radiochemistry. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28* (9), 2211–2223. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00325>.

(24) 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>.

(25) 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>.

(26) Renard, E.; Moreau, M.; Bellaye, P.-S.; Guillemin, M.; Collin, B.; Prignon, A.; Denat, F.; Goncalves, V. Positron Emission Tomography Imaging of Neurotensin Receptor-Positive Tumors with  $^{68}\text{Ga}$ -Labeled Antagonists: The Chelate Makes the Difference Again. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (12), 8564–8578. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00523>.

(27) Hennrich, U.; Kopka, K. Lutathera®: The First FDA- and EMA-Approved Radiopharmaceutical for Peptide Receptor Radionuclide Therapy. *Pharmaceuticals* **2019**, *12* (3), 114. <https://doi.org/10.3390/ph12030114>.

(28) Dalm, S. U.; Bakker, I. L.; de Blois, E.; Doeswijk, G. N.; Konijnenberg, M. W.; Orlandi, F.; Barbato, D.; Tedesco, M.; Maina, T.; Nock, B. A.; de Jong, M.  $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ -NeoBOMB1, a Novel Radiolabeled GRPR Antagonist for Theranostic Use in Oncology. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (2), 293–299. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.176636>.

(29) Jeitner, T. M.; Babich, J. W.; Kelly, J. M. Advances in PSMA Theranostics. *Transl. Oncol.* **2022**, *22*, 101450. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101450>.

(30) Badr, C. E.; Tannous, B. A. Bioluminescence Imaging: Progress and Applications. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29* (12), 624–633. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.010>.

(31) Lioret, V.; Bellaye, P.-S.; Arnould, C.; Collin, B.; Decréau, R. A. Dual Cherenkov Radiation-Induced Near-Infrared Luminescence Imaging and Photodynamic Therapy toward Tumor Resection. *J. Med. Chem.* **2020**, *11*.

(32) Martynov, V. I.; Pakhomov, A. A.; Popova, N. V.; Deyev, I. E.; Petrenko, A. G. Synthetic Fluorophores for Visualizing Biomolecules in Living Systems. *Acta Naturae* **2016**, *8* (4), 33–46.

(33) Weissleder, R. A Clearer Vision for in Vivo Imaging. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19* (4), 316–317.

(34) Starosolski, Z.; Bhavane, R.; Ghaghada, K. B.; Vasudevan, S. A.; Kaay, A.; Annapragada, A. Indocyanine Green Fluorescence in Second Near-Infrared (NIR-II) Window. *PLoS ONE* **2017**,

- 12 (11), e0187563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187563>.
- (35) Bisballe, N.; Laursen, B. W. What Is Best Strategy for Water Soluble Fluorescence Dyes?—A Case Study Using Long Fluorescence Lifetime DAOTA Dyes\*\*. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26* (68), 15969–15976. <https://doi.org/10.1002/chem.202002457>.
- (36) Demchenko, A. P. Photobleaching of Organic Fluorophores: Quantitative Characterization, Mechanisms, Protection. *Methods Appl. Fluoresc.* **2020**, *8* (2), 022001. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab7365>.
- (37) Zhang, N.; Lu, C.; Chen, M.; Xu, X.; Shu, G.; Du, Y.; Ji, J. Recent Advances in Near-Infrared II Imaging Technology for Biological Detection. *J. Nanobiotechnol.* **2021**, *19* (1), 132. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00870-z>.
- (38) Guo, R.; Yin, J.; Ma, Y.; Li, G.; Wang, Q.; Lin, W. A Novel NIR Probe for Detection of Viscosity in Cellular Lipid Droplets, Zebra Fishes and Living Mice. *Sensor. Actuat. B-Chem.* **2018**, *271*, 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.05.055>.
- (39) Godard, A.; Kalot, G.; Pliquett, J.; Busser, B.; Le Guével, X.; Wegner, K. D.; Resch-Genger, U.; Rousselin, Y.; Coll, J.-L.; Denat, F.; Bodio, E.; Goze, C.; Sancey, L. Water-Soluble Aza-BODIPYs: Biocompatible Organic Dyes for High Contrast *In Vivo* NIR-II Imaging. *Bioconjugate Chem.* **2020**, *31* (4), 1088–1092. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00175>.
- (40) 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>.
- (41) Attia, A. B. E.; Balasundaram, G.; Moothanchery, M.; Dinish, U. S.; Bi, R.; Ntziachristos, V.; Olivo, M. A Review of Clinical Photoacoustic Imaging: Current and Future Trends. *Photoacoustics* **2019**, *16*, 100144. <https://doi.org/10.1016/j.pacs.2019.100144>.
- (42) Das, S.; Thorek, D. L. J.; Grimm, J. Cerenkov Imaging. In *Advances in Cancer Research*; Elsevier, 2014; Vol. 124, pp 213–234. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411638-2.00006-9>.
- (43) Grootendorst, M. R.; Cariati, M.; Kothari, A.; Tuch, D. S.; Purushotham, A. Cerenkov Luminescence Imaging (CLI) for Image-Guided Cancer Surgery. *Clin. Transl. Imaging* **2016**, *4* (5), 353–366. <https://doi.org/10.1007/s40336-016-0183-x>.
- (44) Desvaux, E.; Courteau, A.; Bellaye, P.-S.; Guillemain, M.; Drouet, C.; Walker, P.; Collin, B.; Décréau, R. A. Cerenkov Luminescence Imaging Is a Fast and Relevant Preclinical Tool to Assess Tumour Hypoxia *In Vivo*. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging Res.* **2018**, *8* (1), 111. <https://doi.org/10.1186/s13550-018-0464-7>.
- (45) de Rosales, R. T. M. Potential Clinical Applications of Bimodal PET-MRI or SPECT-MRI Agents: Bimodal PET/SPECT-MR Imaging Agents. *J. Label Compd. Radiopharm.* **2014**, *57* (4), 298–303. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3154>.
- (46) Jadvar, H.; Colletti, P. M. Competitive Advantage of PET/MRI. *Eur. J. Radiol.* **2014**, *83* (1), 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2013.05.028>.
- (47) Frullano, L.; Catana, C.; Benner, T.; Sherry, A. D.; Caravan, P. Bimodal MR-PET Agent for Quantitative PH Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (13), 2382–2384. <https://doi.org/10.1002/anie.201000075>.
- (48) 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**, *12*.
- (49) Florès, O.; Pliquett, J.; Abad Galan, L.; Lescure, R.; Denat, F.; Maury, O.; Pallier, A.; Bellaye, P.-S.; Collin, B.; Mème, S.; Bonnet, C. S.; Bodio, E.; Goze, C. Aza-BODIPY Platform: Toward an Efficient Water-Soluble Bimodal Imaging Probe for MRI and Near-Infrared Fluorescence. *Inorg. Chem.* **2020**, *59* (2), 1306–1314. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b03017>.



- (50) Ariztia, J.; Solmont, K.; Moïse, N. P.; Specklin, S.; Heck, M. P.; Lamandé-Langle, S.; Kuhnast, B. PET/Fluorescence Imaging: An Overview of the Chemical Strategies to Build Dual Imaging Tools. *Bioconjugate Chem.* **2022**, *33*, 24–52.
- (51) Adumeau, P.; Raavé, R.; Boswinkel, M.; Heskamp, S.; Wessels, H. J. C. T.; van Gool, A. J.; Moreau, M.; Bernhard, C.; Da Costa, L.; Goncalves, V.; Denat, F. Site-Specific, Platform-Based Conjugation Strategy for the Synthesis of Dual-Labeled Immunoconjugates for Bimodal PET/NIRF Imaging of HER2-Positive Tumors. *Bioconjugate Chem.* **2022**, *33* (3), 530–540. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.2c00049>.
- (52) Florès, O.; Trommenschlager, A.; Amor, S.; Marques, F.; Silva, F.; Gano, L.; Denat, F.; Cabral Campello, M. P.; Goze, C.; Bodio, E.; Le Gendre, P. In Vitro and in Vivo Trackable Titanocene-Based Complexes Using Optical Imaging or SPECT. *Dalton Trans.* **2017**, *46* (42), 14548–14555. <https://doi.org/10.1039/C7DT01981E>.
- (53) Privat, M.; Bellaye, P.-S.; Lescure, R.; Massot, A.; Baffroy, O.; Moreau, M.; Racoer, C.; Marcion, G.; Denat, F.; Bettaieb, A.; Collin, B.; Bodio, E.; Paul, C.; Goze, C. Development of an Easily Bioconjugatable Water-Soluble Single-Photon Emission-Computed Tomography/Optical Imaging Bimodal Imaging Probe Based on the Aza-BODIPY Fluorophore. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (15), 11063–11073. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00450>.
- (54) 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>.
- (55) 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>.
- (56) 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*, BIC.S38542. <https://doi.org/10.4137/BIC.S38542>.
- (57) Alberts; Bray; Hopkin; Johnson; Lewis; Raff; Roberts; Walter. *L'essentiel de La Biologie Cellulaire 2ème Édition*; Médecine-Sciences Flammarion, 2005.
- (58) Macheda, M. L.; Rogers, S.; Best, J. D. Molecular and Cellular Regulation of Glucose Transporter (GLUT) Proteins in Cancer. *J. Cell. Physiol.* **2005**, *202* (3), 654–662. <https://doi.org/10.1002/jcp.20166>.
- (59) Mochizuki, T.; Tsukamoto, E.; Kuge, Y.; Kanegae, K.; Zhao, S.; Hikosaka, K.; Hosokawa, M.; Kohanawa, M.; Tamaki, N. FDG Uptake and Glucose Transporter Subtype Expressions in Experimental Tumor and Inflammation Models. *J. Nucl. Med.* **2001**, *42* (10), 1551–1555.
- (60) Qi, Y.; Liu, X.; Li, J.; Yao, H.; Yuan, S. Fluorine-18 Labeled Amino Acids for Tumor PET/CT Imaging. *Neuro-Oncology* **2015**, *17* (9), 1293–1300.
- (61) Lappano, R.; Maggiolini, M. GPCRs and Cancer. *Acta. Pharmacol. Sin.* **2012**, *33* (3), 351–362. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.183>.
- (62) Dorsam, R. T.; Gutkind, J. S. G-Protein-Coupled Receptors and Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7* (2), 79–94. <https://doi.org/10.1038/nrc2069>.
- (63) Lippitz, B. E. Cytokine Patterns in Patients with Cancer: A Systematic Review. *Lancet Oncol.* **2013**, *14* (6), e218–e228. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70582-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70582-X).
- (64) Eychenne, R.; Bouvry, C.; Bourgeois, M.; Loyer, P.; Benoist, E.; Lepareur, N. Overview of Radiolabeled Somatostatin Analogs for Cancer Imaging and Therapy. *Molecules* **2020**, *25* (17), 4012. <https://doi.org/10.3390/molecules25174012>.

- (65) Elangbam, C. S.; Qualls, C. W.; Dahlgren, R. R. Cell Adhesion Molecules - Update. *Vet. Pathol.* **1997**, *34*, 61–73.
- (66) Chothia, C.; Jones, E. Y. The molecular structure of cell-adhesion molecules  
..... *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66* (1), 823–862.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.823>.
- (67) Varner, J. A.; Cheresch, D. A. Integrins and Cancer. *Curr. Biol.* **1996**, *8*, 724–730.
- (68) Desgrosellier, J. S.; Cheresch, D. A. Integrins in Cancer: Biological Implications and Therapeutic Opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10* (1), 9–22.  
<https://doi.org/10.1038/nrc2748>.
- (69) Wu, T.-C. The Role of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Tumor Immune Evasion. *Cancer Res.* **2007**, *67* (13), 6003–6006. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1543>.
- (70) Chen, Q.; Massagué, J. Molecular Pathways: VCAM-1 as a Potential Therapeutic Target in Metastasis. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18* (20), 5520–5525. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2904>.
- (71) Bravaccini, S.; Puccetti, M.; Bocchini, M.; Ravaioli, S.; Celli, M.; Scarpi, E.; De Giorgi, U.; Tumedei, M. M.; Raulli, G.; Cardinale, L.; Paganelli, G. PSMA Expression: A Potential Ally for the Pathologist in Prostate Cancer Diagnosis. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 4254.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-22594-1>.
- (72) Gourni, E.; Henriksen, G. Metal-Based PSMA Radioligands. *Molecules* **2017**, *22* (4), 523.  
<https://doi.org/10.3390/molecules22040523>.
- (73) Wickström, M.; Larsson, R.; Nygren, P.; Gullbo, J. Aminopeptidase N (CD13) as a Target for Cancer Chemotherapy. *Cancer Sci.* **2011**, *102* (3), 501–508. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01826.x>.
- (74) Boonstra, M. C.; De Geus, S. W. L.; Prevo, 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*, BIC.S38542. <https://doi.org/10.4137/BIC.S38542>.
- (75) 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>.
- (76) 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>.
- (77) Adessi, C.; Soto, C. Converting a Peptide into a Drug: Strategies to Improve Stability and Bioavailability. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9* (9), 963–978.  
<https://doi.org/10.2174/0929867024606731>.
- (78) Valverde, I. E.; Lecaille, F.; Lalmanach, G.; Aucagne, V.; Delmas, A. F. Synthesis of a Biologically Active Triazole-Containing Analogue of Cystatin A Through Successive Peptidomimetic Alkyne-Azide Ligations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (3), 718–722.  
<https://doi.org/10.1002/anie.201107222>.
- (79) Kozikowski, A. P.; Nan, F.; Conti, P.; Zhang, J.; Ramadan, E.; Bzdega, T.; Wroblewska, B.; Neale, J. H.; Pshenichkin, S.; Wroblewski, J. T. Design of Remarkably Simple, Yet Potent Urea-Based Inhibitors of Glutamate Carboxypeptidase II (NAALADase). *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (3), 298–301. <https://doi.org/10.1021/jm000406m>.
- (80) Chiu, M. L.; Goulet, D. R.; Teplyakov, A.; Gilliland, G. L. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies* **2019**, *8* (55), 80.
- (81) Ryman, J. T.; Meibohm, B. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies: Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* **2017**, *6*



- (9), 576–588. <https://doi.org/10.1002/psp4.12224>.
- (82) Chames, P.; Regenmortel, M. V.; Weiss, E.; Baty, D. Therapeutic Antibodies: Successes, Limitations and Hopes for the Future. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 220–230.
- (83) Niels Dammes; Dan Peer. Monoclonal Antibody-Based Molecular Imaging Strategies and Theranostic Opportunities. *Theranostics* **2020**, *10* (2), 938–955.
- (84) Parakh, S.; Lee, S. T.; Gan, H. K.; Scott, A. M. Radiolabeled Antibodies for Cancer Imaging and Therapy. *Cancers* **2022**, *14*, 1454. <https://doi.org/10.3390/cancers14061454>.
- (85) Fu, R.; Carroll, L.; Yahioglu, G.; Aboagye, E. O.; Miller, P. W. Antibody Fragment and Affibody ImmunoPET Imaging Agents: Radiolabelling Strategies and Applications. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2466–2478.
- (86) Chakravarty, R.; Goel, S.; Cai, W. Nanobody: The “Magic Bullet” for Molecular Imaging? *Theranostics* **2014**, *4* (4), 386–398. <https://doi.org/10.7150/thno.8006>.
- (87) Jovčevska, I.; Muyldermans, S. The Therapeutic Potential of Nanobodies. *BioDrugs* **2020**, *34* (1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s40259-019-00392-z>.
- (88) Broisat, A.; Hernot, S.; Toczek, J.; De Vos, J.; Riou, L. M.; Martin, S.; Ahmadi, M.; Thielens, N.; Wernery, U.; Caveliers, V.; Muyldermans, S.; Lahoutte, T.; Fagret, D.; Ghezzi, C.; Devoogdt, N. Nanobodies Targeting Mouse/Human VCAM1 for the Nuclear Imaging of Atherosclerotic Lesions. *Circ. Res.* **2012**, *110* (7), 927–937. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.265140>.
- (89) D’Huyvetter, M.; Vos, J. D.; Caveliers, V.; Vaneycken, I.; Heemskerk, J.; Duhoux, F. P.; Fontaine, C.; Vanhoeij, M.; Windhorst, A. D.; Aa, F. van der; Hendrikse, N. H.; Eersels, J. L. E.; Everaert, H.; Gykiere, P.; Devoogdt, N.; Raes, G.; Lahoutte, T.; Keyaerts, M. Phase I Trial of <sup>131</sup>I-GMIB-Anti-HER2-VHH1, a New Promising Candidate for HER2-Targeted Radionuclide Therapy in Breast Cancer Patients. *J. Nucl. Med.* **2021**, *62* (8), 1097–1105. <https://doi.org/10.2967/jnumed.120.255679>.
- (90) 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 <sup>68</sup>Ga-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>.
- (91) Jokerst, J. V.; Gambhir, S. S. Molecular Imaging with Theranostic Nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (10), 1050–1060. <https://doi.org/10.1021/ar200106e>.
- (92) Kobayashi, H.; Watanabe, R.; Choyke, P. L. Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects; What Is the Appropriate Target? *Theranostics* **2014**, *4* (1), 81–89. <https://doi.org/10.7150/thno.7193>.
- (93) Nagwa. <https://www.nagwa.com/fr/explainers/640142370207/>.
- (94) Hsu, J. C.; Nieves, L. M.; Betzer, O.; Sadan, T.; Noël, P. B.; Popovtzer, R.; Cormode, D. P. Nanoparticle Contrast Agents for X-ray Imaging Applications. *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* **2020**, *e1642*, 26. <https://doi.org/10.1002/wnan.1642>.
- (95) Tromsdorf, U. I.; Bigall, N. C.; Kaul, M. G.; Bruns, O. T.; Nikolic, M. S.; Mollwitz, B.; Sperling, R. A.; Reimer, R.; Hohenberg, H.; Parak, W. J.; Förster, S.; Beisiegel, U.; Adam, G.; Weller, H. Size and Surface Effects on the MRI Relaxivity of Manganese Ferrite Nanoparticle Contrast Agents. *Nano Lett.* **2007**, *7* (8), 2422–2427. <https://doi.org/10.1021/nl071099b>.
- (96) Wong, P.; Li, L.; Chea, J.; Delgado, M. K.; Crow, D.; Poku, E.; Szpikowska, B.; Bowles, N.; Channappa, D.; Colcher, D.; Wong, J. Y. C.; Shively, J. E.; Yazaki, P. J. PET Imaging of <sup>64</sup>Cu-DOTA-ScFv-Anti-PSMA Lipid Nanoparticles (LNPs): Enhanced Tumor Targeting over Anti-PSMA ScFv or Untargeted LNPs. *Nucl. Med. Biol.* **2017**, *47*, 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2017.01.004>.

- (97) Li, Y.; Du, Y.; Liu, X.; Zhang, Q.; Jing, L.; Liang, X.; Chi, C.; Dai, Z.; Tian, J. Monitoring Tumor Targeting and Treatment Effects of IRDye 800CW and GX1-Conjugated Polylactic Acid Nanoparticles Encapsulating Endostar on Glioma by Optical Molecular Imaging. *Mol. Imaging* **2015**, *14* (7), 356–365.
- (98) Sun, G.; Xu, J.; Hagooley, A.; Rossin, R.; Li, Z.; Moore, D. A.; Hawker, C. J.; Welch, M. J.; Wooley, K. L. Strategies for Optimized Radiolabeling of Nanoparticles for in Vivo PET Imaging. *Adv. Mater.* **2007**, *19* (20), 3157–3162. <https://doi.org/10.1002/adma.200701973>.
- (99) 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. Nanobiotechnol.* **2018**, *16* (1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>.
- (100) Marusyk, A.; Polyak, K. Tumor Heterogeneity: Causes and Consequences. *BBA-Rev. Cancer* **2010**, *1805* (1), 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.11.002>.
- (101) Markwalder, R.; Reubi, J. C. Gastrin-Releasing Peptide Receptors in the Human Prostate: Relation to Neoplastic Transformation. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 1152–1159.
- (102) Wright, G. L.; Haley, C.; Beckett, M. L.; Schellhammer, P. F. Expression of Prostate-Specific Membrane Antigen in Normal, Benign, and Malignant Prostate Tissues. *Urol. Oncol-Semin ORI.* **1995**, *1* (1), 18–28. [https://doi.org/10.1016/1078-1439\(95\)00002-Y](https://doi.org/10.1016/1078-1439(95)00002-Y).
- (103) Reubi, J. C.; Maecke, H. R. Approaches to Multireceptor Targeting: Hybrid Radioligands, Radioligand Cocktails, and Sequential Radioligand Applications. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (Supplement 2), 10S-16S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.186882>.
- (104) Devita, V. T.; Young, R. C.; Canellos, G. P. Combination versus Single Agent Chemotherapy: A Review of the Basis for Selection of Drug Treatment of Cancer. *Cancer* **1975**, *35* (1), 98–110. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197501\)35:1<98::AID-CNCR2820350115>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197501)35:1<98::AID-CNCR2820350115>3.0.CO;2-B).
- (105) Al-Lazikani, B.; Banerji, U.; Workman, P. Combinatorial Drug Therapy for Cancer in the Post-Genomic Era. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30* (7), 679–692. <https://doi.org/10.1038/nbt.2284>.
- (106) Reubi, J. C.; Waser, B. Concomitant Expression of Several Peptide Receptors in Neuroendocrine Tumours: Molecular Basis for in Vivo Multireceptor Tumour Targeting. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30* (5), 781–793. <https://doi.org/10.1007/s00259-003-1184-3>.
- (107) Vauquelin, G. Simplified Models for Heterobivalent Ligand Binding: When Are They Applicable and Which Are the Factors That Affect Their Target Residence Time. *N-S Arch. Pharmacol.* **2013**, *386* (11), 949–962. <https://doi.org/10.1007/s00210-013-0881-0>.
- (108) Vauquelin, G.; Charlton, S. J. Exploring Avidity: Understanding the Potential Gains in Functional Affinity and Target Residence Time of Bivalent and Heterobivalent Ligands: Exploring Bivalent Ligand Binding Properties. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *168* (8), 1771–1785. <https://doi.org/10.1111/bph.12106>.
- (109) Labrijn, A. F.; Janmaat, M. L.; Reichert, J. M.; Parren, P. W. H. I. Bispecific Antibodies: A Mechanistic Review of the Pipeline. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2019**, *18* (8), 585–608. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0028-1>.
- (110) Oostindie, S. C.; Lazar, G. A.; Schuurman, J.; Parren, P. W. H. I. Avidity in Antibody Effector Functions and Biotherapeutic Drug Design. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2022**, *21* (10), 715–735. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00501-8>.
- (111) Heynickx, N. The Salivary Glands as a Dose Limiting Organ of PSMA- Targeted Radionuclide Therapy: A Review of the Lessons Learnt so Far. *Nucl. Med. Biol.* **2021**, 30–39.
- (112) Erez, M.; Takemori, A. E.; Portoghese, P. S. Narcotic Antagonistic Potency of Bivalent Ligands Which Contain .Beta.-Naltrexamine. Evidence for Simultaneous Occupation of Proximal

Recognition Sites. *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 847–849.

(113) Portoghese, P. S.; Ronsisvalle, G.; Larson, D. L.; Yim, C. B.; Sayre, L. M.; Takemori, A. E. Opioid Agonist and Antagonist Bivalent Ligands as Receptor Probes. *Life Sciences* **1982**, *31* (12–13), 1283–1286. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(82\)90362-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(82)90362-9).

(114) Portoghese, P. S.; Larson, D. L.; Sayre, L. M.; Yim, C. B.; Ronsisvalle, G.; Tam, S. W.; Takemori, A. E. Opioid Agonist and Antagonist Bivalent Ligands. The Relationship between Spacer Length and Selectivity at Multiple Opioid Receptors. *J. Med. Chem.* *29*, 1855–1861.

(115) Portoghese, P. S.; Lipkowski, A. W.; Takemori, A. E. Binaltorphimine and Nor-Binaltorphimine, Potent and Selective  $\kappa$ -Opioid Receptor Antagonists. *Life Sciences* **1987**, *40* (13), 1287–1292.

(116) Portoghese, P. S.; Larson, D. L.; Ronsisvalle, G.; Schiller, P. W.; Dung, N. T. M.; Lemieux, C.; Takemori, A. E. Hybrid Bivalent Ligands with Opiate and Enkephalin Pharmacophores. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1991–1994.

(117) Nimczick, M.; Decker, M. New Approaches in the Design and Development of Cannabinoid Receptor Ligands: Multifunctional and Bivalent Compounds. *ChemMedChem* **2015**, *10*, 773–786.

(118) Ferre, S.; Ciruela, F.; Woods, A. S.; Lluís, C.; Franco, R. Functional Relevance of Neurotransmitter Receptor Heteromers in the Central Nervous System. *Trends Neurosci.* **2007**, *30*, 440–446.

(119) Josan, J. S.; Handl, H. L.; Sankaranarayanan, R.; Xu, L.; Lynch, R. M.; Vagner, J.; Mash, E. A.; Hruby, V. J.; Gillies, R. J. Cell-Specific Targeting by Heterobivalent Ligands. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (7), 1270–1278. <https://doi.org/10.1021/bc1004284>.

(120) Tanaka, T.; Nomura, W.; Narumi, T.; Masuda, A.; Tamamura, H. Bivalent Ligands of CXCR4 with Rigid Linkers for Elucidation of the Dimerization State in Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (45), 15899–15901. <https://doi.org/10.1021/ja107447w>.

(121) Judmann, B.; Braun, D.; Wängler, B.; Schirmacher, R.; Fricker, G.; Wängler, C. Current State of Radiolabeled Heterobivalent Peptidic Ligands in Tumor Imaging and Therapy. *Pharmaceuticals* **2020**, *13* (8), 173. <https://doi.org/10.3390/ph13080173>.

(122) Pooja, D. Bombesin Receptors as Potential Targets for Anticancer Drug Delivery and Imaging. *Int. J. Biochem Cell Biol.* **2019**, *114*, 9.

(123) Debordeaux, F.; Chansel-Debordeaux, L.; Pinaquy, J.-B.; Fernandez, P.; Schulz, J. What about  $\text{Av}\beta 3$  Integrins in Molecular Imaging in Oncology? *Nucl. Med. Biol.* **2018**, *62–63*, 31–46. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2018.04.006>.

(124) Li, Z.-B.; Wu, Z.; Chen, K.; Ryu, E. K.; Chen, X.  $^{18}\text{F}$ -Labeled BBN-RGD Heterodimer for Prostate Cancer Imaging. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49* (3), 453–461. <https://doi.org/10.2967/jnumed.107.048009>.

(125) Liu, Z.; Yan, Y.; Chin, F. T.; Wang, F.; Chen, X. Dual Integrin and Gastrin-Releasing Peptide Receptor Targeted Tumor Imaging Using  $^{18}\text{F}$ -Labeled PEGylated RGD-Bombesin Heterodimer  $^{18}\text{F}$ -FB-PEG<sub>3</sub>-Glu-RGD-BBN. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (2), 425–432. <https://doi.org/10.1021/jm801285t>.

(126) Yan, Y.; Chen, K.; Yang, M.; Sun, X.; Liu, S.; Chen, X. A New  $^{18}\text{F}$ -Labeled BBN-RGD Peptide Heterodimer with a Symmetric Linker for Prostate Cancer Imaging. *Amino Acids* **2011**, *41* (2), 439–447. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0762-5>.

(127) Liu, Z.; Niu, G.; Wang, F.; Chen, X.  $^{68}\text{Ga}$ -Labeled NOTA-RGD-BBN Peptide for Dual Integrin and GRPR-Targeted Tumor Imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2009**, *36* (9), 1483–1494. <https://doi.org/10.1007/s00259-009-1123-z>.

(128) Liu, Z.; Li, Z.-B.; Cao, Q.; Liu, S.; Wang, F.; Chen, X. Small-Animal PET of Tumors with  $^{64}$

Cu-Labeled RGD-Bombesin Heterodimer. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50* (7), 1168–1177. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.061739>.

(129) Liu, Z.; Yan, Y.; Liu, S.; Wang, F.; Chen, X. <sup>18</sup>F, <sup>64</sup>Cu, and <sup>68</sup>Ga Labeled RGD-Bombesin Heterodimeric Peptides for PET Imaging of Breast Cancer. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20* (5), 1016–1025. <https://doi.org/10.1021/bc9000245>.

(130) Zhang, J.; Niu, G.; Lang, L.; Li, F.; Fan, X.; Yan, X.; Yao, S.; Yan, W.; Huo, L.; Chen, L.; Li, Z.; Zhu, Z.; Chen, X. Clinical Translation of a Dual Integrin  $\alpha_v\beta_3$  – and Gastrin-Releasing Peptide Receptor–Targeting PET Radiotracer, <sup>68</sup>Ga-BBN-RGD. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (2), 228–234. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.177048>.

(131) Zhang, J.; Mao, F.; Niu, G.; Peng, L.; Lang, L.; Li, F.; Ying, H.; Wu, H.; Pan, B.; Zhu, Z.; Chen, X. <sup>68</sup>Ga-BBN-RGD PET/CT for GRPR and Integrin  $\alpha_v\beta_3$  Imaging in Patients with Breast Cancer. *Theranostics* **2018**, *8* (4), 1121–1130. <https://doi.org/10.7150/thno.22601>.

(132) Jackson, A. B.; Nanda, P. K.; Rold, T. L.; Sieckman, G. L.; Szczodroski, A. F.; Hoffman, T. J.; Chen, X.; Smith, C. J. <sup>64</sup>Cu-NO2A-RGD-Glu-6-Ahx-BBN(7-14)NH2: A Heterodimeric Targeting Vector for Positron Emission Tomography Imaging of Prostate Cancer. *Nucl. Med. Biol.* **2012**, *39* (3), 377–387. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2011.10.004>.

(133) Durkan, K.; Jiang, Z.; Rold, T. L.; Sieckman, G. L.; Hoffman, T. J.; Bandari, R. P.; Szczodroski, A. F.; Liu, L.; Miao, Y.; Reynolds, T. S.; Smith, C. J. A Heterodimeric [RGD-Glu-[<sup>64</sup>Cu-NO2A]-6-Ahx-RM2] Av $\beta$ 3/GRPr-Targeting Antagonist Radiotracer for PET Imaging of Prostate Tumors. *Nucl. Med. Biol.* **2014**, *41* (2), 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2013.11.006>.

(134) Liu, Z.; Huang, J.; Dong, C.; Cui, L.; Jin, X.; Jia, B.; Zhu, Z.; Li, F.; Wang, F. <sup>99m</sup>Tc-Labeled RGD-BBN Peptide for Small-Animal SPECT/CT of Lung Carcinoma. *Mol. Pharmaceutics* **2012**, *9* (5), 1409–1417. <https://doi.org/10.1021/mp200661t>.

(135) Santos-Cuevas, C. L.; Ferro-Flores, G.; Arteaga de Murphy, C.; Ramírez, F. de M.; Luna-Gutiérrez, M. A.; Pedraza-López, M.; García-Becerra, R.; Ordaz-Rosado, D. Design, Preparation, in Vitro and in Vivo Evaluation of <sup>99m</sup>Tc-N2S2-Tat(49–57)-Bombesin: A Target-Specific Hybrid Radiopharmaceutical. *Int. J. Pharm.* **2009**, *375* (1–2), 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.018>.

(136) Bandara, N.; Stott Reynolds, T. J.; Schehr, R.; Bandari, R. P.; Diebolder, P. J.; Krieger, S.; Xu, J.; Miao, Y.; Rogers, B. E.; Smith, C. J. Matched-Pair, <sup>86</sup>Y/<sup>90</sup>Y-Labeled, Bivalent RGD/Bombesin Antagonist, [RGD-Glu-[DO3A]-6-Ahx-RM2], as a Potential Theranostic Agent for Prostate Cancer. *Nucl. Med. Biol.* **2018**, *62–63*, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2018.06.001>.

(137) Jiang L.; Miao Z.; Liu H.; Ren G.; Bao A.; Cutler C. S.; Shi H.; Cheng Z. <sup>177</sup>Lu-Labeled RGD-BBN Heterodimeric Peptide for Targeting Prostate Carcinoma. *Nucl. Med. Commun.* **2013**, *34* (9), 909–914.

(138) Cui, L.; Liu, Z.; Jin, X.; Jia, B.; Li, F.; Wang, F. Evaluation of <sup>188</sup>Re-MAG2-RGD-Bombesin for Potential Prostate Cancer Therapy. *Nucl. Med. Biol.* **2013**, *40* (2), 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2012.11.002>.

(139) Escudero-Castellanos, A.; Ocampo-García, B. E.; Ferro-Flores, G.; Isaac-Olivé, K.; Santos-Cuevas, C. L.; Olmos-Ortiz, A.; García-Quiroz, J.; García-Becerra, R.; Díaz, L. Preparation and in Vitro Evaluation of <sup>177</sup>Lu-IPsMA-RGD as a New Heterobivalent Radiopharmaceutical. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2017**, *314* (3), 2201–2207. <https://doi.org/10.1007/s10967-017-5555-9>.

(140) Reubi, J. C. In Vitro Identification of Vasoactive Intestinal Peptide Receptors in Human Tumors: Implications for Tumor Imaging. *J. Nucl. Med.* **1995**, *36* (10), 1846–1853.

- (141) Lindner, S.; Fiedler, L.; Wängler, B.; Bartenstein, P.; Schirmmacher, R.; Wängler, C. Design, Synthesis and in Vitro Evaluation of Heterobivalent Peptidic Radioligands Targeting Both GRP- and VPAC1-Receptors Concomitantly Overexpressed on Various Malignancies – Is the Concept Feasible? *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *155*, 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.047>.
- (142) Lindner, S.; Rudolf, H.; Palumbo, G.; Oos, R.; Antons, M.; Hübner, R.; Bartenstein, P.; Schirmmacher, R.; Wängler, B.; Wängler, C. Are Heterobivalent GRPR- and VPAC1R-Bispecific Radiopeptides Suitable for Efficient in Vivo Tumor Imaging of Prostate Carcinomas? *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, *48*, 128241. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128241>.
- (143) Zou, L.; Peng, Q.; Wang, P. Progress in Research and Application of HIV-1 TAT-Derived Cell-Penetrating Peptide. *J. Membrane Biol.* **2017**, *250*, 115–122.
- (144) Reubi, J.; Gugger, M.; Waser, B. Co-Expressed Peptide Receptors in Breast Cancer as a Molecular Basis for in Vivo Multireceptor Tumour Targeting. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2002**, *29* (7), 855–862. <https://doi.org/10.1007/s00259-002-0794-5>.
- (145) Shrivastava, A.; Wang, S.-H.; Raju, N.; Gierach, I.; Ding, H.; Tweedle, M. F. Heterobivalent Dual-Target Probe for Targeting GRP and Y1 Receptors on Tumor Cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (3), 687–692. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.11.110>.
- (146) Ghosh, A.; Raju, N.; Tweedle, M.; Kumar, K. *In Vitro* Mouse and Human Serum Stability of a Heterobivalent Dual-Target Probe That Has Strong Affinity to Gastrin-Releasing Peptide and Neuropeptide Y1 Receptors on Tumor Cells. *Cancer Biother. Radio.* **2017**, *32* (1), 24–32. <https://doi.org/10.1089/cbr.2016.2136>.
- (147) Vall-Sagarra, A.; Litau, S.; Decristoforo, C.; Wängler, B.; Schirmmacher, R.; Fricker, G.; Wängler, C. Design, Synthesis, In Vitro, and Initial In Vivo Evaluation of Heterobivalent Peptidic Ligands Targeting Both NPY(Y1)- and GRP-Receptors—An Improvement for Breast Cancer Imaging? *Pharmaceuticals* **2018**, *11* (3), 65. <https://doi.org/10.3390/ph11030065>.
- (148) Aranda-Lara, L. Synthesis and Evaluation of Lys1( $\alpha,\gamma$ -Folate)Lys3(177Lu-DOTA)-Bombesin(1-14) as a Potential Theranostic Radiopharmaceutical for Breast Cancer. *Appl. Radiat. Isotopes* **2016**, *107*, 214–219.
- (149) Aranda-Lara, L.; Ferro-Flores, G.; Ramírez, F. de M.; Ocampo-García, B.; Santos-Cuevas, C.; Díaz-Nieto, L.; Isaac-Olivé, K. Improved Radiopharmaceutical Based on 99mTc-Bombesin–Folate for Breast Tumour Imaging. *Nucl. Med. Commun.* **2016**, *37* (4), 377–386. <https://doi.org/10.1097/MNM.0000000000000460>.
- (150) Capello, A.; Krenning, E. P.; Bernard, B. F.; Breeman, W. A. P.; van Hagen, M. P.; de Jong, M. Increased Cell Death After Therapy with an Arg-Gly-Asp-Linked Somatostatin Analog. *J. Nucl. Med.* **2004**, *45*, 1716–1720.
- (151) Capello, A.; Krenning, E. P.; Bernard, B. F.; Breeman, W. A. P.; Erion, J. L.; de Jong, M. Anticancer Activity of Targeted Proapoptotic Peptides. *J. Nucl. Med.* **2006**, *47*, 122–129.
- (152) Yang, J.; Guo, H.; Gallazzi, F.; Berwick, M.; Padilla, R. S.; Miao, Y. Evaluation of a Novel Arg-Gly-Asp-Conjugated  $\alpha$ -Melanocyte Stimulating Hormone Hybrid Peptide for Potential Melanoma Therapy. *Bioconj. Chem.* **2009**, *20*, 1634–1642.
- (153) Wu, H.; Chen, H.; Pan, D.; Ma, Y.; Liang, S.; Wan, Y.; Fang, Y. Imaging Integrin  $\text{Av}\beta 3$  and NRP-1 Positive Gliomas with a Novel Fluorine-18 Labeled RGD-ATWLPPR Heterodimeric Peptide Probe. *Mol. Imaging Biol.* **2014**, *16* (6), 781–792. <https://doi.org/10.1007/s11307-014-0761-0>.
- (154) Liolios, C.; Schäfer, M.; Haberkorn, U.; Eder, M.; Kopka, K. Novel Bispecific PSMA/GRPr Targeting Radioligands with Optimized Pharmacokinetics for Improved PET Imaging of Prostate Cancer. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (3), 737–751. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00687>.
- (155) Abouzayed, A.; Yim, C.-B.; Mitran, B.; Rinne, S. S.; Tolmachev, V.; Larhed, M.;



Rosenström, U.; Orlova, A. Synthesis and Preclinical Evaluation of Radio-Iodinated GRPR/PSMA Bispecific Heterodimers for the Theranostics Application in Prostate Cancer. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (7), 358. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11070358>.

(156) Eder, M.; Schäfer, M.; Bauder-Wüst, U.; Haberkorn, U.; Eisenhut, M.; Kopka, K. Preclinical Evaluation of a Bispecific Low-molecular Heterodimer Targeting Both PSMA and GRPR for Improved PET Imaging and Therapy of Prostate Cancer. *Prostate* **2014**, *74* (6), 659–668. <https://doi.org/10.1002/pros.22784>.

(157) Lundmark, F.; Abouzayed, A.; Mitran, B.; Rinne, S. S.; Varasteh, Z.; Larhed, M.; Tolmachev, V.; Rosenström, U.; Orlova, A. Heterodimeric Radiotracer Targeting PSMA and GRPR for Imaging of Prostate Cancer—Optimization of the Affinity towards PSMA by Linker Modification in Murine Model. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (7), 614. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070614>.

(158) Sato, D.; Wu, Z.; Fujita, H.; Lindsey, J. Design, Synthesis, and Utility of Defined Molecular Scaffolds. *Organics* **2021**, *2* (3), 161–273. <https://doi.org/10.3390/org2030013>.



**Ligands hétérobivalents :  
Méthodologie, synthèse, et  
caractérisation biologique de  
traceurs ciblant GRPR et  
PSMA**



**Table des matières**

<b>I. Introduction .....</b>	<b>70</b>
<b>1. Réactivité de la 3,6-dichlorotétrazine.....</b>	<b>70</b>
A. Origine et synthèse.....	70
B. Substitution nucléophile aromatique.....	70
C. Réaction de Diels-Alder à demande inverse d'électrons (IEDDA) .....	71
<b>2. La 3,6-dichlorotétrazine comme précurseur de plateforme pour l'imagerie moléculaire ...</b>	<b>72</b>
A. L'utilisation de s-tétrazines pour l'imagerie .....	72
a. L'approche de préciblage (pretargeting) .....	72
b. Pré-marquage de chélateurs bifonctionnels ( <i>prelabeling</i> ) .....	73
B. La 3,6-dichlorotétrazine comme précurseur de plateforme trivalente.....	74
<b>3. PSMA et GRPR : deux cibles de choix pour l'imagerie du cancer de la prostate .....</b>	<b>77</b>
A. Les marqueurs du cancer de la prostate .....	77
a. ACP et PSA .....	77
b. La PSMA .....	78
c. Le GRPR.....	78
B. Ciblage de GRPR et PSMA en médecine nucléaire .....	79
a. Les ligands de PSMA .....	79
b. Les ligands de GRPR .....	85
c. Ligands hétérobivalents ciblant PSMA et GRPR.....	91
<b>II. Synthèse d'une librairie de ligands hétérobivalents ciblant PSMA et GRPR .....</b>	<b>96</b>
<b>1. Conception des ligands .....</b>	<b>96</b>
<b>2. Optimisation et synthèse des ligands.....</b>	<b>98</b>
A. Synthèse de trois ligands hétérobivalents.....	98
a. Synthèse des espaceurs .....	99
b. Fonctionnalisation du motif lysine-urée-acide glutamique .....	99
c. Synthèse et fonctionnalisation de JMV594.....	100
d. Synthèse de Cy5-BCN.....	100
e. Synthèse des ligands hétérobivalents.....	101
B. Mise au point d'une procédure « one-pot » .....	107
C. Synthèse de deux ligands monovalents de référence .....	110
a. Conception.....	111
b. Synthèse de H-(βAla) <sub>2</sub> -JMV594.....	111
c. Assemblage des ligands monovalents .....	112
<b>III. Évaluation de NODAGA-HBL1 pour l'imagerie du cancer de la prostate .....</b>	<b>113</b>
<b>1. Études in vitro .....</b>	<b>113</b>
A. Radiomarquage et évaluation de l'hydrophilie (logD).....	113
B. Mesure des constantes de dissociation et du pourcentage d'internalisation sur cellules PC3 et 22Rv1 .....	113
<b>2. Études in vivo et ex vivo .....</b>	<b>114</b>
A. Radiomarquage .....	115
B. Modèle murin.....	115
C. Étude TEP.....	116
a. Traceurs de référence [ <sup>68</sup> Ga]Ga-PSMA11 et [ <sup>68</sup> Ga]Ga-AMBA .....	116
b. Traceurs JMV594-MVL, PSMA-MVL, NODAGA-HBL1 et DOTA-HBL1 .....	117
<b>IV. Synthèse de ligands hétérobivalents présentant 3, 4 et 5 itérations de β Alanine ....</b>	<b>127</b>
<b>1. Synthèse des espaceurs et couplage à KuE et JMV594.....</b>	<b>127</b>

<b>2. Assemblage des ligands hétérobivalents .....</b>	<b>129</b>
<b><i>Conclusion et perspectives .....</i></b>	<b>130</b>
<b><i>Bibliographie .....</i></b>	<b>131</b>

## I. Introduction

### 1. Réactivité de la 3,6-dichlorotétrazine

#### A. Origine et synthèse

Avant d'être utilisée comme une plateforme trivalente, la 3,6-dichlorotétrazine fut protégée comme herbicide par le groupe BASF, dans un brevet publié en 1986<sup>1</sup>. La 3,6-dichlorotétrazine appartient à la famille des tétrazines symétriques (*s*-tétrazines). Elle peut notamment être obtenue à partir de la 3,6-bis(3,5-diméthyl-1H-pyrazol-1-yl)-*s*-tétrazine dont la synthèse a été décrite par le groupe de Hiskey<sup>2</sup>. Les groupements diméthylpyrazolyl peuvent être substitués par des groupements hydrazine qui sont ensuite remplacés par des chlores au moyen d'une substitution nucléophile aromatique dans l'acétonitrile en présence de dichlore<sup>3</sup> ou d'acide trichloroisocyanurique<sup>4</sup> (Figure 37).

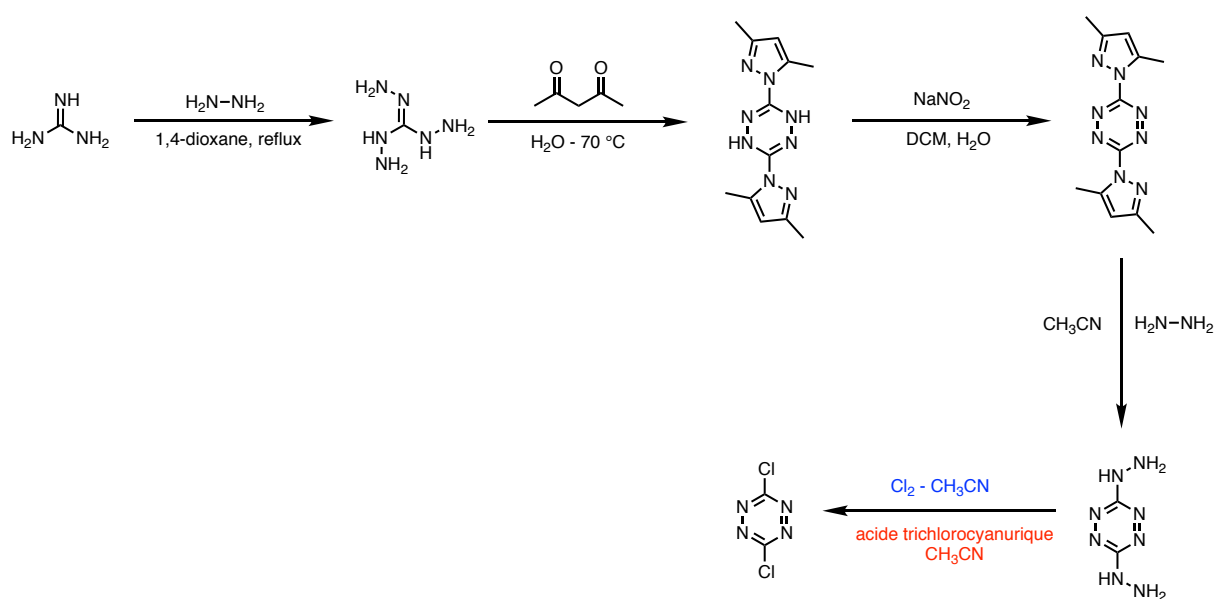


Figure 37 : Schéma réactionnel de la synthèse de la 3,6-dichlorotétrazine

#### B. Substitution nucléophile aromatique

En raison de la présence des deux atomes de chlore, qui constituent de bons groupes partants, la 3,6-dichlorotétrazine peut être substituée par différents types de nucléophiles. Les premières réactions de type  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$  sur des *s*-tétrazines ne concernaient que les nucléophiles de la famille des amines<sup>5,6</sup> et des alcools<sup>7</sup>. Une étude, publiée en 2003 par l'équipe de Kotchy, s'est intéressée à la réactivité de tétrazines symétriques, dont la 3,6-dichlorotétrazine, au regard de la  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$  avec différents types de nucléophiles<sup>8</sup>. Il en ressort qu'après réaction avec des amines primaires, la chlorotétrazine monosubstituée est formée de manière majoritaire. Au contraire, l'utilisation d'alcools ou de thiols tend à générer une forte proportion de tétrazine disubstituée. Cette perte de réactivité de la chlorotétrazine monosubstituée est expliquée par l'augmentation de la densité électronique conférée par l'atome d'azote du substituant et permet d'isoler les dérivés monosubstitués de la *s*-chlorotétrazine avec de bons rendements. En 2006, le groupe de Audebert a mis en évidence la meilleure réactivité des thiols au regard de la  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$  de *s*-chlorotétrazines monosubstituées en réalisant la synthèse d'un cyclophane<sup>9</sup>

(Figure 38). Cette propriété s'explique par l'enrichissement électronique de l'hétérocycle après substitution par un atome d'oxygène ou d'azote, stabilisant ainsi la chlorotétrazine. Pour effectuer la seconde substitution, il est donc nécessaire d'utiliser un nucléophile plus fort, comme un thiol, ce qui instaure une forme d'orthogonalité entre les deux réactions de substitution.

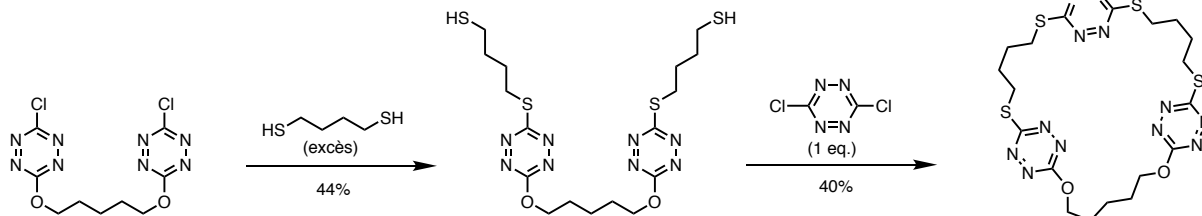


Figure 38: Synthèse d'un cyclophane de tétrazine selon le groupe d'Audebert

### C. Réaction de Diels-Alder à demande inverse d'électrons (IEDDA)

La seconde voie de fonctionnalisation des s-tétrazines, qui les rendent particulièrement intéressantes, est la cycloaddition [4+2] par un mécanisme de réaction de Diels-Alder à demande inverse d'électrons (IEDDA) avec un alcyne ou un alcène contraint<sup>5,10,11</sup>. L'intermédiaire tricyclique ainsi obtenu évolue en pyridazine, ou dihydropyridazine suivant la nature du diénophile, après une étape de rétro-Diels-Alder (Figure 39). Les 1,2,4,5-tétrazines 3,6-disubstituées sont d'excellents substrats pour la réaction de IEDDA car il s'agit d'une réaction très chimiospécifique (dite « click ») qui peut être conduite en milieu biologique et qui, contrairement à la célèbre cycloaddition 1,3-dipolaire d'azotures et d'alcyne catalysée au cuivre (CuAAC), ne nécessite pas l'addition de catalyseurs tels que le cuivre (cytotoxique)<sup>12,13</sup>. Un autre désavantage de l'utilisation de Cu(I) en milieu biologique est sa tendance à dismuter et facilement s'oxyder en présence d'oxygène. Il est donc nécessaire d'utiliser un réducteur, usuellement l'ascorbate de sodium, pour régénérer le Cu(I). Ce cycle d'oxydo-réduction génère des espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) qui vont dégrader les biomolécules par oxydation<sup>14</sup>.

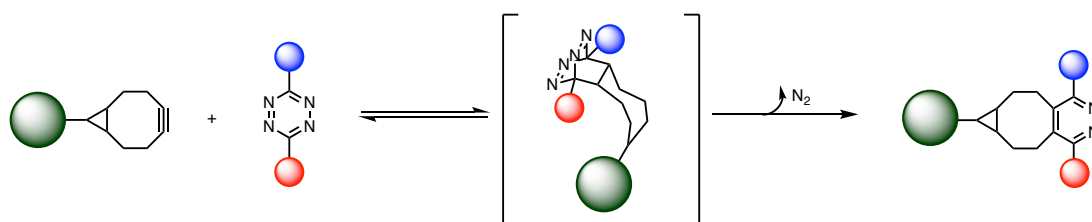


Figure 39 : Schéma réactionnel d'une réaction de type IEDDA entre un bicyclononyne<sup>15</sup> et une tétrazine disubstituée

En plus d'être chimiospécifique, la IEDDA possède une constante cinétique d'ordre deux très élevée comparée à celle de la réaction de CuAAC ou à celle de la *strain-promoted azide-alkyne cycloaddition* (SPAAC)<sup>16</sup> (Tableau 6).

Nom	Schéma réactionnel	Constante cinétique	Avantages/Inconvénients
CuAAC		10-100 (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) (0.5 % Cu) <sup>17</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peu d'encombrement stérique</li> <li>- Peu coûteux</li> <li>- Cytotoxicité du catalyseur</li> <li>- Constante cinétique élevée</li> </ul>
SPAAC		1-60 (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) <sup>18</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Constante cinétique modérément élevée</li> <li>- Pas de catalyseur</li> </ul>
IEDDA		1-10 <sup>6</sup> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) <sup>19</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Encombrement stérique des deux partenaires</li> <li>- Coûteux</li> <li>- Pas de catalyseur</li> <li>- Constante cinétique très élevée</li> </ul>

Tableau 6 : Schémas réactionnels et caractéristiques des réactions de chimie « click » usuellement utilisées en bioconjugaison (adapté de la littérature<sup>16</sup>)

## 2. La 3,6-dichlorotétrazine comme précurseur de plateforme pour l'imagerie moléculaire

### A. L'utilisation de s-tétrazines pour l'imagerie

La cinétique élevée de la conjugaison par IEDDA, sa chimiospécificité, l'absence de nécessité d'utiliser un catalyseur et la possibilité d'effectuer cette réaction en milieu biologique ont fait des s-tétrazines des substrats de choix pour des applications biomédicales, dans lesquelles elles sont de plus en plus utilisées et notamment en imagerie.

#### a. L'approche de préciblage (pretargeting)

On peut notamment souligner l'utilité des 1,2,4,5-tétrazines disubstituées dans l'approche dite de préciblage (en anglais *pretargeting*) consistant à incuber une cible (protéine, récepteur, enzyme, oligonucléotide) avec son ligand fonctionnalisé par un motif tétrazine, azoture, ou alcyne/alcène contraint (Figure 40, 1) puis, une fois que l'association ligand-cible est effectuée, à ajouter dans un second temps l'agent d'imagerie désiré fonctionnalisé avec le partenaire correspondant (Figure 40, 2). Cette approche a l'avantage de limiter l'éventuelle perte d'affinité due à la présence de l'agent d'imagerie à proximité du ligand.

*In vivo*, et en particulier dans le cadre de la médecine nucléaire, lorsque des biomolécules à pharmacocinétique lente (comme les anticorps) sont utilisées comme vecteurs, cette approche permet l'utilisation de radioéléments à courte demi-vie limitant ainsi une circulation longue de la radioactivité dans l'organisme et de la contraindre aux zones ciblées<sup>20,21</sup>. De façon similaire, lorsque les anticorps sont combinés avec des isotopes dits thérapeutiques (émetteurs β<sup>-</sup> ou α), cette approche permet de limiter le taux d'exposition des organes non ciblés par le radioconjugué.

Cette approche de *pretargeting* est de plus utilisée aussi bien *in vitro*<sup>22,23,24</sup> que *in vivo*<sup>25,26</sup>.

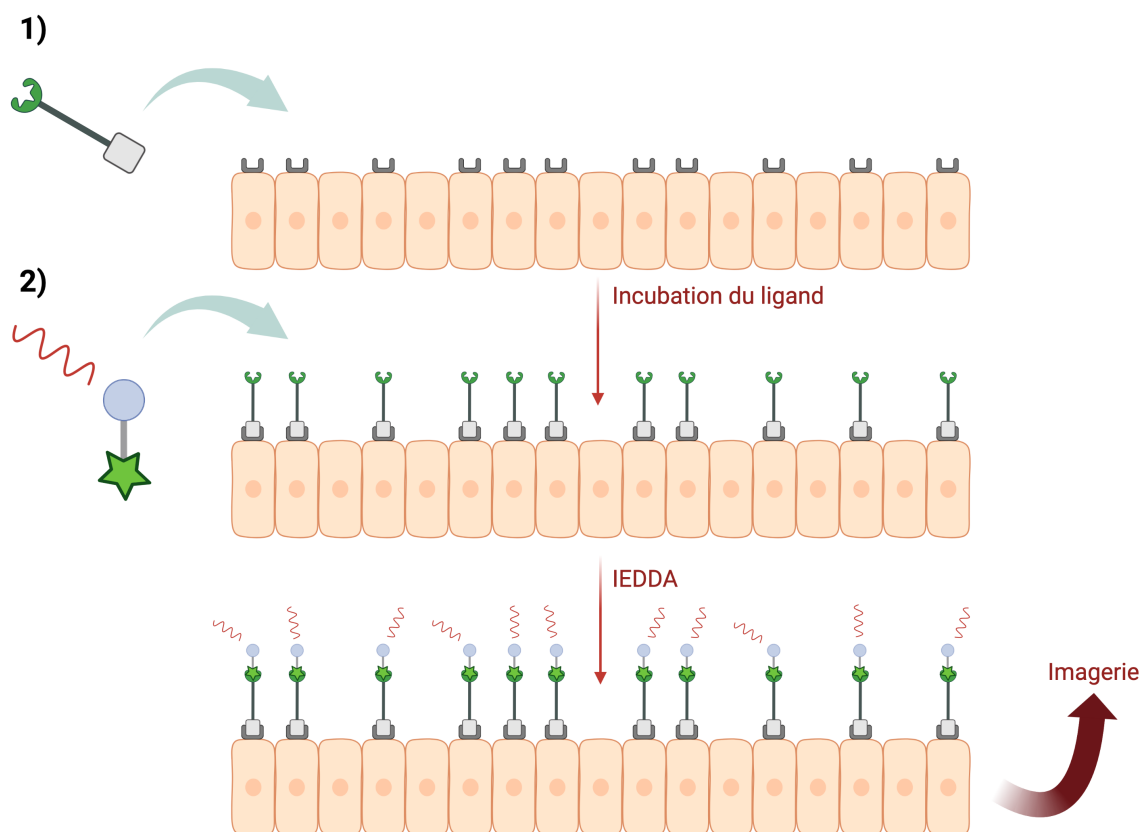


Figure 40 : Schéma illustratif de l'approche de préciblage en imagerie. 1) Incubation du ligand fonctionnalisé avec l'un ou l'autre des partenaires pour la réaction de IEDDA (alcyne/alcène contraint ou tétrazine). 2) Ajout de la sonde d'imagerie (fluorophore, complexe chélateur-radiométal...) porteuse du partenaire complémentaire pour la IEDDA

### b. Pré-marquage de chélateurs bifonctionnels (*prelabeling*)

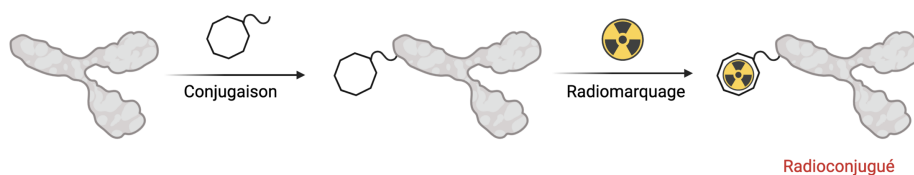
Une autre problématique rencontrée en médecine nucléaire est le marquage des biomolécules avec un radioélément. Usuellement, le vecteur est fonctionnalisé avec un agent chélatant et le conjugué est ensuite marqué avec le radiométal désiré (Ga-68, In-111, Cu-64...) avant d'être injecté<sup>27</sup>.

Cependant, certains radionucléides, comme le zirconium-89 (cf. chapitre 3), nécessitent l'utilisation de conditions réactionnelles poussées (température élevée, par exemple) pour être incorporés dans certains agents chélatants. Ces conditions sont incompatibles avec les biomolécules les plus fragiles<sup>28</sup>.

La réaction IEDDA entre une *s*-tétrazine et un alcyne/alcène contraint, du fait de sa constante de cinétique très élevée, permet de réaliser l'étape de conjugaison à la biomolécule après la complexation du radioélément au sein du chélateur<sup>29</sup>. Cette approche, que l'on peut appeler approche de pré-marquage (ou *prelabeling* en anglais), confère une plus grande liberté dans les conditions de radiomarquage, permettant ainsi d'améliorer les rendements radiochimiques tout en limitant les risques de dégradation du vecteur (Figure 41).

Le concept de pré-marquage ne se limite pas uniquement aux complexes chélateurs-radiométaux. Les *s*-tétrazines peuvent également être utilisées pour la synthèse de radioconjugués au fluor-18<sup>30,31</sup>.

Marquage classique



Pré-marquage

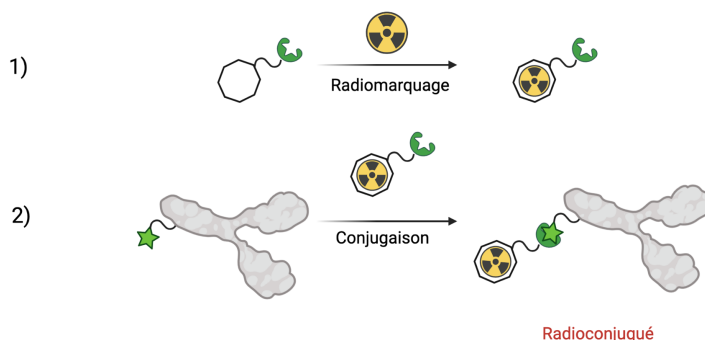


Figure 41 : Schéma illustratif de l'approche de pré-marquage en bioconjugaison. Partie haute, la biomolécule est fonctionnalisée avec un chélateur puis l'ensemble est radiométalé. Partie basse, le chélateur est fonctionnalisé avec une fonction réactive et ensuite radiométalé. Le complexe radiométal-chélateur est ensuite mis à réagir avec la biomolécule qui est fonctionnalisée avec la fonction réactive complémentaire de celle couplée au chélateur

## B. La 3,6-dichlorotétrazine comme précurseur de plateforme trivalente

Les plateformes multivalentes permettent l'assemblage covalent de différentes sondes ou molécules, autour d'une structure unique. En imagerie moléculaire, l'emploi de ce type d'outils facilite notamment l'accès à des sondes d'imageries multimodales ou, comme étudié dans cette thèse, à des agents d'imageries multispécifiques. Ainsi, le développement de tels édifices a été largement étudié ces deux dernières décennies<sup>32</sup>. La chimiospécificité des réactions de  $S_NAr$  et l'orthogonalité de la cycloaddition IEDDA font de la 3,6-dichlorotétrazine un candidat sérieux quant à son utilisation en tant que plateforme trivalente.

La première étude dans laquelle le caractère trivalent de la dichlorotétrazine a été mis en avant date de 2013. Dans leur communication, l'équipe de Hotha décrit la synthèse d'une tétrazine dissymétrique, fonctionnalisée avec un sucre peracétylé et un tripeptide protégé, sur laquelle a été greffé, par IEDDA, un fluorophore (Figure 42)<sup>10</sup>.

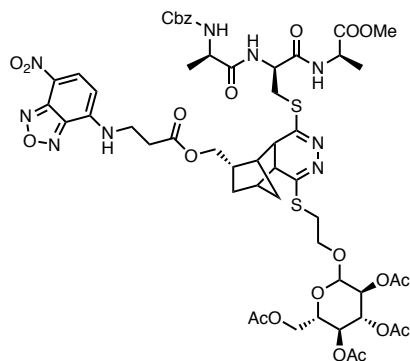


Figure 42 : Structure du conjugué ternaire synthétisé par l'équipe de Hotha à partir de la 3,6-dichlorotétrazine<sup>10</sup>

Cependant, l'aspect bioorthogonal de la réaction de « click » sur la tétrazine disubstituée n'a été mis en valeur que plus tard, au sein de notre équipe à Dijon. En effet, dans une étude publiée en 2018 dans *Angewandte Chemie*<sup>33</sup>, la 3,6-dichlorotétrazine a été utilisée avec succès pour le marquage bimodal d'un résidu cystéine de l'albumine de sérum bovin (BSA), protéine bien connue pour s'accumuler dans les tissus tumoraux par effet EPR, « enhanced permeability and retention »<sup>34</sup> (Figure 43).

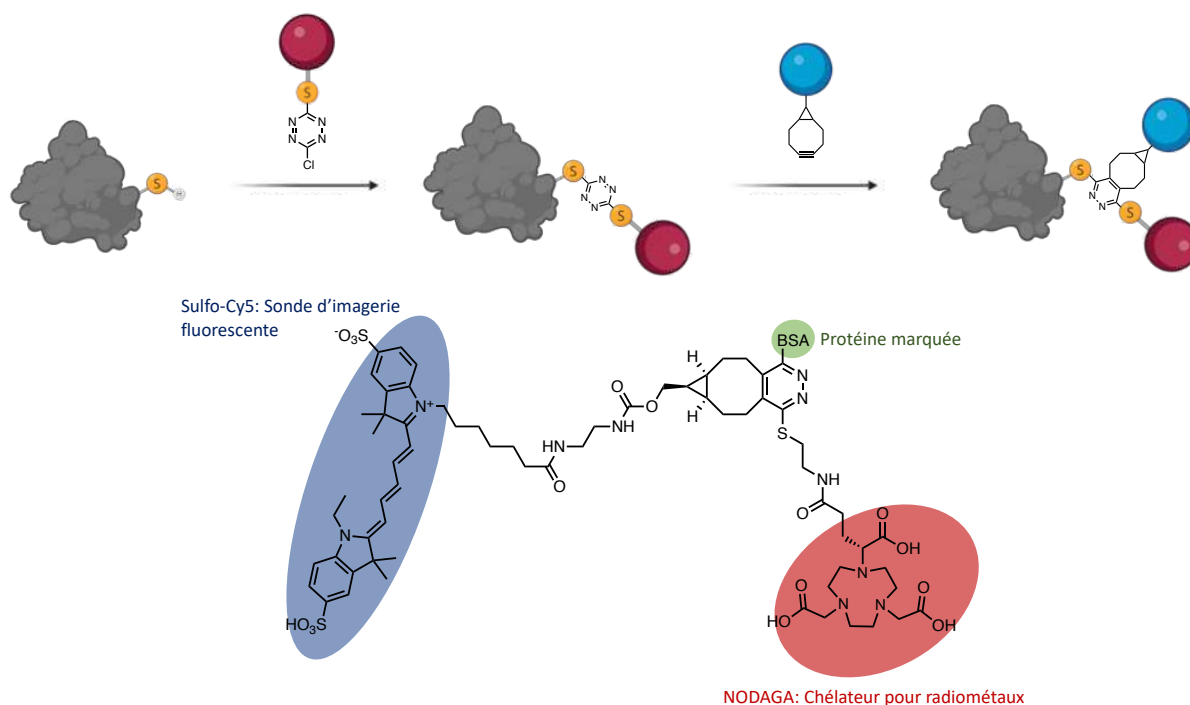


Figure 43 : Schéma illustratif de la conjugaison spécifique de résidus cystéines sur une protéine au moyen d'une chlorotétrazine monosubstituée (haut) et structure du bioconjugué bimodal décrit par Canovas et al.<sup>33</sup> (bas).

Cette étude montre en particulier un aspect intéressant de la réactivité de cette petite molécule : en effectuant la première  $S_NAr$  au moyen d'un substituant fonctionnalisé par un thiol, ici le polyazamacrocycle NODAGA, la seconde substitution se produit spécifiquement avec des thiols, même en présence d'autres nucléophiles comme des phénols ou des amines, lorsque la réaction est réalisée à 37 °C. En revanche, lorsque la première  $S_NAr$  est effectuée grâce à une amine, la seconde substitution avec un thiol n'est pas observée en dessous de 50 °C. Cet article prouve ainsi la pertinence du choix de la 3,6-dichlorotétrazine comme précurseur de plateforme trivalente, en l'exemplifiant avec la synthèse d'un conjugué bimodal, autorisant



l'utilisation de deux modalités d'imagerie complémentaires au moyen d'une seule entité moléculaire.

Dans une autre étude, publiée en 2019, la 3,6-dichlorotétrazine a de nouveau été utilisée par notre groupe pour la conjugaison de biomolécules<sup>35</sup>. Cette fois, des tétrazines dissymétriques ont été greffées à un anticorps préalablement modifié pour porter des fonctions bicyclononyne (BCN). La première  $S_NAr$  a été réalisée en milieu aqueux dans un tampon borate (pH 8, 0.5 M) avec du NODAGA ou du DOTAGA fonctionnalisé avec une amine. Les études menées sur la seconde substitution ont montré une nouvelle fois la spécificité de la monochlorotétrazine pour les thiols. En effet, la réaction avec un substituant porteur d'un groupement amine n'a mené qu'à la dégradation de la tétrazine, même à haute température dans le DMF (120 °C). La réaction avec ce même substituant fonctionnalisé par un thiol a permis d'obtenir la tétrazine disubstituée avec un bon rendement (Figure 44). Comme évoqué dans le paragraphe précédent, l'utilisation d'une amine comme nucléophile pour la première substitution implique la nécessité de réaliser la seconde à une température plus élevée, ici 75 °C. Cette perte de réactivité après la première substitution peut apparaître comme un désavantage, cependant elle instaure une forme d'orthogonalité entre les deux substitutions, facilitant ainsi la formation de tétrazines dissymétriquement substituées. On appellera cette méthode de fonctionnalisation de la 3,6-dichlorotétrazine l'approche « amine-thiol ».

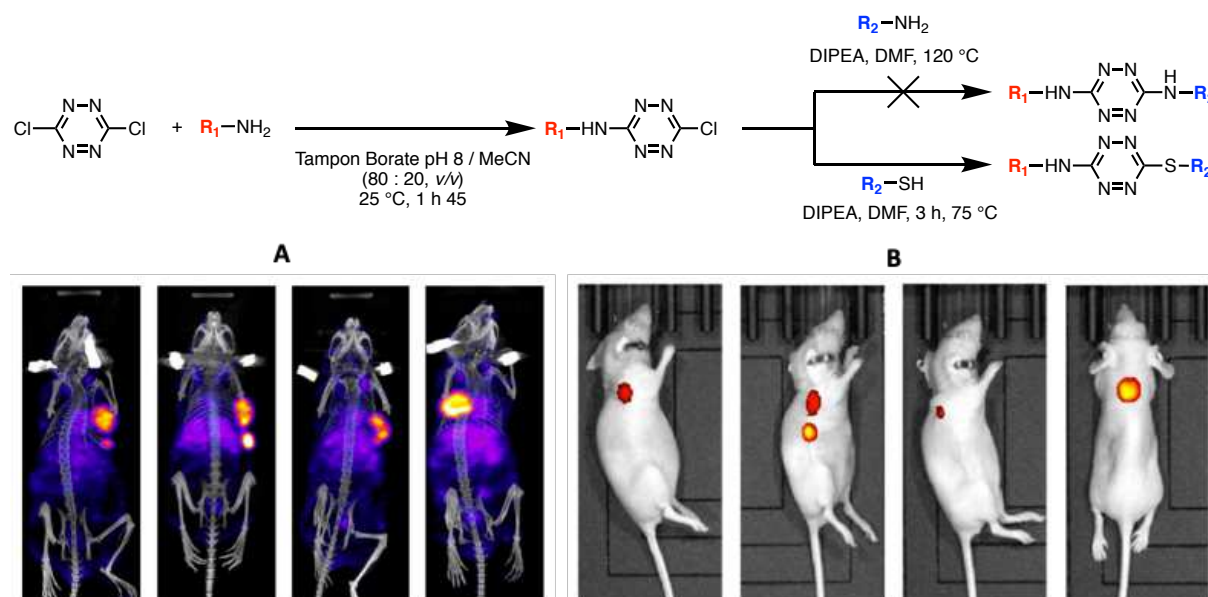


Figure 44 : Schéma réactionnel de la synthèse de tétrazines disubstituées.  $R_1$  = DOTAGA ou NODAGA,  $R_2$  = Rhodamine B, Cy5, Sulfo-Cy5, ou BODIPY (haut) ; Images obtenues par TEMP couplée à un tomodesitogramme 24 h p.i. (bas, A) ; Images obtenues par imagerie par fluorescence 24 h p.i. (Ex/Em : 620/670 nm) (bas, B)<sup>35</sup>.

Par la suite, une tétrazine disubstituée par un DOTAGA et une Cy5 a été greffée par réaction de IEDDA à du trastuzumab, un anticorps monoclonal utilisé pour cibler les tumeurs surexprimant le récepteur HER2 (cancer du sein)<sup>36</sup>. Le bioconjugué ainsi obtenu a été radiomarqué à l'indium-111 (émetteur  $\gamma$ ) puis injecté à des souris xénotransplantées avec des cellules BT-474 surexprimant le récepteur HER2. Les souris ainsi traitées ont ensuite été imagées en TEMP-CT et en imagerie par fluorescence (Figure 44). Il ressort de ces images que le traceur ainsi synthétisé est capable de s'accumuler dans les tumeurs ciblées de façon spécifique.

L'utilisation de la 3,6-dichlorotétrazine comme précurseur de plateforme trivalente a ensuite été explorée une dernière fois dans notre laboratoire dans une étude publiée en 2021<sup>37</sup>. L'objectif de ces travaux était la vectorisation d'un agent d'imagerie nucléaire et d'un photosensibilisateur, pour la thérapie photodynamique, avec un nanobody (nanobody 7D12 spécifique du récepteur EGFR)<sup>38</sup>. Pour ce faire, un agent chélatant, le DTPA, et l'IRDye-700DX, un photosensibilisateur de type phtalocyanine, ont été introduits sur la 3,6-dichlorotétrazine en utilisant l'approche amine-thiol. La tétrazine ainsi obtenue a ensuite été conjuguée au nanobody-BCN. Après radiomarquage à l'indium-111, le radioconjugué a été testé *in vitro* et *in vivo* et a démontré sa capacité à se lier spécifiquement aux récepteurs ciblés.

En raison de la chimiospécificité de la  $S_NAr$  de la chlorotétrazine monosubstituée et de la bioorthogonalité de la réaction de IEDDA, il est plutôt aisé de générer des conjugués ternaires dissymétriques à partir de la 3,6-dichlorotétrazine. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser cette petite molécule pour la synthèse de nos composés hétérobivalents.

### 3. PSMA et GRPR : deux cibles de choix pour l'imagerie du cancer de la prostate

Le cancer de la prostate (PCa) est le troisième cancer le plus courant, derrière les cancers du sein et du poumon, et le troisième cancer le plus mortel dans le monde<sup>39</sup>. En 2018, 1 276 106 nouveaux cas de Pca ont été diagnostiqués et 358 989 personnes ont succombé des suites de cette maladie<sup>40</sup>. Une caractéristique de PCa est son développement lent et asymptomatique aux premiers stades de la maladie<sup>39</sup>. Malgré les progrès effectués pour le diagnostic précoce de cette maladie, le PCa reste tout de même une des premières causes de mortalité chez les hommes (première aux USA). C'est pourquoi il est nécessaire de développer de nouveaux agents d'imagerie permettant le dépistage précoce de ce cancer.

#### A. Les marqueurs du cancer de la prostate

##### a. ACP et PSA

Depuis les années 1930 et jusqu'aux années 1980, la phosphatase acide (ACP) était le seul marqueur du cancer de la prostate. Des taux anormalement élevés de cette enzyme dans le sérum suggèrent la présence d'un PCa au stade avancé ou métastatique<sup>41</sup>. Bien qu'assez spécifique des stades métastatiques, le dosage de cette enzyme a peu à peu été abandonné à la faveur de la PSA (*Prostate specific antigen*), en raison de sa trop faible sensibilité<sup>42</sup>. La PSA est une glycoprotéine dont le dosage, en plus de pouvoir détecter la maladie, permet de suivre la réponse aux traitements<sup>41</sup>. Cependant, si dans la plupart des cas un PCa entraîne un taux élevé de PSA, la réciproque n'est pas vraie, et l'utilisation de la PSA comme marqueur du cancer de la prostate entraîne pléthore de faux-négatifs. Le diagnostic doit ainsi être complété par un examen digital ou une (voire plusieurs) biopsie de la prostate afin de confirmer la présence de la maladie<sup>43</sup>. D'autres marqueurs membranaires peuvent également attester de la présence d'un cancer de la prostate. C'est le cas du *prostate-specific-membrane antigen* (PSMA) et du récepteur couplé aux protéines G (RCPG) *Gastrin-releasing-peptide receptor* (GRPR) parmi d'autres.

### b. La PSMA

La PSMA ou Glutamate carboxypeptidase II (EC 3.4.17.21) est une glycoprotéine transmembranaire à activité protéase dont le rôle est l'hydrolyse d'un neurotransmetteur appelé *N*-acétyl-L-aspartyl-L-glutamate (NAAG) libérant ainsi un ion *N*-acétyl-L-aspartate et un ion L-glutamate. Une concentration en L-glutamate trop élevée est corrélée à des dommages neurologiques<sup>44</sup>.

Une autre particularité de cette métalloprotéase est qu'elle est surexprimée dans la vaste majorité des tumeurs malignes de la prostate. Plusieurs études, qui consistaient à évaluer l'expression de la PSMA dans une série de tissus prostatiques non tumoraux, tumoraux bénins et malins, ont démontré que l'expression de cette protéine transmembranaire est spécifique des tissus tumoraux malins et métastatiques<sup>45,46</sup>. Cette spécificité pour les tissus malins fait de la PSMA une cible de choix pour le diagnostic et la thérapie de ce type de cancers, bien que cette protéine soit majoritairement surexprimée dans des stades tardifs de la maladie.

### c. Le GRPR

Le (ou encore *gastrin-releasing peptide receptor*, BB2, BRS2 ou *bombesin receptor subtype 2*) est un RCPG appartenant à la famille des récepteurs à bombésine qui est impliqué dans un très grand nombre de processus biologiques, comme la sécrétion d'hormones gastro-intestinales<sup>47</sup>. Parmi les effets physiologiques de l'activation du GRPR on note la régulation de la sécrétion de l'acide gastrique (*via* à la fois la stimulation de la libération de gastrine et somatostatine), la régulation de la motilité gastro-intestinale, en particulier la vidange gastrique, du transit de l'intestin grêle et de la vidange de la vésicule biliaire. On compte également la stimulation de la sécrétion du pancréas, la libération d'insuline, et le transport colique des ions *via* la stimulation de la sécrétion d'une variété d'hormones (gastrine, somatostatine, CCK, polypeptide pancréatique, entéroglucagon, glucagon pancréatique).

L'activation du GRPR a un certain nombre d'effets immunologiques y compris un rôle de chimioattractant pour les macrophages, monocytes et lymphocytes dans le péritoine, de stimulant de la prolifération des lymphocytes et de la cytotoxicité des leucocytes. Le GRPR est largement exprimé dans le système nerveux central et dans la moelle épinière, et de nombreux effets centraux ont été décrits, avec des effets sur la satiété, la régulation du rythme circadien, la thermorégulation, le comportement de toilettage, la modulation du stress, de la peur, de la réponse à l'anxiété et la mémoire<sup>48</sup>. Étant donné son rôle biologique, le GRPR est exprimé dans l'appareil gastro-intestinal (estomac et intestins) et particulièrement dans le pancréas.

Dans le cancer de la prostate, contrairement à la PSMA, la surexpression de GRPR survient principalement aux stades précoces de la maladie<sup>49</sup>. Plusieurs études ont démontré que l'expression de GRPR à des stades avancés de la maladie pouvait être nulle<sup>47</sup>, ce qui en fait un marqueur précoce de ce type de cancer.

Il est également intéressant de noter que les autres membres de la famille des récepteurs de la bombésine, le récepteur à la Neuromédine B (ou BRS1) ainsi que le récepteur de sous-type 3 (ou BRS3) sont surexprimés avec des abondances et des incidences variables dans une très large gamme de tumeurs notamment dans les carcinoïdes intestinaux (BRS1), carcinomes des

cellules rénales (BRS3) ou carcinoïdes des bronches (BRS1 et BRS3)<sup>50</sup>, ce qui a motivé la recherche de radioligands universels (dits « *pan*-bombesin ligands ») de ces récepteurs.

## B. Ciblage de GRPR et PSMA en médecine nucléaire

### a. Les ligands de PSMA

#### *Les anticorps monoclonaux*

Les premiers ligands mis au point pour le ciblage de la PSMA furent des anticorps monoclonaux. On peut en particulier citer l'exemple du capromab (ou 7E11-C5.3), un anticorps murin spécifique du domaine intracellulaire de la PSMA<sup>51</sup>. Bien que le radioconjugué [<sup>111</sup>In]In-capromab (Prostascint) soit approuvé par la « Food and Drug Administration » (FDA) depuis 1996 comme agent d'imagerie, son utilisation est cependant peu répandue en raison de sa faible internalisation dans les cellules limitant son accès à la PSMA aux seules cellules mortes ou en cours d'apoptose<sup>52</sup>.

D'autres anticorps, ayant cette fois pour cible le domaine extracellulaire de la PSMA, ont démontré des propriétés supérieures pour le diagnostic et la thérapie du PCa<sup>53</sup>. L'avantage de ces agents d'imagerie est qu'ils peuvent se lier à des cellules vivantes, leur cible se trouvant à la surface des membranes des cellules cancéreuses. Parmi eux, [<sup>111</sup>In]In-J591, un anticorps humanisé radiomarqué à l'indium-111, émetteur TEMP, a montré de bons résultats précliniques et est dorénavant entré en phase I d'essais cliniques<sup>54,55</sup>. Cet anticorps, radiomarqué avec du lutetium-177 et de l'yttrium-90, est également en essai clinique de phase II pour la radiothérapie interne vectorisée du cancer de la prostate<sup>54</sup>.

#### *Les ligands phosphorés*

Il est également possible de cibler la PSMA à l'aide de petites molécules inhibitrices de l'activité enzymatique de la protéine. Parmi elles, les ligands phosphorés présentent une forte affinité pour la PSMA. Le 2-PMPA (acide 2-(phosphonométhyl)-pentanedioïque) est une petite molécule hydrophile développée en 1996 pour inhiber la PSMA (Figure 45)<sup>56</sup> qui présente également l'avantage de pouvoir être administrée par voie orale.

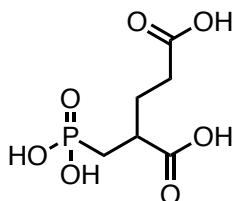


Figure 45 : Structure de la 2-PMPA

Plusieurs dérivés de la 2-PMPA radiomarqués ont ensuite été étudiés en essais précliniques. C'est notamment le cas de CTT-54, un inhibiteur de la PSMA fonctionnalisé avec un analogue de DTPA comme agent chélatant du technétium-99 métastable<sup>57</sup>, émetteur gamma (Figure 46). Ce traceur a montré sa capacité à se lier de manière irréversible à la PSMA et à être internalisé à hauteur de 70 % après 30 minutes d'incubation. Des études ont également été effectuées avec des émetteurs  $\beta^+$  pour l'imagerie TEP, c'est le cas de ABN-1 (Figure 46), radiomarqué au cuivre-64. Ce traceur a été notamment testé *in vivo* et a démontré sa capacité à se lier aux cellules tumorales surexprimant PSMA en affichant de bons ratios tumeur/organes sains (Figure 46).

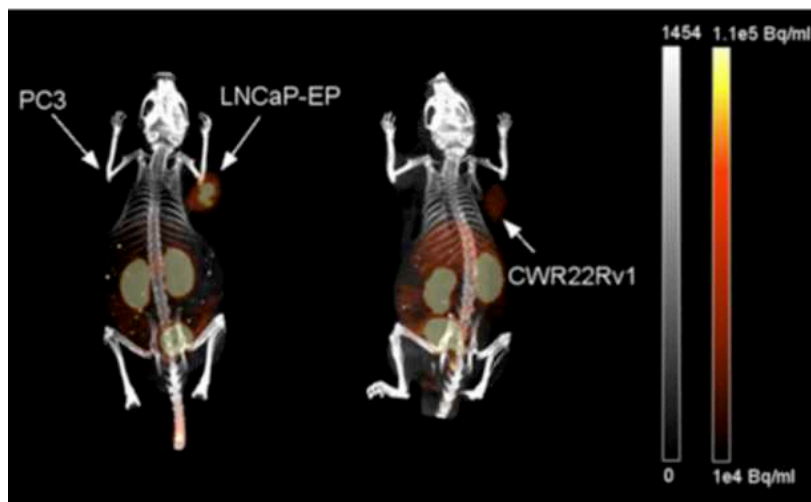
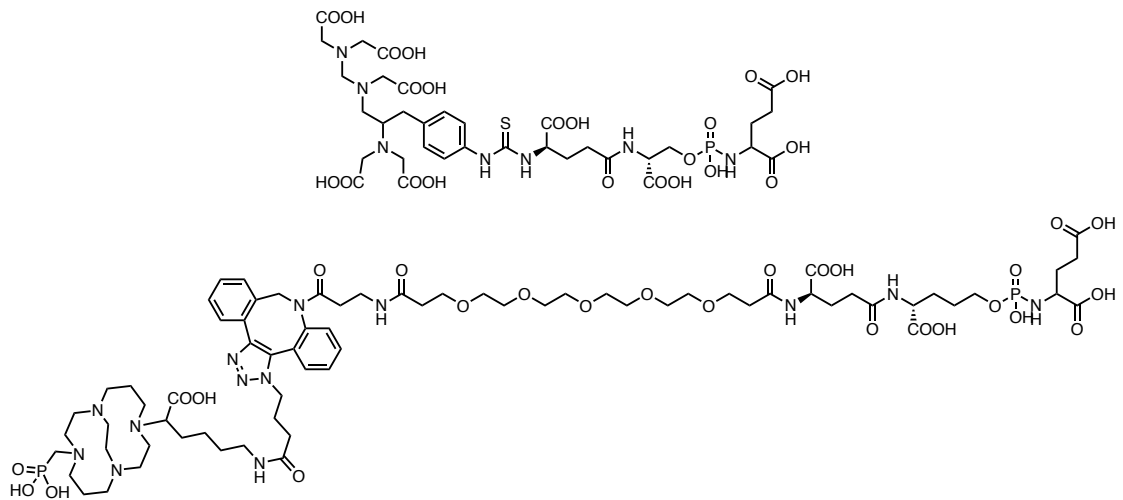


Figure 46 : Structure de CTT-54 (haut), de ABN-1 (milieu), et images TEP/CT obtenues 4 h après injection de  $^{64}\text{Cu}$ -ABN-1 dans des souris xénotreffées avec des cellules PC3 (PSMA négatives) LNCaP-EP et CWR22Rv1 (PSMA positives).

En plus de démontrer sa capacité à s'accumuler dans les tumeurs exprimant la PSMA, l'accumulation observée est spécifique puisqu'on n'observe aucune accumulation de signal dans les tumeurs négatives à la PSMA (PC3).

### Les ligands thiolés

Les dérivés thiolés, et notamment la 2-MPPA (Figure 47), ont été les premiers inhibiteurs de la PSMA testés chez l'homme<sup>58</sup>. Cependant, et ce malgré de bonnes valeurs d' $\text{IC}_{50}$ , leur instabilité chimique en particulier au regard de l'oxydation n'a pas permis d'en faire des traceurs efficaces.

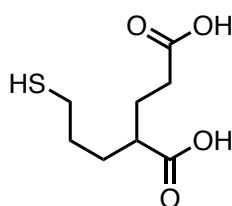


Figure 47 : Structure de la 2-MPPA

### Les ligands uréiques

Une dernière classe d'inhibiteurs de la PSMA est celle des ligands uréiques. C'est elle qui nous a intéressés pendant la durée de ce projet. Ce type d'inhibiteurs de la PSMA a été découvert en 2000 par Kozikowski *et al.*<sup>44</sup> et présente l'avantage de combiner une structure simple et facilement accessible à une affinité élevée pour sa cible. Le premier traceur de type urée inhibiteur de la PSMA a été décrit deux ans plus tard, par l'équipe de Pomper<sup>59</sup> (Figure 48).

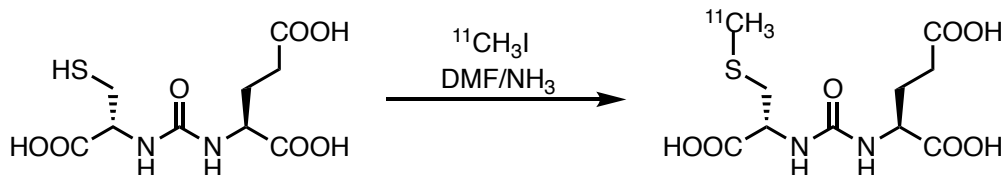


Figure 48 : Schéma réactionnel de la radiosynthèse de  $[^{11}\text{C}]\text{C-MCG}$

Depuis, une grande variété de radiotraceurs de ce type ont été développés et marqués à l'aide de différents radioisotopes pour l'imagerie TEMP, l'imagerie TEP et pour la radiothérapie<sup>60</sup>. Si un motif de reconnaissance commun de type « acide aminé-urée-acide glutamique » ressort dans ce type de ligand, les études de relation structure-activité ont montré que les ligands de type lysine-urée-acide glutamique montrent l'affinité la plus élevée pour la PSMA. Ce motif, dit Lys-urée-Glu ou KuE, est à la base des radiotraceurs anti-PSMA les plus performants mis au point jusqu'à ce jour et qui sont présentés ci-dessous.

**[<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA-11** a été développé par Eder *et al.* en 2012<sup>61</sup> (Figure 52). Il s'agit d'un radiotraceur basé sur le pharmacophore lysine-urée-acide glutamique (en rouge sur la Figure 52) proposé par l'équipe de Pomper<sup>62</sup>. La particularité de ce traceur est l'utilisation du chélateur HBED-CC dont la lipophilie améliore l'affinité du traceur pour la PSMA<sup>63</sup> comparé à son analogue utilisant le DOTA comme agent chélatant<sup>61</sup>. [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA-11 a été amené en clinique<sup>64,65</sup> et a démontré une bonne stabilité cinétique et thermodynamique, une clairance rapide, un bon rapport tissus ciblé/tissus non ciblés ainsi qu'une biodistribution *in vivo* favorable. Cependant, la limitation à l'utilisation de ce radiotraceur est son excrétion par voie rénale, pouvant compliquer le diagnostic de lésions dans la région urogénitale et une fixation sur des organes non ciblés (glandes salivaires et surrénales)<sup>66</sup>. Dans le cadre de nos travaux sur les ligands multivalents, il est également intéressant de citer [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA-10, un analogue dimérisé de [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA-11 présentant une affinité supérieure pour la PSMA<sup>67</sup> (Figure 52). Cependant, la majorité des études cliniques se sont portées sur la version monomérique de ce traceur. [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA-11 a reçu l'approbation en la FDA en mars 2022 sous le nom commercial de Locametz<sup>TM</sup>.

**[<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA-617** est un radiotraceur combinant le pharmacophore Lys-urée-Glu avec le chélateur DOTA. PSMA-617 a été développé en 2015 également par l'équipe d'Eder et Kopka<sup>68</sup> dans le but de combiner l'aspect lipophile de PSMA-11, qui joue un rôle dans l'affinité pour la PSMA<sup>61</sup>, avec le chélateur universel DOTA qui permet la conjugaison de différents radiométaux utiles aussi bien en imagerie qu'en thérapie. Les premières études précliniques ont montré la capacité de [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA-617 à s'accumuler spécifiquement dans les tumeurs positives au PSMA avec un très bon contraste, notamment 2 h après injection (Figure 49).

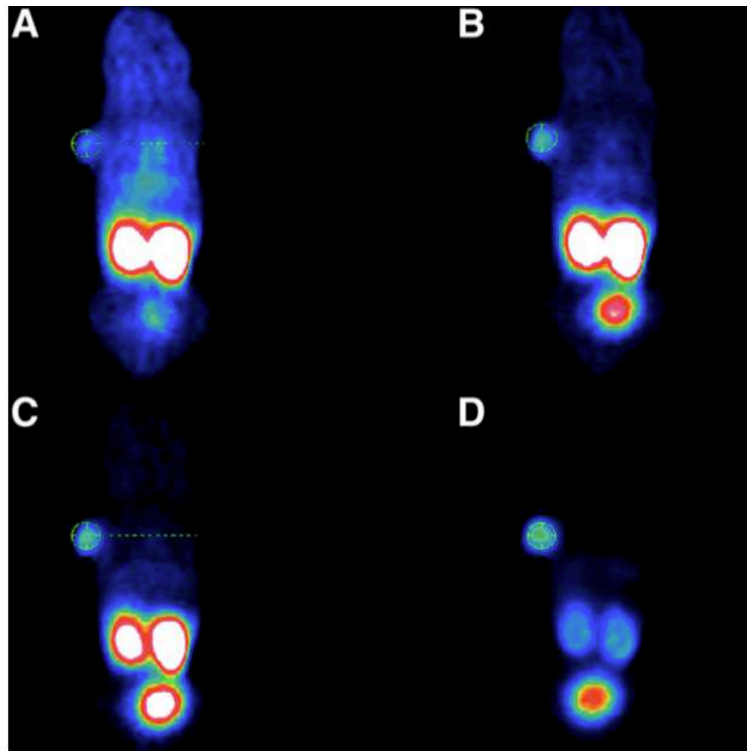


Figure 49 : Images TEP obtenues 0-20 min (A), 20-40 min (B), 40-60 min (C), et 120 min (D) après l'injection de  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-617}$

$[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ , le pendant thérapeutique de ce traceur a également été évalué *in vivo* sur souris xénotreffées avec des cellules LNCaP. Le radioconjugué montre une biodistribution similaire à son analogue marqué au gallium-68 1 h après injection, excepté pour le foie où l'accumulation est moindre pour le traceur marqué au lutetium-177. 24 h après injection, ce radioconjugué thérapeutique est majoritairement accumulé au niveau de la tumeur, le traceur s'étant accumulé dans les reins ayant été quasiment totalement éliminé. Dans ce même article, les auteurs ont effectué une étude comparative de biodistribution sur 24 h entre  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$  et  $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA11}$ <sup>1</sup> qui a démontré la nette supériorité de PSMA-617 face à PSMA-11. En effet, 24 h après injection de  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ , la radioactivité dans la tumeur LNCaP était toujours très élevée ( $10,58 \pm 4,50$  %ID/g contre  $3,20 \pm 2,89$  %ID/g pour  $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA11}$ ) et la radioactivité dans les reins était négligeable ( $2,13 \pm 1,36$  %ID/g contre  $187,4 \pm 25,3$  %ID/g pour  $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA11}$ ). En raison de ces propriétés remarquables, PSMA-617 a été au centre de différents essais cliniques pour évaluer son efficacité en tant qu'agent d'imagerie<sup>69</sup>, mais c'est une fois marqué au lutétium-177 que PSMA-617 démontre des propriétés intéressantes en tant qu'agent thérapeutique<sup>70,71</sup>.

PSMA-617 se positionne aujourd'hui comme le meilleur agent pour la radiothérapie interne vectorisée du cancer de la prostate.  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$  a notamment reçu l'approbation de la FDA en mars 2022 sous le nom de Pluvicto<sup>TM</sup>, commercialisé par Novartis, qui commercialise également son compagnon diagnostique  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$  (Locametz<sup>TM</sup>).

<sup>1</sup> Le gallium-67 est un isotope radioactif du gallium (émetteur gamma) souvent utilisé en remplacement du Ga-68 car il présente une demi-vie plus longue (3,3 jours vs. 68 min.), ce qui facilite les études *in vitro*.



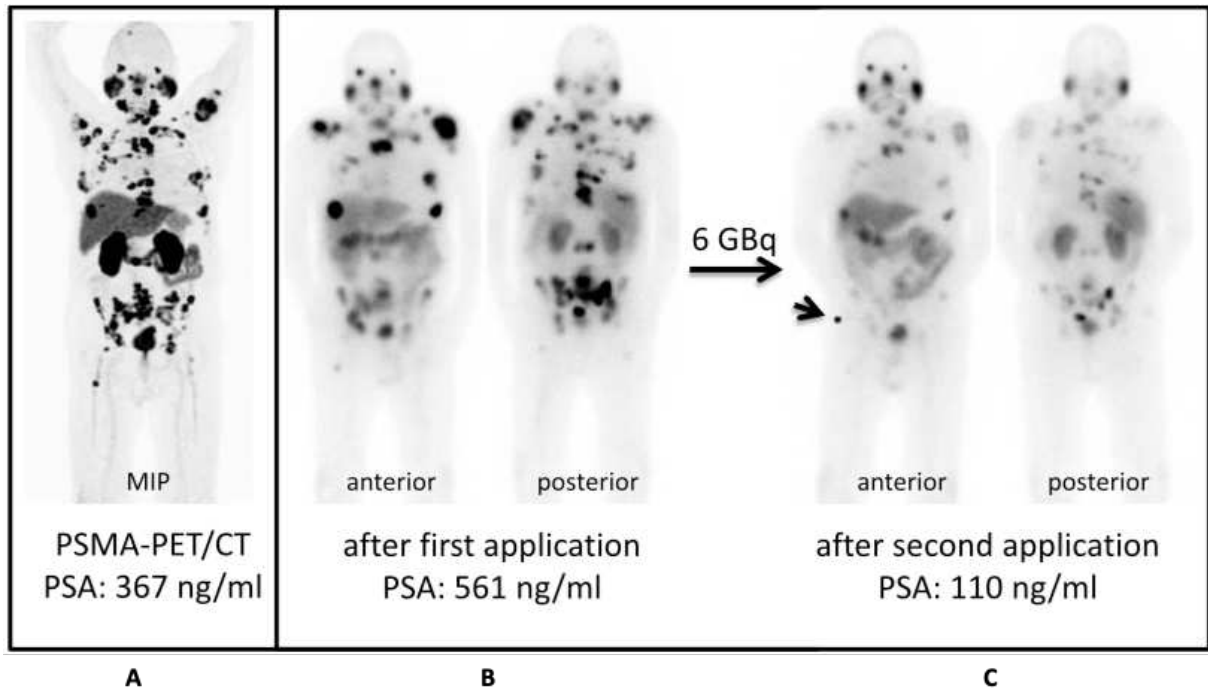


Figure 50 : (A) Image TEP prise après injection de  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ , 8 semaines avant la première injection de  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ . On y observe la tumeur primaire au niveau de la prostate ainsi qu'une multitude de lésions métastatiques (zone pelvienne, poumons, ganglions lymphatiques et foie). Ces images montrent également une accumulation dans des organes non ciblés : les reins, les glandes salivaires et le foie. (B) Images TEMP prises après une première injection de  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ . (C) Images TEMP prises après une seconde injection de  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ , 8 semaines plus tard (Figure reprise de la littérature<sup>70</sup>, la flèche indique un dépôt de radiotracer dans la canule utilisée pour l'injection).

D'autres études cliniques sont en cours combinant PSMA-617 et l'actinium-225<sup>72</sup>, un radioisotope émergent pour la thérapie par émission de particules  $\alpha$ <sup>73</sup>.

**CC34** est un inhibiteur de la PSMA développé par notre groupe en collaboration avec l'équipe de H. Maecke. Ce traceur est fonctionnalisé avec du (R)-NODAGA, permettant ainsi un marquage à l'indium-111, isotope TEMP, au gallium-68 et au cuivre-64, isotopes TEP<sup>74</sup>.  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-CC34}$ ,  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-CC34}$  et  $[^{111}\text{In}]\text{In-CC34}$  ont tous trois été évalués *in vivo* sur des souris xénotransplantées avec des cellules tumorales LNCaP. Cette étude a montré que  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-CC34}$  affiche une accumulation tumorale similaire à  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ , 1 h après injection du traceur. Cependant, c'est  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-CC34}$  qui présente le plus d'intérêt en imagerie. En effet, en raison de la demi-vie plus importante du cuivre-64 (12,7 h), il est possible d'obtenir des images à des temps post-injection plus tardifs (Figure 51).



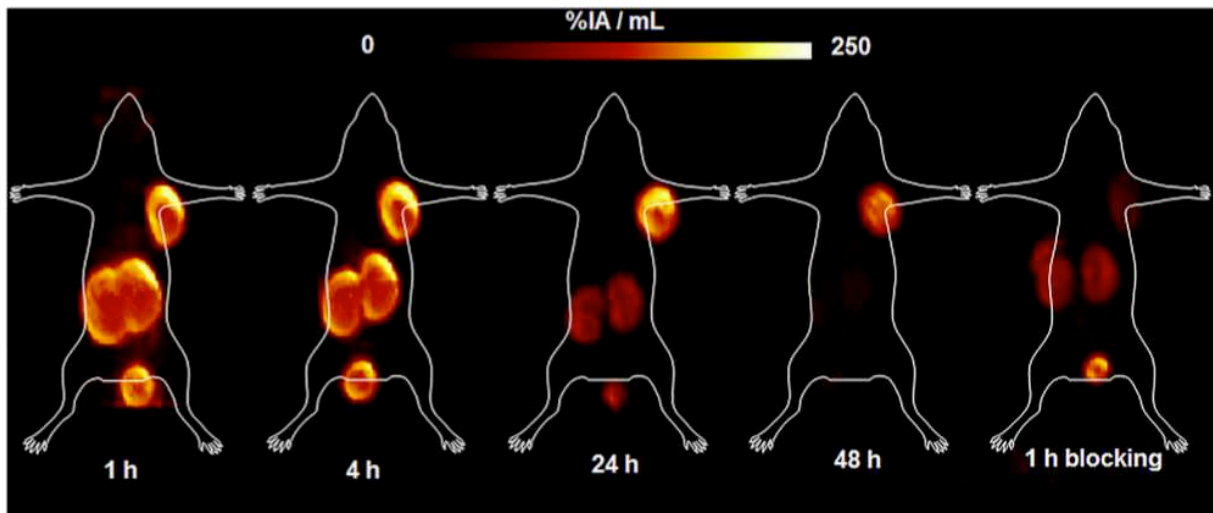


Figure 51 : Images TEP obtenues après injection de  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-CC34}$  : 1 h, 4 h, 24 h et 48 h post-injection (illustration de la littérature<sup>74</sup>).

Il a été montré que  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-CC34}$  est rapidement éliminé des organes sains PSMA<sup>+</sup> alors que l'accumulation au niveau de la tumeur reste élevée même 48 h après injection du traceur, permettant ainsi une nette identification des tissus tumoraux. Des études de dosimétrie ont également été menées avec l'analogue thérapeutique  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-CC34}$  sur un petit groupe de patients<sup>75</sup>.

$[^{18}\text{F}]\text{F-PSMA-1007}$ <sup>76</sup> est un inhibiteur de la PSMA développé en 2017 par l'équipe de Kopka comme alternative à PSMA-11 et PSMA-617<sup>76</sup>. Contrairement à ces deux traceurs marqués au gallium-68, ce traceur utilise le fluor-18 comme émetteur de positrons qui présente l'avantage d'être plus facilement disponible que le gallium-68. Cependant, PSMA-1007 (Figure 52) présente le désavantage de ne pas pouvoir être utilisé pour des applications thérapeutiques, au contraire de PSMA-617 qui peut également être marqué au  $^{177}\text{Lu}$ . Les études précliniques menées sur ce composé ont montré sa capacité à se lier à la PSMA et à s'internaliser à hauteur de 67% dans les cellules LNCaP *in vitro*. Les résultats *in vivo* obtenus sur des souris xénotransgénées avec des cellules LNCaP (PSMA<sup>+</sup>) et PC3 (PSMA<sup>-</sup>) ont montré une accumulation spécifique du traceur dans les cellules positives à la PSMA. Les études de biodistribution ont mis en évidence une accumulation à hauteur de 8 %ID/g 1 h après administration du composé radiomarqué<sup>76</sup>. Les auteurs ont également publié la même année une procédure GMP, « Good manufacturing practice », pour la production de  $[^{18}\text{F}]\text{F-PSMA-1007}$  avec un rendement radiochimique élevé<sup>77</sup>. Ce nouveau traceur a également été testé chez l'homme, sur une petite cohorte de patients sains et de patients atteints du cancer de la prostate<sup>78</sup>. Cette étude a notamment montré une excrétion urinaire moindre comparée à celle d'autres traceurs, conduisant à une accumulation diminuée dans les reins, qui permet une meilleure visualisation des petites masses tumorales.

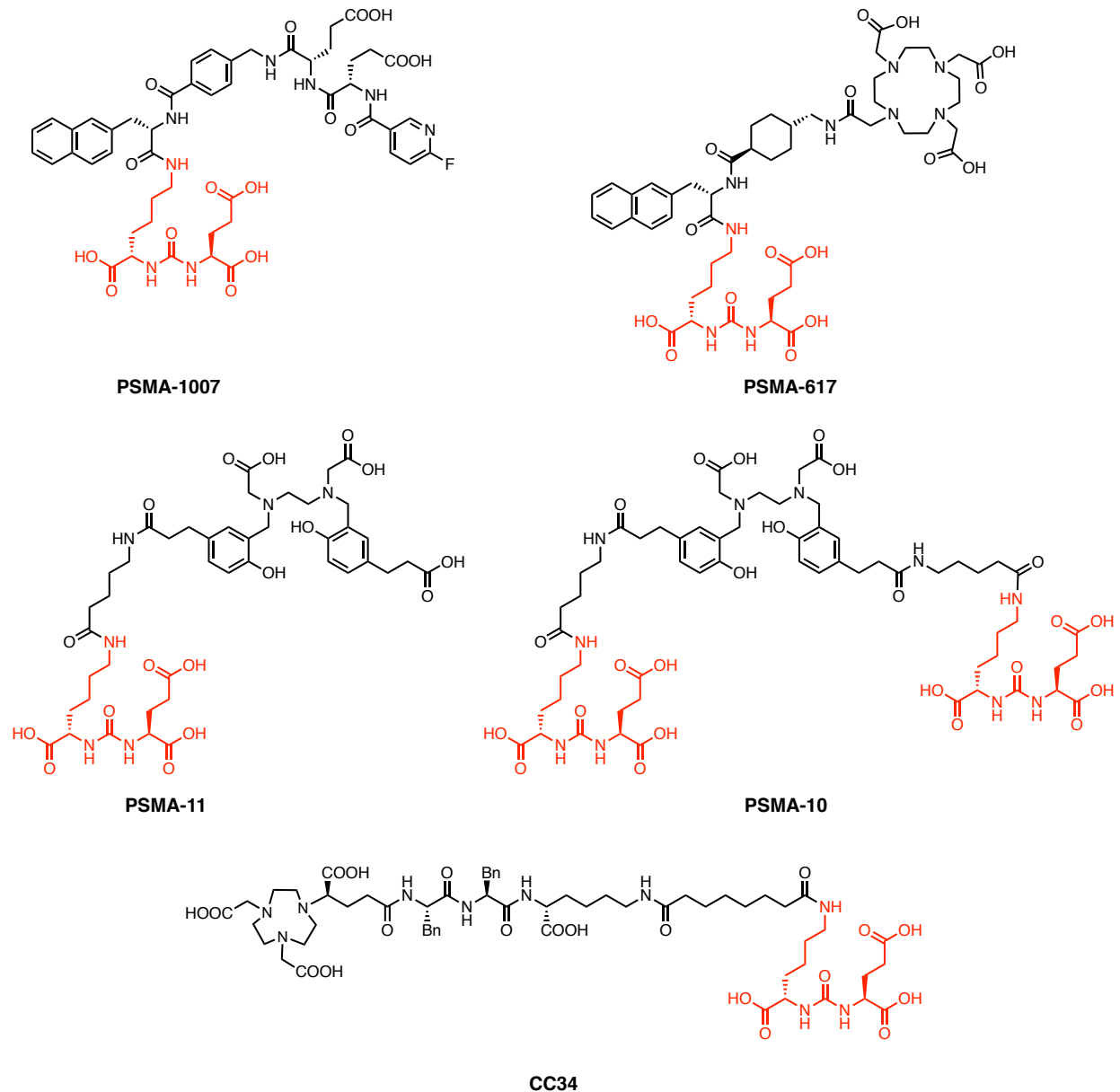


Figure 52 : Structure de PSMA-1007, PSMA-617, PSMA-11, PSMA-10 et CC34

### b. Les ligands de GRPR Agonistes de GRPR

Les agonistes utilisés aujourd'hui pour le ciblage de GRPR sont dérivés de la bombésine (BBN), un peptide de 14 résidus dont la séquence est la suivante : pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>. La bombésine a pour la première fois été extraite en 1970 de la peau de deux espèces de grenouilles : *Bombina bombina* et *Bombina variegata variegata*<sup>79</sup>. L'analogue chez les mammifères de ce peptide, gastrin-releasing polypeptide (GRP, 27 résidus), a été découvert 8 ans plus tard, isolé de tissus gastriques de porc<sup>80</sup>. Ces deux peptides ont en commun les 7 résidus N-terminaux qui sont à l'origine de l'affinité pour GRPR (ou BB2)<sup>81</sup>. En effet, des études de *mapping* ont permis d'établir que la séquence active minimale de la bombésine se situe dans sur les 7 derniers résidus de ce peptide<sup>82</sup>. Par conséquent, un très

grand nombre de ligands peptidiques du GRPR partagent une très haute homologie de séquence, souvent résumée à BBN(7-14).

**BHZ3** est un traceur pouvant se lier à tous les sous-types de récepteurs à la bombésine, basé sur le *pan-bombesin ligand* [D-Tyr<sup>6</sup>,βAla<sup>11</sup>,Thi<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>]BBN(6-14) fonctionnalisé à l'extrémité N-terminale par un espaceur bis-éthylène glycol et un chélateur DOTA (*Figure 53*). Il a été testé *in vitro* et *in vivo* sur cellules AR42J (cancer du pancréas, GRPR<sup>+</sup>)<sup>83</sup>. [<sup>67</sup>Ga]Ga-BHZ3 affiche une affinité pour GRPR très élevée ( $K_D = 0,46$  nM) et les études *in vivo* sur des rats xéno greffés avec des cellules AR42J ont démontré une accumulation spécifique du traceur dans les tissus tumoraux (5,6 %ID/g, 1 h après injection). Les essais sur patients pour la détection de GISTs (*gastro-intestinal stromal tumors*) ont mené à la conclusion que le <sup>18</sup>F-FDG était supérieur à [<sup>68</sup>Ga]Ga-BHZ3 pour la détection de GISTs<sup>84</sup>.

**AMBA** a été décrit par Lantry *et al.*<sup>85</sup> pour l'imagerie TEMP et la thérapie par émission de particules β<sup>-</sup> après marquage au lutétium-177 (*Figure 53*). [<sup>177</sup>Lu]Lu-AMBA présente, *in vitro*, une forte affinité pour GRPR ( $K_D = 2,5$  nM) ainsi qu'une internalisation élevée (76,8 %), et les essais *in vivo* sur souris xéno greffées avec des cellules PC3 attestent d'une bonne accumulation tumorale 1 h et 24 h après injection (6,4 et 3,4 %ID/g). [<sup>177</sup>Lu]Lu-AMBA a été testé en clinique, sur une cohorte de 7 patients. Cinq ont montré une accumulation du traceur dans les masses tumorales. Cependant, le potentiel du lutétium pour l'imagerie est limité, c'est pourquoi [<sup>68</sup>Ga]Ga-AMBA, son analogue TEP a été évalué dans des essais précliniques<sup>86</sup>.

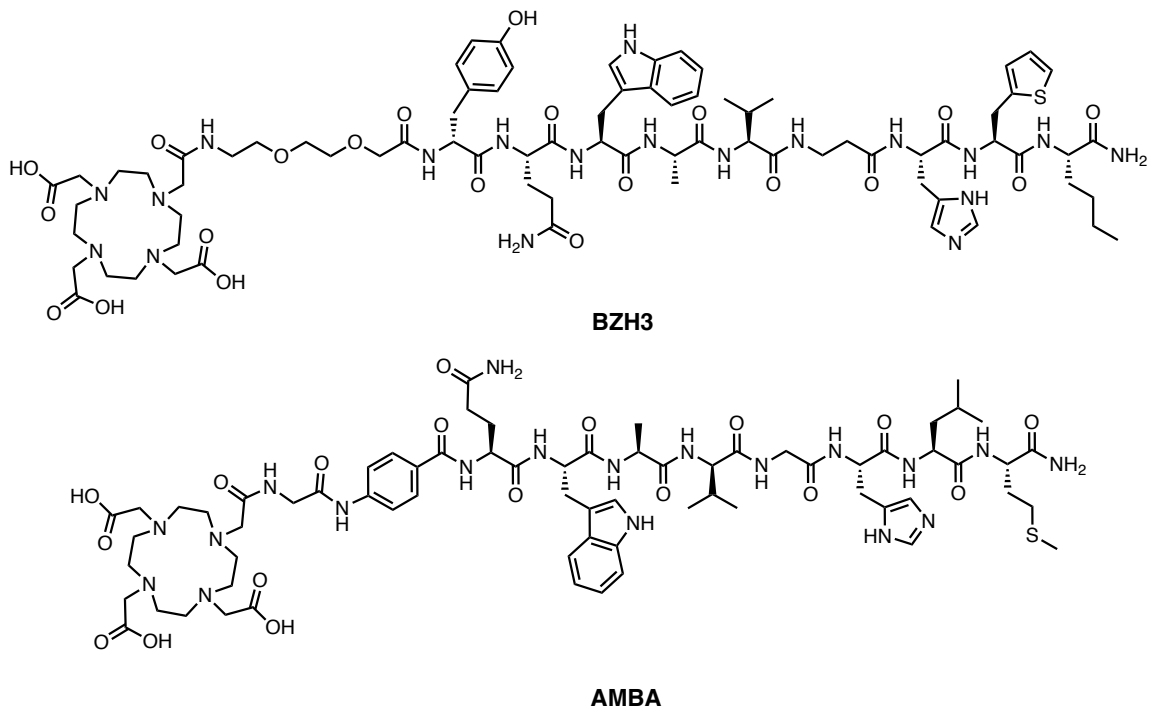


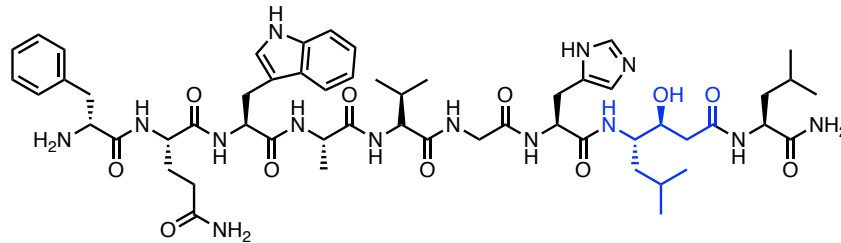
Figure 53 : Structures de BHZ3 et de AMBA

Cependant, l'utilisation d'agonistes de GRPR présente des désavantages. En effet, plusieurs études ont démontré la supériorité des antagonistes, marqués avec des radiométaux, sur les agonistes en termes d'accumulation tumorale<sup>87,88</sup>. La meilleure accumulation tumorale des antagonistes de GRPR comparé aux agonistes s'explique par une quantité supérieure de sites de liaison pour les antagonistes sur le récepteur<sup>89</sup>. De plus, dans le cas de GRPR, l'utilisation

d'agonistes entraîne des effets mitogènes et, comme observé lors d'études cliniques, cause de fortes douleurs abdominales aux patients<sup>90</sup>. Ces effets secondaires indésirables, et le fait que les antagonistes du GRPR montrent un meilleur potentiel en imagerie que les agonistes<sup>90</sup>, ont orienté les recherches de radioligands du GRPR vers l'utilisation d'antagonistes du GRPR comme vecteur de ciblage tumoral.

### Antagonistes de GRPR

**JMV594** (Figure 54) est un peptide de 9 résidus, développé à Montpellier par Llinares *et al*<sup>91</sup>. Il a la particularité d'intégrer un résidu statine (acide (3S,4S)-4-amino-3-hydroxy-6-méthylheptanoïque). JMV594 est l'antagoniste de GRPR qui a été le plus étudié en radiopharmacie<sup>81</sup>. Les études *in vitro* de compétition sur cellules 3T3 (GRPR<sup>+</sup>) avec la (3-[<sup>125</sup>I]-iodotyrosyl<sup>15</sup>)-GRP ont montré que le nonapeptide possède une forte affinité envers le GRPR ( $K_D = 0,6$  nM) sans aucune activité agoniste<sup>91</sup>. Plusieurs précurseurs de sondes nucléaires intégrant JMV594 comme vecteur ont par la suite été développés.



**JMV594**

Figure 54 : Structure de JMV594. Le résidu statine, conférant le caractère antagoniste au peptide, apparaît en bleu.

### RM1 (

Figure 55), développé à l'hôpital universitaire de Bâle par l'équipe d'Helmut Maecke, fut la première sonde radiomarquable incorporant JMV594 comme motif de reconnaissance. Sa structure inclut trois éléments : le nonapeptide, un espaceur glycine-4-aminobenzoyl et un chélateur de cations trivalents, le DOTA<sup>89</sup>. Bien que son affinité envers GRPR soit moindre que l'AMBA ( $K_D = 0,6$  nM pour [<sup>111</sup>In]In-AMBA contre  $K_D = 8,5$  nM pour [<sup>111</sup>In]In-RM1), les études de biodistribution sur souris xénotransplantées avec des cellules PC3 montrent la nette supériorité de l'antagoniste avec une accumulation plus importante dans la tumeur ainsi qu'une clairance plus rapide des tissus non ciblés. Cette caractéristique est parfaitement illustrée par l'étude de l'accumulation dans le pancréas qui devient négligeable 4 h après injection de l'antagoniste marqué à l'indium-111 alors qu'elle reste très élevée lorsque l'AMBA est utilisé (Tableau 7). Cette clairance rapide des tissus sains des antagonistes par rapport aux agonistes est un trait pharmacocinétique commun à bon nombre d'antagonistes radiomarqués et qui les rend très attractifs pour l'imagerie médicale.

Organe	Temps p.i. (h)	[ <sup>111</sup> In]In-AMBA (%ID/g ± SD)	[ <sup>111</sup> In]In-RM1 (%ID/g ± SD)	[ <sup>111</sup> In]In-RM2 (%ID/g ± SD)	[ <sup>111</sup> In]In-NOTA-P2-RM26 (%ID/g ± SD)
Tumeur	1	4,48 ± 0,68	14,24 ± 0,17	15,23 ± 4,78	5,7 ± 0,2
	4	3,69 ± 0,75	13,46 ± 0,80	11,75 ± 2,43	-
	24	2,95 ± 0,55	6,58 ± 1,14	6,84 ± 1,02	4,5 ± 0,9
Sang	1	0,33 ± 0,03	0,86 ± 0,17	0,77 ± 0,28	0,55 ± 0,05
	4	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,04	-
	24	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,003 ± 0,00	0,022 ± 0,005
Reins	1	3,98 ± 0,86	3,99 ± 0,33	4,78 ± 1,11	4,6 ± 0,6
	4	2,31 ± 0,60	1,93 ± 0,18	2,14 ± 0,73	-
	24	1,29 ± 0,08	1,01 ± 0,06	1,25 ± 0,16	1,3 ± 0,5
Estomac	1	3,37 ± 0,45	3,31 ± 0,63	3,15 ± 0,78	1,7 ± 0,9
	4	2,42 ± 0,08	0,76 ± 0,14	1,07 ± 0,15	-
	24	1,95 ± 0,24	0,05 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,12 ± 0,03
Pancréas	1	59,95 ± 6,15	21,92 ± 1,34	22,64 ± 4,71	12 ± 1
	4	49,44 ± 3,27	1,32 ± 0,31	1,55 ± 0,48	-
	24	47,11 ± 0,86	0,15 ± 0,02	0,32 ± 0,09	0,11 ± 0,03

Tableau 7 : Biodistributions obtenues 1 h, 4 h et 24 h après injection de [<sup>111</sup>In]In-AMBA<sup>89</sup>, [<sup>111</sup>In]In-RM1<sup>89</sup>, [<sup>111</sup>In]In-RM2<sup>92</sup> et [<sup>111</sup>In]In-NOTA-P2-RM26<sup>93</sup> (Tableau adapté de la littérature).

### RM2 (

Figure 55) a été développé par la même équipe dans le but d'améliorer l'affinité de JMV594 pour sa cible, en modifiant la nature de l'espaceur utilisé<sup>92</sup>. L'introduction de l'espaceur 4-amino-1-carboxyméthyl-pipéridine, chargé positivement, a permis d'obtenir un conjugué avec une affinité supérieure pour GRPR ( $K_D = 2,9$  nM pour [<sup>111</sup>In]In-RM2). Bien qu'ayant une affinité plus élevée pour GRPR, [<sup>111</sup>In]In-RM2 montre une biodistribution similaire à celle de [<sup>111</sup>In]In-RM1, à savoir, une accumulation rapide dans la tumeur et une clairance rapide des tissus non tumoraux. Son affinité pour GRPR ainsi que sa biodistribution rapide et favorable ont mené à différents essais cliniques de phase 1 pour l'analogue de RM2 (BAY86-7548) marqué au gallium-68<sup>94-96</sup> en imagerie. Les résultats de ces études valident l'intérêt de [<sup>68</sup>Ga]Ga-RM2 pour le diagnostic et le suivi de tumeurs prostatiques à un stade précoce<sup>96</sup> et ont fait de RM2 le composé de référence pour le ciblage du GRPR.

### NOTA-PEG<sub>2</sub>-JMV594 (

Figure 55), aussi appelé NOTA-P2-RM26 par ses concepteurs, Varasteh *et al.*<sup>93</sup>, à la particularité d'incorporer un chélateur NOTA, permettant la complexation du gallium-68 et du cuivre-64 dans des conditions douces<sup>97,98</sup>. NOTA-PEG<sub>2</sub>-JMV594 dispose d'une forte affinité pour GRPR ( $K_D = 23$  pM avec [<sup>68</sup>Ga]Ga-NOTA-PEG<sub>2</sub>-JMV594 sur cellules PC3) et les études de biodistribution *ex vivo* ont montré qu'il s'accumulait rapidement dans les tumeurs GRPR<sup>+</sup> et était rapidement excrété des organes sains (Tableau 7). La même équipe a également publié une étude préclinique de ce même traceur marqué au fluor-18 en utilisant l'approche [<sup>18</sup>F]AlF<sup>99</sup>, une méthode de radiomarquage émergente combinant les propriétés favorables de décroissance du fluor-18 à la commodité de préparation des conjugués radiométallés<sup>100</sup>. Des variantes incorporant d'autres agents chélatants, comme le NODAGA et le DOTAGA, ont également été développées<sup>101</sup>. Plus récemment, NOTA-PEG<sub>2</sub>-JMV594 a été marqué au cuivre-64 et au cobalt-55/57 avant d'être évalué en préclinique et comparé à des analogues utilisant le chélateur NODAGA<sup>102</sup>. En 2019, l'équipe d'Orlova a également étudié le potentiel de [<sup>177</sup>Lu]Lu-DOTAGA-PEG<sub>2</sub>-JMV594 qui a montré son efficacité sur modèles murins pour la thérapie<sup>103</sup>.

### NOTA- et NODAGA-MJ9 (

Figure 55) : L'équipe d'Helmut Maecke a également développé un analogue de JMV594 permettant la chélation de cuivre-64 et de gallium-68<sup>104</sup>. Sur le même principe que RM2, le nonapeptide est connecté à l'agent chélatant au moyen d'un espaceur 4-amino-1-carboxyméthyl-pipéridine dont la charge positive, à pH physiologique, augmente l'affinité du conjugué pour sa cible<sup>92</sup>. NOTA-MJ9 et NODAGA-MJ9 ont été tous deux marqués au gallium et au cuivre naturel, et leur affinité pour GRPR a été mesurée par compétition avec l'agoniste <sup>125</sup>I-Tyr<sup>4</sup>-BBN. Elle s'est avérée être élevée pour chaque composé (Tableau 8). Les composés radiomarqués au gallium-68 et au cuivre-64 ont montré *in vivo* leur capacité à se lier spécifiquement à GRPR. Les études de biodistribution réalisées 1 h après l'injection de [<sup>68</sup>Ga]Ga-NOTA-MJ9 et [<sup>68</sup>Ga]Ga-NODAGA-MJ9 ont mis en évidence une accumulation élevée dans les tumeurs (23,3 et 16,7 %ID/g respectivement) avec de bons rapports tumeur/sang (35 et 19). On notera tout de même une forte accumulation dans le pancréas à ce temps d'acquisition (rapport tumeur/pancréas = 0,3 pour les deux traceurs). Les études de biodistribution *ex vivo* sur les composés radiomarqués au cuivre-64 témoignent quant à eux d'une biodistribution similaire à celle de [<sup>111</sup>In]In-RM2 avec d'excellents rapports tumeur/organes. [<sup>68</sup>Ga]Ga-NODAGA-MJ9 a notamment été testé en clinique (phase 1) comme agent d'imagerie du cancer de la prostate<sup>105</sup>.

Composé	IC <sub>50</sub> (nM)
BBN	3,4 ± 1,1
<sup>nat</sup> Ga-NOTA-MJ9	0,5 ± 0,1
<sup>nat</sup> Ga-NODAGA-MJ9	2,1 ± 0,3
<sup>nat</sup> Cu-NOTA-MJ9	1,0 ± 0,1
<sup>nat</sup> Cu-NODAGA-MJ9	5,3 ± 2,5

Tableau 8 : IC<sub>50</sub> de la bombésine, <sup>nat</sup>Ga-NOTA-MJ9, <sup>nat</sup>Ga-NODAGA-MJ9, <sup>nat</sup>Cu-NOTA-MJ9 et <sup>nat</sup>Cu-NODAGA-MJ9 déterminés par compétition contre <sup>125</sup>I-Tyr<sup>4</sup>-BBN (adapté de la littérature<sup>104</sup>).

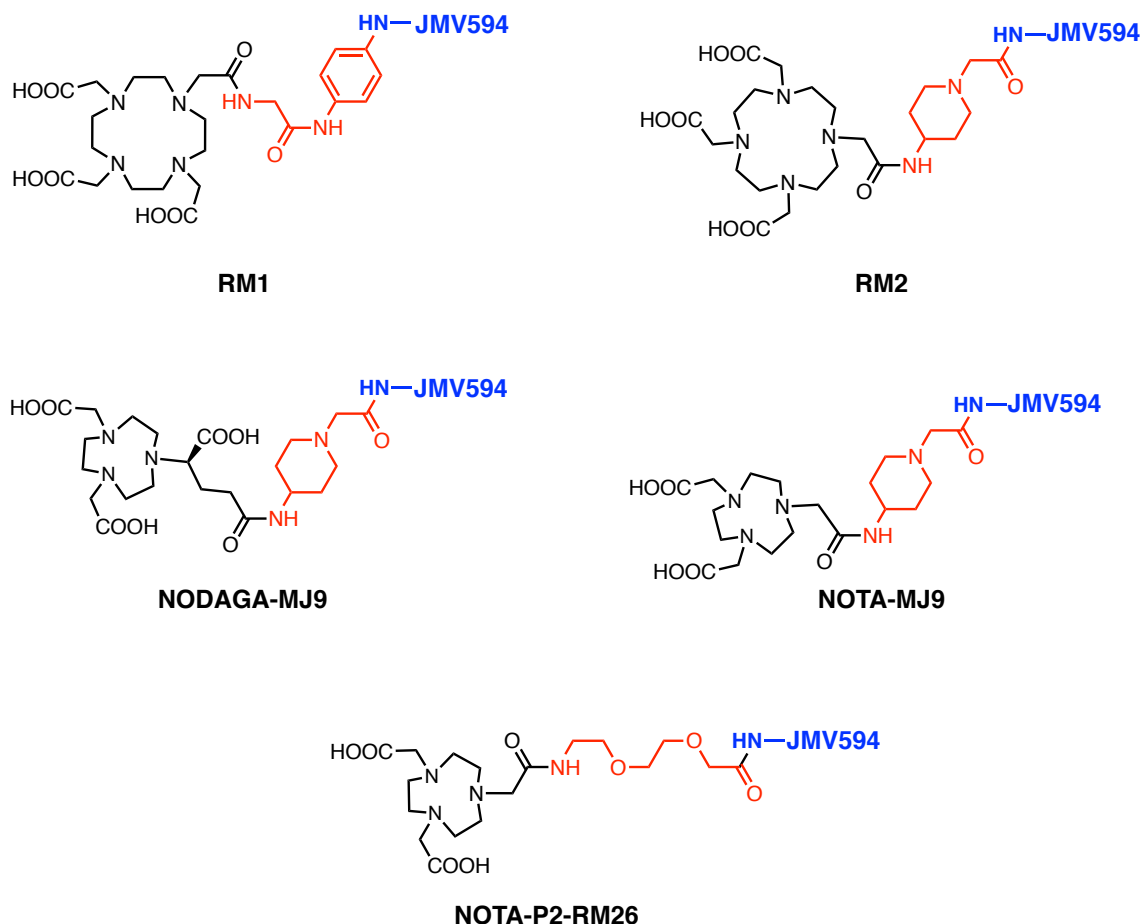


Figure 55 : Structures de RM1, RM2, NODAGA-MJ9, NOTA-MJ9 et NOTA-P2-RM26. Les espaceurs sont en rouge.

D'autres antagonistes de GRPR n'utilisant pas JMV594 comme vecteur ont également été développés. Dans une étude de 2015, Mansi *et al.* comparent trois familles d'antagonistes de ce récepteur basés sur des motifs de reconnaissance différents<sup>106</sup> : RM2 basé sur JMV594, un traceur pseudopeptidique reposant sur JMV641, antagoniste de GRPR ( $K_D = 0,85 \text{ nM}$ )<sup>107</sup> et un traceur dont la partie vectrice est [D-Phe<sup>6</sup>]BBN<sub>6-13</sub>-methyl-ester (BME,  $K_D = 44 \text{ pM}$ )<sup>108</sup>. Pour les comparer à RM2, ces trois vecteurs ont été couplés à un DOTA au moyen d'un espaceur 4-amino-1-carboxyméthyl-pipéridine pour donner les composés **RM7** et **ARBA05** (Figure 56).

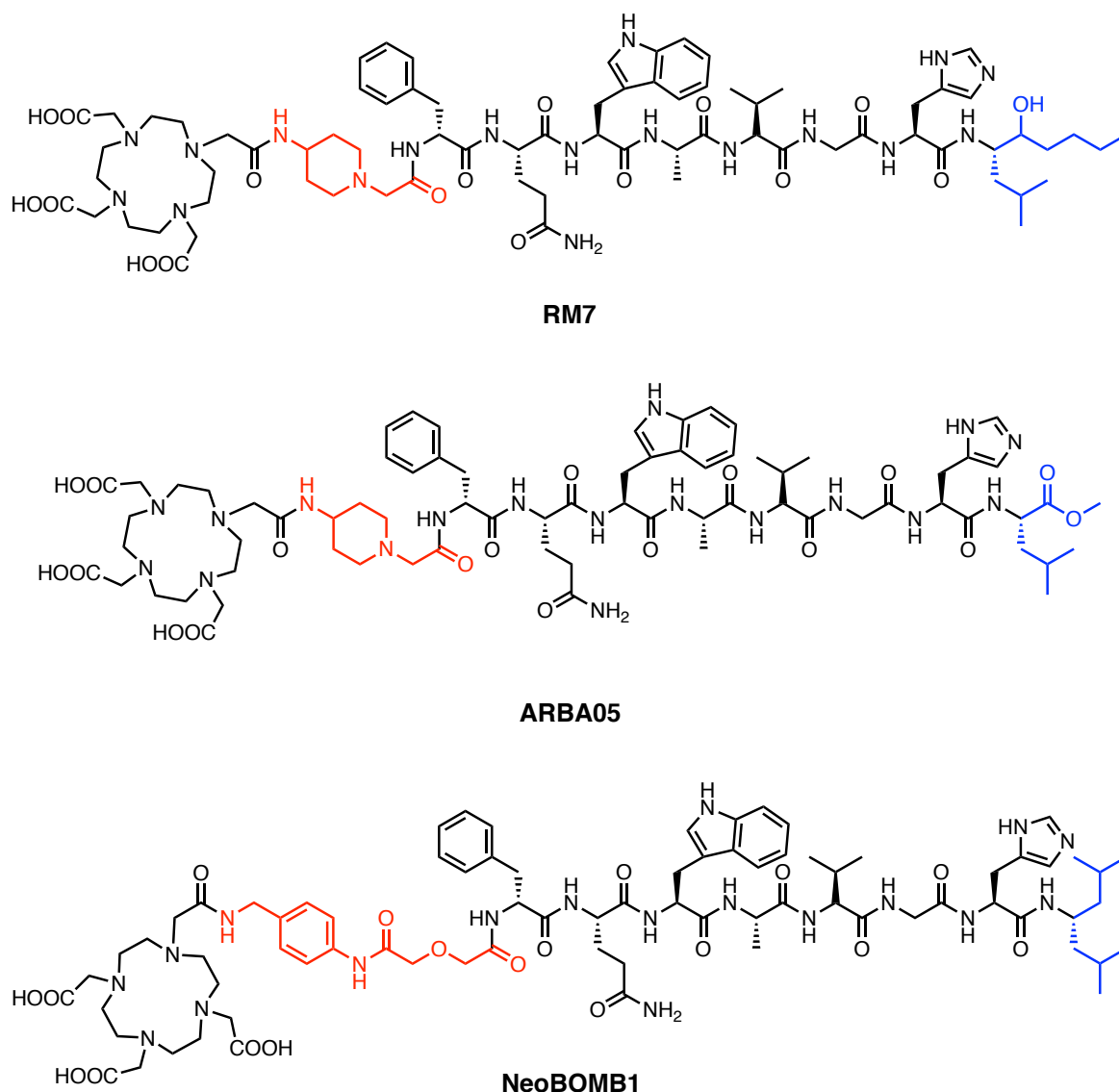


Figure 56 : Structures de RM7, ARBA05 et de NeoBOMB1. En rouge apparaît l'espaceur 4-amino-1-carboxyméthylpipéridine, et en bleu, les groupements conférant le caractère antagoniste au dérivé de bombésine.

Plus récemment, l'équipe de Marion De Jong a développé un nouvel antagoniste radiomarquable de GRPR, **NeoBOMB1**<sup>109</sup>. Ce dernier utilise comme vecteur un peptide conçu en 1991 par Heimbrook *et al.*<sup>110</sup> (Figure 56). Les études de biodistribution, effectuées sur des souris xéno greffées avec des cellules PC3, ont établi le potentiel de [<sup>68</sup>Ga]Ga-NeoBOMB1 comme traceur TEP et de [<sup>177</sup>Lu]Lu-NeoBOMB1 comme agent thérapeutique. Ces études précliniques ont donné lieu à plusieurs études cliniques de phase 1 et 2 où [<sup>68</sup>Ga]Ga-NeoBOMB1 a été évalué comme traceur TEP pour le diagnostic de différents cancers GRPR<sup>+111</sup>.

### c. Ligands hétérobivalents ciblant PSMA et GRPR

En raison de la complémentarité de ces deux marqueurs du cancer de la prostate, nous avons assisté, ces dernières années, à l'émergence de nouveaux traceurs rassemblant des ligands de ces récepteurs au sein d'une seule molécule. À notre connaissance, le premier ligand bispécifique ciblant ces deux récepteurs a été développé en 2014 par l'équipe de Klaus Kopka et Mathias Eder<sup>112</sup> (Figure 57). Il s'agit d'un ligand conçu sur une stratégie de synthèse linéaire



autour d'un chélateur analogue de HBED, ciblant la PSMA grâce à un motif lysine-urée-glutamate et le GRPR avec le vecteur peptidique contenu dans BZH3. Cette molécule présente une affinité d'ordre nanomolaire pour les deux récepteurs ( $K_D$  (PSMA) = 25,0 nM,  $K_D$  (GRPR) = 9,0 nM). Les études *in vivo* ont été effectuées sur des souris porteuses de tumeurs LnCAP (PSMA<sup>+</sup>) ou AR42J (GRPR<sup>+</sup>) et ont montré la capacité de ce nouveau ligand à s'accumuler spécifiquement au sein des deux tumeurs (LnCaP : 5,44 %ID/g, AR42J : 3,34 %ID/g) en affichant une biodistribution favorable.

Une deuxième génération de traceurs a été publiée en 2016 par la même équipe<sup>113</sup>. Cette étude a notamment permis d'étudier la longueur optimale entre les vecteurs maximisant l'affinité pour chacun des récepteurs. Les auteurs ont, en effet, ajouté des espaceurs His-Glu (1 à 3 itérations entre le chélateur et le motif ciblant PSMA) connus pour leurs propriétés de pharmacomodulation<sup>114</sup>. Il en ressort que, de manière générale, l'introduction de cet espaceur améliore la biodistribution du traceur, notamment avec une diminution du signal dans les reins et dans le foie. Le radiotracer le plus prometteur est celui portant deux espaceurs His-Glu, [<sup>68</sup>Ga]Ga-HE<sub>2</sub> (Figure 57, n = 2), car il présente les ratios tumeur/tissus sains les plus avantageux.

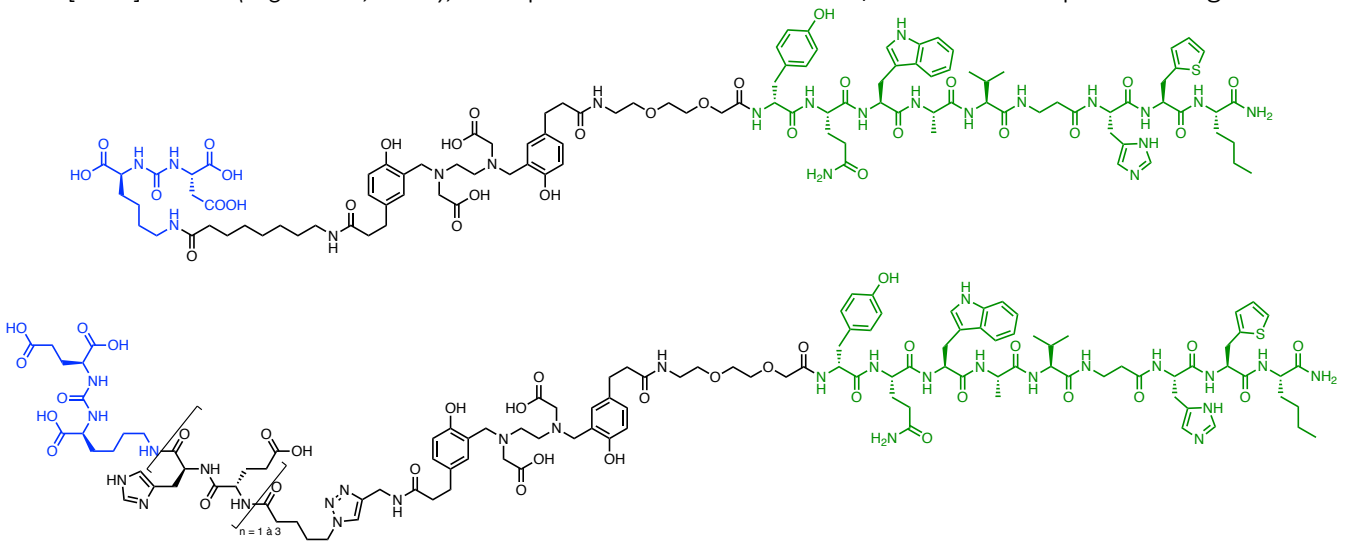


Figure 57 : Structures de deux ligands hétérovalents développés par l'équipe de Klaus Kopka.

La synthèse de ligands bispécifiques de PSMA et GRPR a également intéressé d'autres équipes de recherche. C'est notamment le cas de l'équipe de Anna Orlova et de Vladimir Tolmachev de l'université d'Uppsala en Suède. Leur approche diverge par rapport à l'approche linéaire précédemment citée. En effet, Mitran *et al.* ont fait le choix d'une stratégie modulaire, en utilisant une lysine protégée de manière triorthogonale comme plateforme d'assemblage<sup>115</sup> (Figure 58). Malgré une affinité qui pourrait être jugée comme faible pour la PSMA ( $K_D$  (PSMA) = 160 nM), que nous pourrions attribuer à l'utilisation d'un vecteur sous-optimal (acide glutamique-urée-acide glutamique), ce nouveau traceur présente une forte affinité pour le GRPR ( $K_D$  (GRPR) = 4 nM) résultant de l'utilisation de JMV594 comme ligand de ce récepteur. Contrairement à l'équipe de Kopka, les études *in vivo* et *in vitro* ont ici été réalisées sur des cellules PC3-pip, ayant la particularité de surexprimer les deux récepteurs d'intérêt, en faisant un modèle de cellules plus pertinent pour l'évaluation de ligands hétérovalents. Leur composé, comportant un chélateur NOTA, a été radiomarqué avec de l'indium-111 et du gallium-68 puis injecté à des souris xénotransgéniques avec des tumeurs PC3-pip. Les deux conjugués affichent des biodistributions similaires et d'excellentes accumulations tumorales 1 h après

injection (gallium-68 : 8 %ID/g, 1 h p.i. ; indium-111 : 12 %ID/g, 1 h p.i.). Bien que le composé s'accumule dans le pancréas durant la première heure après injection, le radiotracer présente un excellent rapport tumeur/tissus sains en raison notamment de la très faible rétention du composé dans les reins.

Parallèlement, cette même équipe a développé une série de traceurs ciblant PSMA et GRPR basés sur une approche de synthèse linéaire. Cette fois-ci, le marquage s'effectue par radioiodation d'un résidu tyrosine<sup>116</sup>. Dans cette étude, l'influence de trois espaceurs différents séparant le ligand de PSMA du motif de marquage central, a été étudiée : un PEG<sub>2</sub> (BO530), un espaceur alkyle contenant sept atomes de carbone (BO535) et l'absence d'espaceur (BO536) (*Figure 58*). Les auteurs ont ici fait le choix de cibler la PSMA à l'aide du ligand KuE. Encore une fois, leur affinité a été testée sur des cellules PC3-pip, cette fois-ci par compétition entre les ligands marqués à l'iode naturel et [<sup>111</sup>In]In-**RM26** (GRPR) et [<sup>111</sup>In]In-**PSMA617** (PSMA). Les ligands non radioactifs ont tous trois montré de faibles IC<sub>50</sub> contre ces deux radioligands (BO530 : IC<sub>50</sub> (PSMA) = 98 nM, IC<sub>50</sub> (GRPR) = 13 nM ; BO535 : IC<sub>50</sub> (PSMA) = 10 nM, IC<sub>50</sub> (GRPR) = 20 nM ; BO536 : IC<sub>50</sub> (PSMA) = 80 nM, IC<sub>50</sub> (GRPR) = 6 nM). Les études *in vivo* ont été effectuées sur des souris xénotransplantées par des cellules PC3 ou LNCaP grâce aux ligands marqués à l'iode-125. D'après les études de blocking, [<sup>125</sup>I]I-BO530 fut le seul des trois traceurs à pouvoir s'accumuler spécifiquement au sein des tumeurs PC3 (GRPR<sup>+</sup>). Dans le cas des souris xénotransplantées avec des cellules PSMA<sup>+</sup>, seuls [<sup>125</sup>I]I-BO530 et [<sup>125</sup>I]I-BO535 sont capables de s'accumuler spécifiquement dans la tumeur. [<sup>125</sup>I]I-BO530 a donc été utilisé pour effectuer des essais de biodistribution *ex vivo* sur souris greffées avec des cellules PC3-pip sur trois jours. Cette étude a montré des ratios tumeur/organes sains très élevés, en particulier après 72 h, faisant de [<sup>125</sup>I]I-BO530 un traceur prometteur pour l'imagerie du cancer de la prostate, avec un fort potentiel pour la thérapie, en raison de sa persistance tumorale.

Pour finir, l'équipe de Anna Orlova est également à l'origine d'une dernière série de ligands bispécifiques ciblant les deux récepteurs qui nous intéressent dans ce chapitre. Comme dans la série précédente, les auteurs ont choisi de cibler GRPR et PSMA à l'aide de JMV594 et du ligand lysine-urée-acide glutamique<sup>117</sup>. En revanche, les ligands ont été fonctionnalisés avec un macrocycle NODAGA, permettant la chélation de divers radiométaux. Cette étude s'est intéressée à l'influence des espaceurs PEG<sub>6</sub> et PEG<sub>2</sub> (côté JMV594) et naphthylalanine (côté PSMA) (*Figure 58*). Les études d'affinité *in vitro*, effectuées sur cellules PC3 et LNCaP, ont mis en évidence que seul le composé appelé BQ7812 contenant un espaceur PEG<sub>2</sub> côté GRPR et une naphthylalanine côté PSMA était capable de se lier efficacement aux deux récepteurs (K<sub>D</sub> (PSMA) = 102 nM, K<sub>D</sub> (GRPR) = 6 nM). Curieusement, l'espaceur utilisé pour éloigner JMV594 de la plateforme lysine exerce une influence sur l'affinité de KuE pour la PSMA.

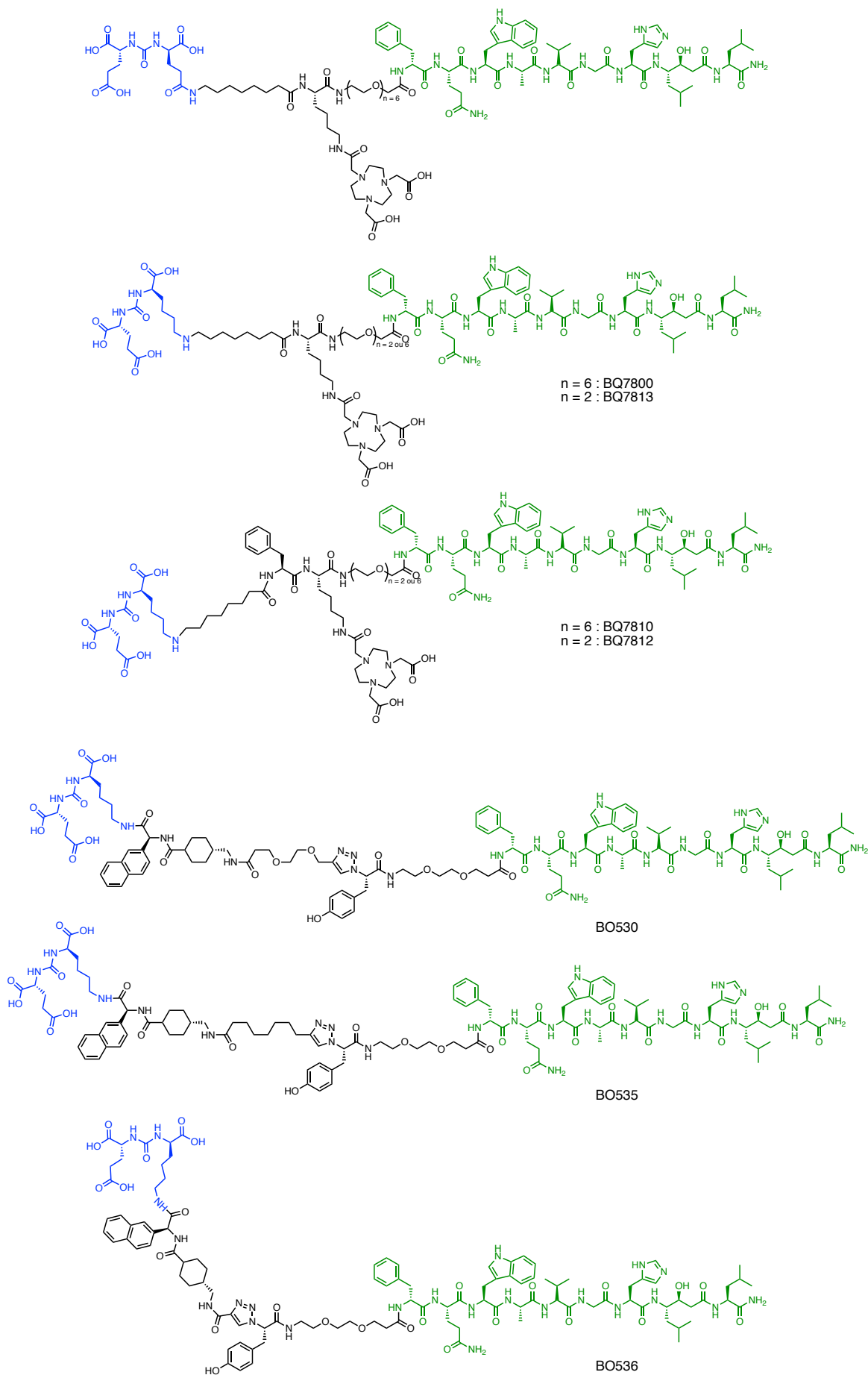


Figure 58 : Structures de quelques ligands hétérovalents développés par l'équipe de Anna Orlova.

Les études *in vivo* se sont donc focalisées sur ce composé. Elles ont été réalisées sur des souris greffées avec des cellules PC3-pip. L'étude de biodistribution réalisée 1 h p.i. de [<sup>111</sup>In]In-BQ7812 (Figure 59) s'est révélée être extrêmement intéressante. En effet, dans cette étude sont comparées les accumulations tumorales dans quatre conditions différentes : lorsque le composé est injecté seul, lorsqu'on bloque les récepteurs GRPR, lorsqu'on bloque la PSMA et enfin lorsqu'on bloque les deux cibles. Cette étude nous permet de voir que la majorité de l'accumulation tumorale est due à la PSMA. En effet, lorsque celle-ci est bloquée, on observe une chute significative du signal dans la tumeur alors que le blocage des récepteurs GRPR seul ne provoque qu'une chute minimale de l'accumulation tumorale. Les auteurs justifient ce résultat en raison de la plus forte densité de PSMA comparé à GRPR sur cette lignée cellulaire.

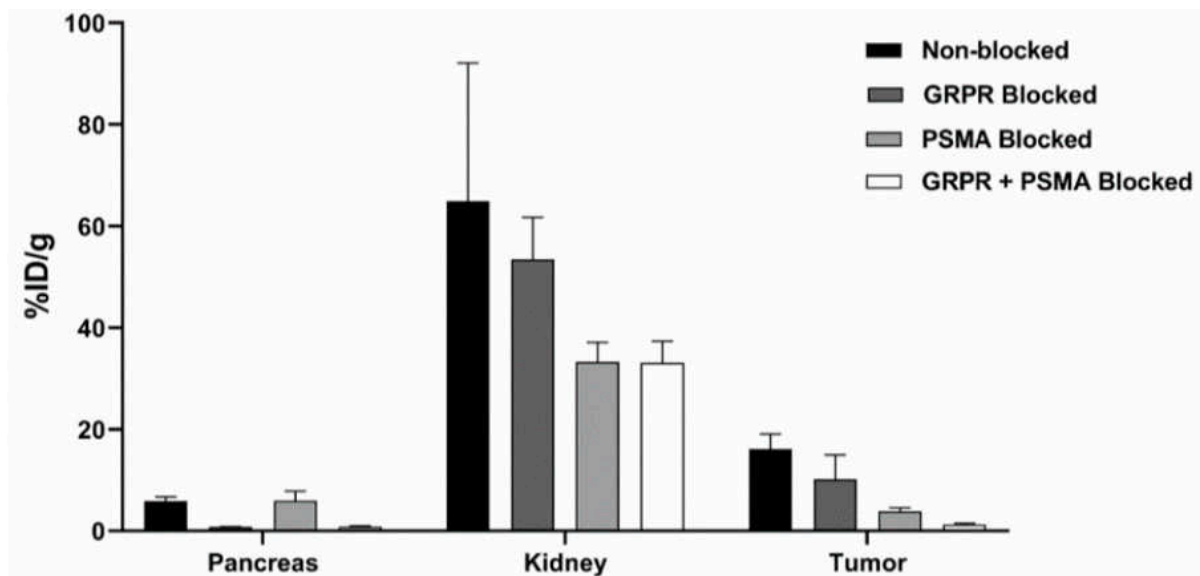


Figure 59 : Radioactivité dans le pancréas, les reins et la tumeur 1 h après injection de [<sup>111</sup>In]In-BQ7812. En noir : biodistribution lorsque le composé est injecté seul (Non-blocked). En gris foncé : lorsque le composé est co-injecté avec un inhibiteur de GRPR (GRPR blocked). En gris clair : lorsque le produit est co-injecté avec un inhibiteur de la PSMA (PSMA blocked). En blanc : lorsque le composé est co-injecté avec les deux inhibiteurs (GRPR + PSMA blocked). (Tiré de la littérature<sup>117</sup>)

Ces différentes équipes de recherche remplissent le cahier des charges consistant à créer des composés bispécifiques capables de cibler à la fois GRPR et PSMA, et ce *in vitro* et *in vivo*. Cependant, aucune de ces études n'a mis en place des expériences (pharmacocinétiques à plusieurs temps, mesure des temps de résidence, comparaison systématique avec des ligands monovalents) permettant de démontrer le gain en termes d'affinité (proximité forcée) ou en termes de rétention tumorale (effet de recapture, liaison simultanée aux deux cibles) résultant de l'utilisation de ce type de ligands.

## II. Synthèse d'une librairie de ligands hétérobivalents ciblant PSMA et GRPR

Comme énoncé dans l'introduction de ce chapitre, PSMA et GRPR sont deux cibles de choix pour le ciblage spécifique des tissus tumoraux prostatiques. GRPR est surexprimé plutôt dans les stades précoces de la maladie<sup>49</sup> tandis que l'expression de la PSMA augmente avec la progression de la maladie<sup>45,46</sup>. Durant ce projet, nous nous sommes proposé de synthétiser des traceurs hétérobivalents, rassemblant deux entités de ciblage différentes au sein d'une seule molécule. Nous attendons deux bénéfices majeurs de l'utilisation d'un tel traceur, qui bénéficieront aussi bien à la radiothérapie interne vectorisée qu'à l'imagerie nucléaire. Premièrement, les ligands hétérobivalents constituent une solution pouvant à la fois pallier le problème de l'hétérogénéité inter-tumorale et intra-tumorale<sup>118</sup>, en ciblant une plus grande variété de cellules cancéreuses. Deuxièmement, dans le cas de cellules tumorales co-exprimant GRPR et PSMA, on s'attend à une spécificité accrue pour les tissus tumoraux ainsi qu'une clairance plus lente des tumeurs, en raison d'un effet de recapture.<sup>119,120</sup> D'autre part, en plus de l'intérêt médical de tels traceurs, il faut ajouter que les ligands de GRPR et de PSMA sont faciles d'accès d'un point de vue synthétique, que l'équipe est familière avec les modèles *in vitro* et *in vivo* pour l'évaluation des ligands du GRPR<sup>121</sup> et que les modèles cellulaires pour évaluer les ligands de PSMA sont bien décrits, ce qui fait des ligands combinant GRPR et PSMA un excellent modèle pour étudier le concept d'hétérobivalence.

### 1. Conception des ligands

Dans l'optique de développer une approche modulaire, nous devons utiliser une plateforme trivalente pouvant être aisément substituée par trois groupements différents. La 3,6-dichlorotétrazine est une petite molécule avec laquelle le laboratoire a une grande expérience et qui, comme nous l'avons vu dans la première partie de ce chapitre, peut être modifiée de manière chimiospécifique pour former des composés ternaires, c'est pourquoi nous l'avons choisie comme précurseur de plateforme pour générer nos traceurs.

Afin de contrôler la distance entre nos deux vecteurs, nous avons choisi d'utiliser un enchaînement de  $\beta$  Alanines comme une « règle moléculaire », chaque résidu éloignant le vecteur de 5 Å de la plateforme et, par conséquent, éloignant chacun des vecteurs de 10 Å l'un de l'autre<sup>122</sup>. Le premier vecteur, une fois fonctionnalisé avec l'espaceur  $\beta$  Alanine, peut réagir par  $S_NAr$  sur l'un des deux atomes de chlore de la 3,6-dichlorotétrazine. Pour incorporer le second vecteur, le dernier résidu  $\beta$  Alanine est remplacé par un résidu acide 3-mercaptopropanoïque, de longueur similaire. Pour finir, la sonde d'imagerie (ou le composé thérapeutique) peut être ajoutée par réaction de « click » sur le cœur tétrazine disubstitué précédemment formé (Figure 60).

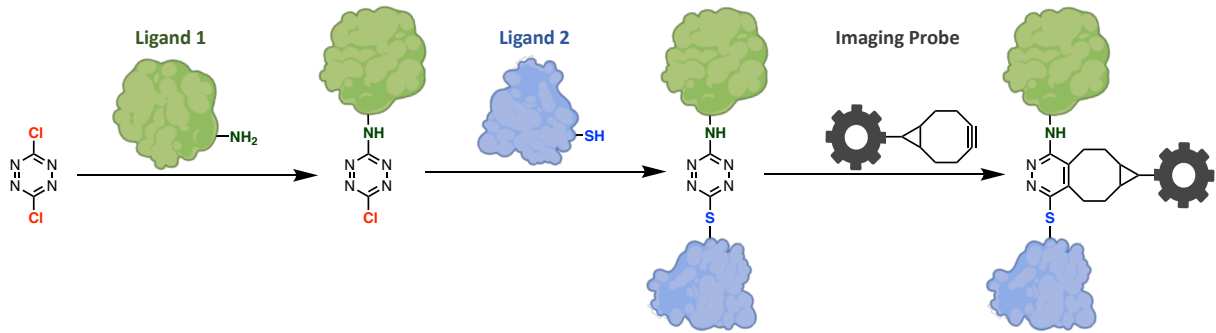


Figure 60 : Schéma réactionnel de l'approche amine-thiol pour la préparation de traceurs hétérobivalents.

Pour cibler les deux vecteurs d'intérêt, il est nécessaire de sélectionner des ligands ayant une forte affinité pour leur cible respective et étant capables de s'accumuler spécifiquement *in vivo* dans les zones d'intérêt. En raison de sa forte affinité pour GRPR, ainsi que de son incorporation dans un grand nombre de traceurs ayant fait l'objet de plusieurs études précliniques et cliniques, nous avons choisi d'utiliser l'antagoniste **JMV594** comme motif de ciblage de ce RCPG. Le motif **KuE** a également prouvé son efficacité et sa versatilité pour la détection et la thérapie de tumeurs PSMA<sup>+</sup>. C'est pourquoi nous avons décidé de l'utiliser comme motif de ciblage de cette protéine.

Pour prouver la versatilité de la méthode, nous avons fait le choix d'utiliser différentes sondes et précurseurs de sonde pour l'imagerie et la thérapie. Nous avons sélectionné deux chélateurs et un fluorophore : le NODAGA, dont le but est la chélation de radiométaux pour l'imagerie (<sup>68</sup>Ga, <sup>64</sup>Cu...), le DOTA, chélateur universel permettant la complexation de radiométaux pour l'imagerie et la thérapie (<sup>111</sup>In, <sup>177</sup>Lu...) et une cyanine-5, un fluorophore organique ( $\lambda_{abs} = 640$  nm,  $\lambda_{em} = 655$  nm dans le PBS<sup>123</sup>) dont les dérivés peuvent être utilisés notamment pour la chirurgie guidée par fluorescence<sup>124</sup>.

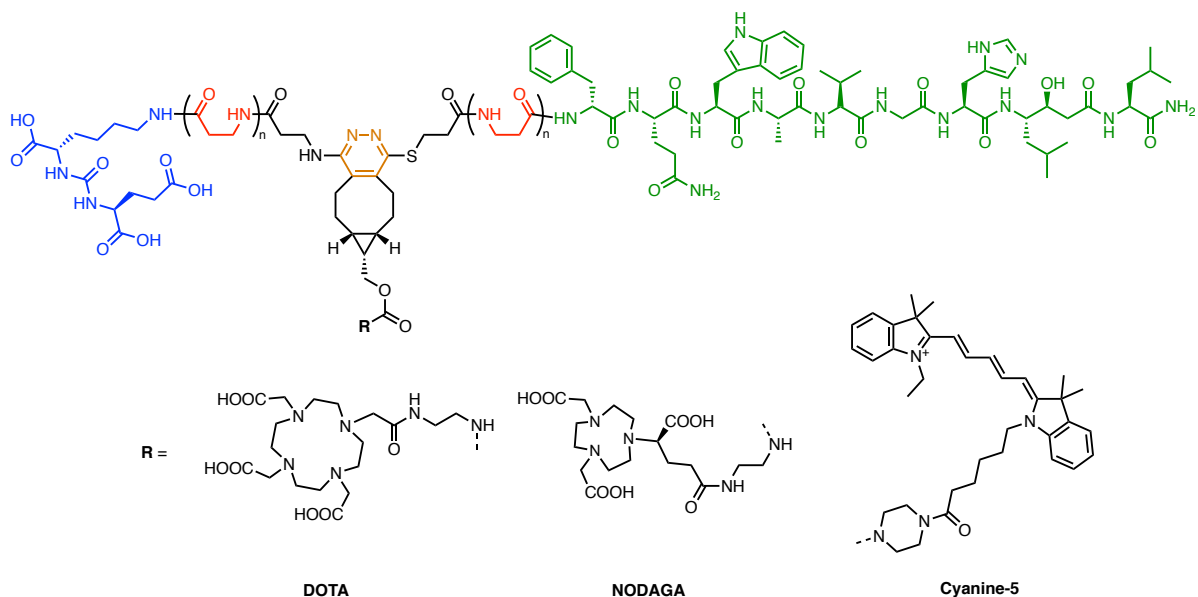


Figure 61 : Structure générale des ligands hétérobivalents. En bleu : KuE, en vert : JMV594, en rouge : espaces β Alanine, et en orange : cœur pyridazine formé après réaction de IEDDA avec l'agent d'imagerie/thérapie porteur d'un groupement bicyclononyne (BCN)

## 2. Optimisation et synthèse des ligands

### A. Synthèse de trois ligands hétérobivalents

Dans un premier temps, nous nous sommes donné pour objectifs de mettre au point et optimiser notre approche de synthèse de ligands hétérobivalents par utilisation de la dichlorotétrazine, en nous limitant à deux résidus  $\beta$  Alanine comme espaceurs. La première étape de ces travaux était d'exemplifier l'approche synthétique via l'assemblage de trois premières molécules cibles : **DOTA-HBL1**, **NODAGA-HBL1** et **Cy5-HBL1** (Figure 62).

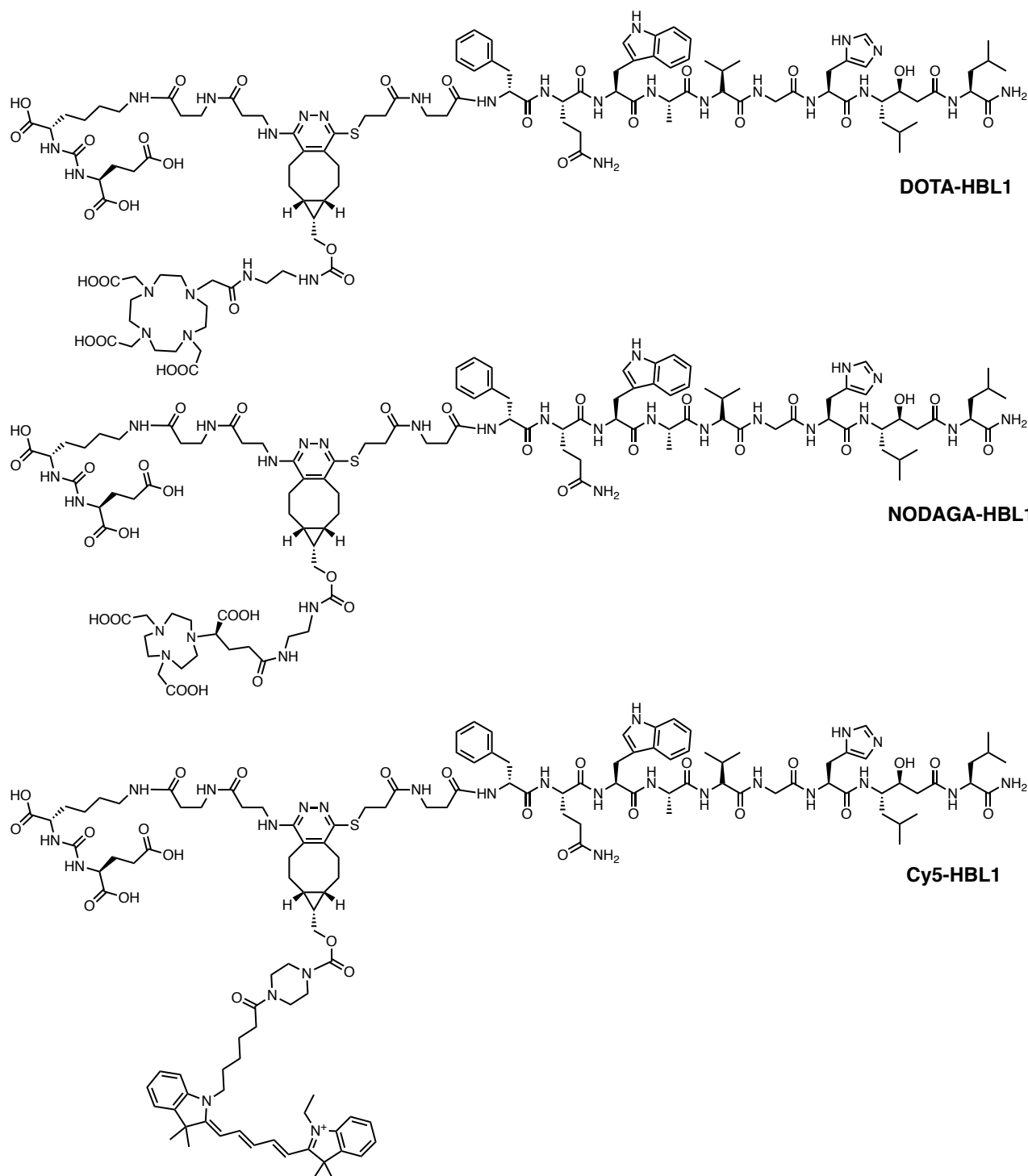


Figure 62 : Structures de DOTA-HBL1, NODAGA-HBL1 et Cy5-HBL1.

a. Synthèse des espaceurs

Tout d'abord, nous avons préparé les espaceurs H-(βAla)<sub>2</sub>-OH. Nous avons fait le choix de synthétiser trois espaceurs différents, deux portant une amine terminale protégée avec un groupement Boc (**1**) ou un groupement Fmoc (**2**), et un portant un groupement thiol protégé par un trityl (**3**).

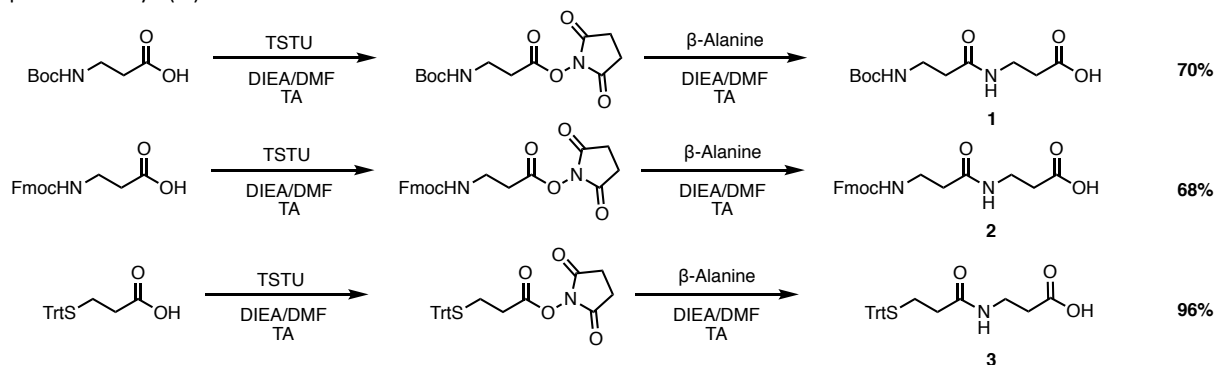


Figure 63 : Synthèse des espaceurs **1**, **2** et **3**.

Leur synthèse consistait en la formation d'esters de *N*-hydroxysuccinimide par réaction entre le trifluoroborate de *N,N,N',N'*-tetraméthyl-*O*-(*N*-succinimidyl)-uronium (TSTU) et la Boc-(βAla)-OH, la Fmoc-(βAla)-OH et l'acide 3-mercaptopropanoïque tritylé suivie d'une addition-élimination sur la β Alanine déprotégée (Figure 63). Les composés **1**, **2**, et **3** ont pu être isolés avec des rendements de 70, 68 et 96% respectivement.

b. Fonctionnalisation du motif lysine-urée-acide glutamique

Afin d'étudier la spécificité de la première S<sub>N</sub>Ar lorsqu'elle est effectuée en présence d'acides carboxyliques, nous avons préparé deux dérivés du motif ciblant la PSMA : le composé **4** entièrement déprotégé et le composé **5** dans lequel les acides carboxyliques sont protégés sous la forme d'esters *tert*-butyliques. L'espaceur a été incorporé par couplage peptidique en utilisant HATU comme agent de couplage. Dans le premier cas, le composé **4** a été synthétisé par couplage avec le composé **1** suivi d'un traitement par une solution de TFA (20% dans le dichlorométhane) pour retirer tous les groupes protecteurs (Figure 64).

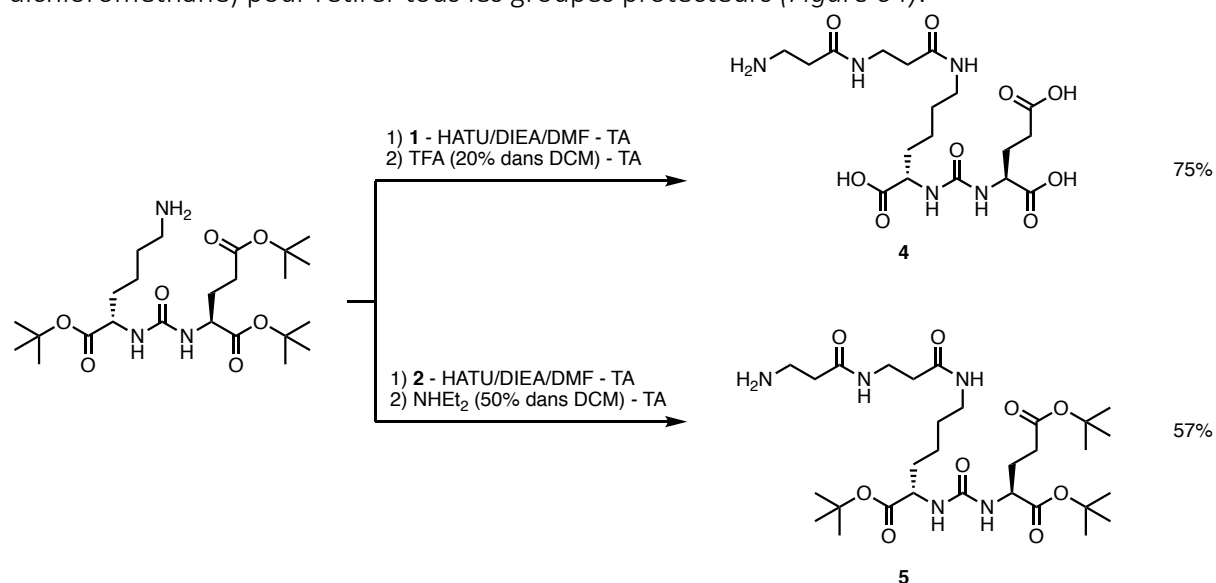


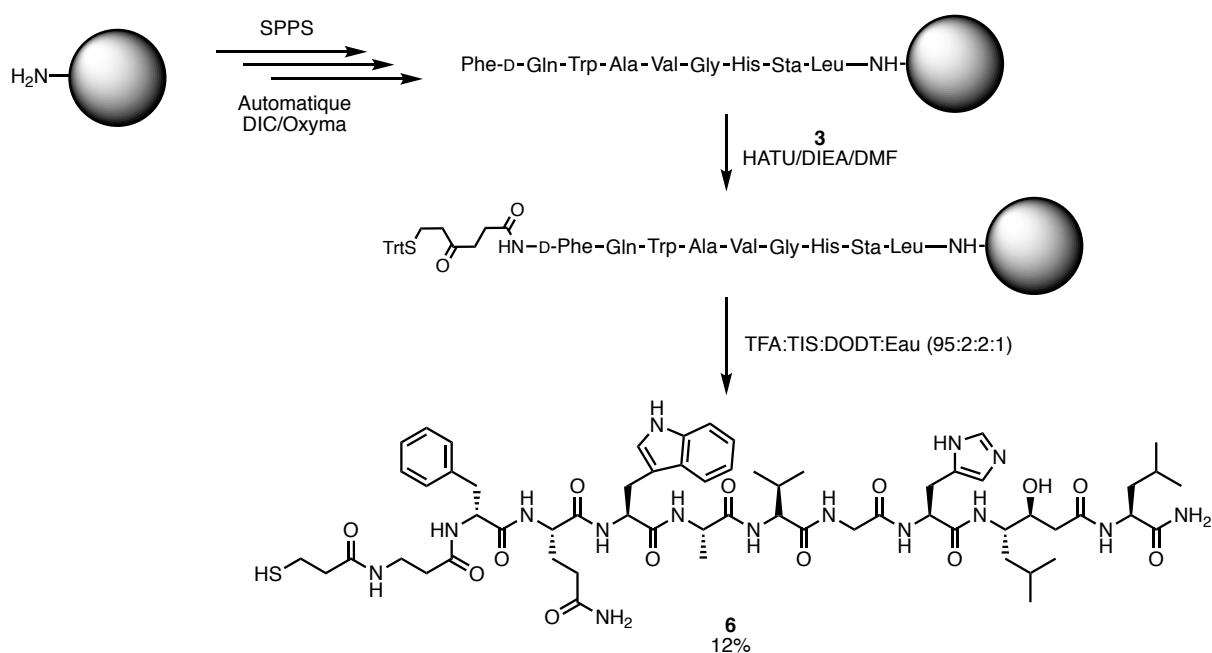
Figure 64 : Synthèse des composés **4** et **5**



Dans le deuxième cas, le composé **5** a été synthétisé par couplage avec le composé **2**, suivi d'un traitement par une solution de diéthylamine (20 % dans le dichlorométhane) permettant de déprotéger sélectivement l'amine primaire (*Figure 64*).

### c. Synthèse et fonctionnalisation de JMV594

Le peptide a été entièrement synthétisé sur support solide, à l'aide d'une résine Rink amide. Les neuf acides aminés formant le motif de liaison ont été couplés grâce à un synthétiseur automatique, en utilisant comme agent de couplage un mélange DIC/Oxyma. Le peptide a ensuite été fonctionnalisé avec l'espaceur manuellement en conditions HATU/DIEA (*Figure 65*). Le peptide **6** a été obtenu avec un rendement de 12%.



*Figure 65 : Schéma de synthèse du peptide **6** par SPPS sur résine Rink amide. Note : par souci de clarté, les groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés ne sont pas précisés.*

### d. Synthèse de Cy5-BCN

La sonde d'imagerie Cy5-BCN (**9**) a été synthétisée en deux étapes à partir d'une cyanine-5 porteuse d'une fonction acide carboxylique. Dans un premier temps, la cyanine a été fonctionnalisée avec une pipérazine par couplage peptidique de la 1-Boc-pipérazine. Après coupure du groupement Boc, la fonction bicyclononyne, permettant d'effectuer la réaction de IEDDA, a été incorporée par réaction de l'amine secondaire sur le carbonate de *para*-nitrophénol de l'endo-BCN pour donner le composé **9** avec un rendement global de 8,5 % (*Figure 66*). L'addition d'une molécule d'eau sur l'alcyne contraint lors de la purification par RP-HPLC explique le rendement relativement faible obtenu. La purification en phase normale conviendrait mieux à ce type de molécule, cependant nous avons obtenu le produit désiré en quantité suffisante en suivant cette méthode.

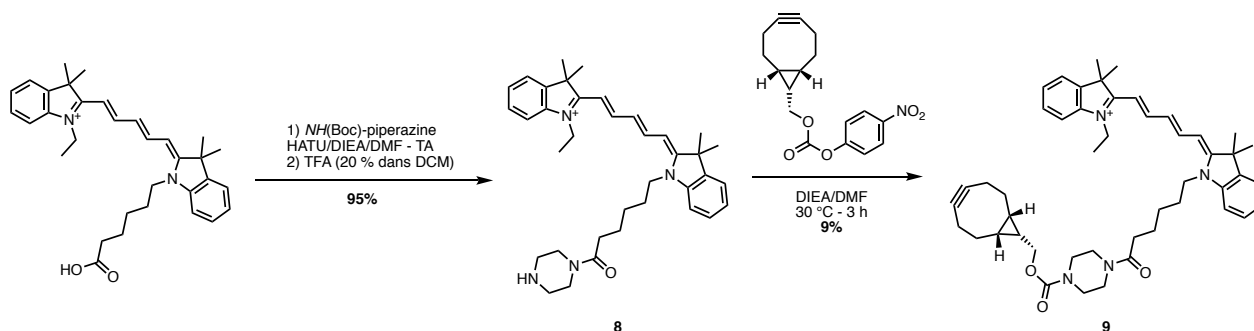
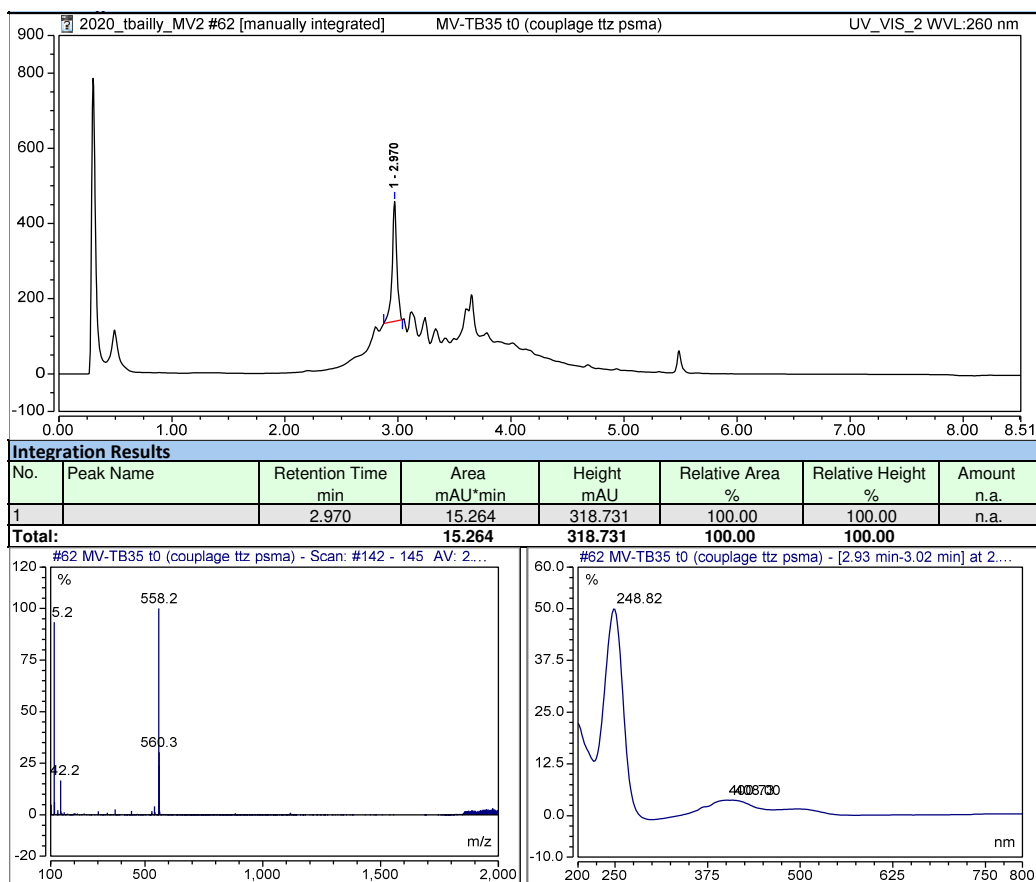


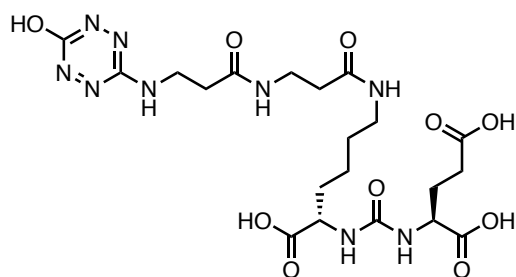
Figure 66 : Schéma de synthèse des composés 8 et 9

### e. Synthèse des ligands hétérobivalents

#### Synthèse de *KuE-Tz-Cl* et *KuE(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>-Tz-Cl*

La première étape pour assembler des ligands hétérobivalents est une réaction de substitution nucléophile aromatique de l'atome de chlore par une fonction amine, formant ainsi une chlorotétrazine monosubstituée, qui peut être isolée par RP-HPLC semi-préparative. Dans un premier temps, nous avons fait réagir le composé 4 avec la 3,6-dichlorotétrazine dans le DMF en présence de DIEA comme base. Après l'ajout de la base, le milieu réactionnel est passé d'un orange vif limpide à une couleur rouge, sombre et opaque, suggérant la dégradation de la chlorotétrazine. Les analyses HPLC-MS ont indiqué l'absence du produit désiré, et la présence, comme produit majoritaire, de l'hydroxytétrazine monosubstituée ( Figure 67).





Exact Mass: 557,22

Figure 67 : Chromatogramme HPLC-MS ( $\lambda = 260 \text{ nm}$ ) du brut réactionnel (haut) et structure du produit de dégradation (bas).

Nous avons dans un premier temps attribué cette dégradation à la présence d'eau dans le milieu réactionnel, majoritairement présente sous la forme d'ion hydroxyde qui, immédiatement après la substitution du premier atome de chlore par l'amine, déplacerait le second, générant ainsi ce produit d'hydrolyse. Afin de pallier ce problème, nous avons répété cette expérience en respectant des conditions strictement anhydres : solvants et réactifs anhydres, sous argon. Malheureusement, malgré les précautions prises, nous avons obtenu un mélange de produits de dégradation que nous n'avons pas pu identifier, sans toutefois détecter l'hydroxytétrazine monosubstituée. Nous avons donc émis l'hypothèse que la présence des acides carboxyliques libres n'est pas compatible avec la synthèse du composé cible. Ce résultat est surprenant compte tenu de la faible nucléophilie des acides carboxyliques en comparaison avec les amines et notre expérience avec les dichlorotétrazines<sup>33,35,37,125</sup>.

Nous avons reproduit cette réaction en nous plaçant en milieu tamponné (PBS, pH = 7,3). Après 5 h d'agitation à température ambiante (environ 20 °C), le composé **10** a pu être isolé avec un rendement de 16 % (Figure 68). Au regard du faible rendement obtenu, nous avons décidé de réaliser cette réaction en milieu organique (DMF) en utilisant le composé *per-tert*-butylé **5**. Cette approche fut fructueuse, nous permettant d'isoler la chlorotétrazine monosubstituée **11** avec un rendement de 61 % (Figure 68). Bien que cette approche nécessite une étape supplémentaire de déprotection des esters *tert*-butyliques, nous avons choisi de la retenir en raison de son rendement supérieur.

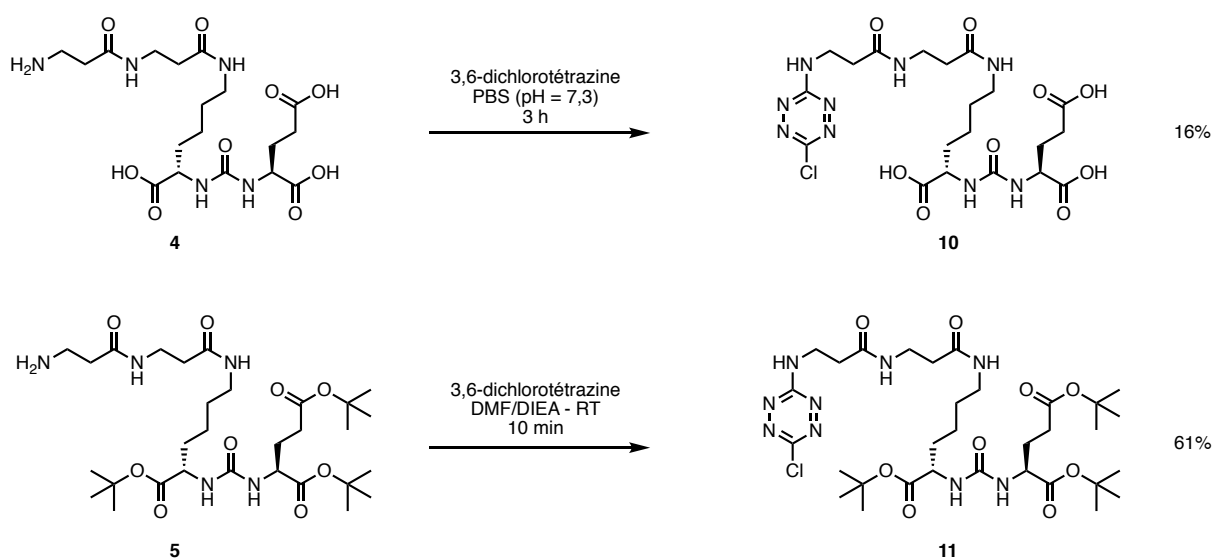


Figure 68 : Synthèses des tétrazines monosubstituées **10** et **11**.

### Réactivité des acides carboxyliques avec la 3,6-dichlorotétrazine

Bien que nous ayons réussi à produire la molécule cible avec un rendement satisfaisant, nous avons étudié la réactivité de la 3,6-dichlorotétrazine vis-à-vis des acides carboxyliques. En effet, lors du second essai de synthèse du composé **10** en milieu organique (lorsque nous nous plaçons en milieu anhydre), nous n'avons observé ni le produit désiré, ni le produit d'hydrolyse (HPLC-MS), suggérant que la 3,6-dichlorotétrazine réagissait de manière préférentielle avec les anions carboxylates. Or, nous n'avons pas observé non plus de produits de substitution par l'acide carboxylique, ce qui nous a amenés à formuler l'hypothèse que le produit formé est instable et peut-être dégradé par d'autres nucléophiles.

Nous avons donc mis au point une expérience nous permettant de confirmer notre hypothèse. Dans un premier temps, la 3,6-dichlorotétrazine et de la Fmoc-glycine (1 équivalent) ont été solubilisées dans du DMF. Puis, de la DIEA (3 équivalents) et de la pipéridine (1 équivalent) ont été ajoutées successivement au milieu réactionnel. La solution ainsi obtenue a ensuite été analysée par HPLC-MS (Figure 69).

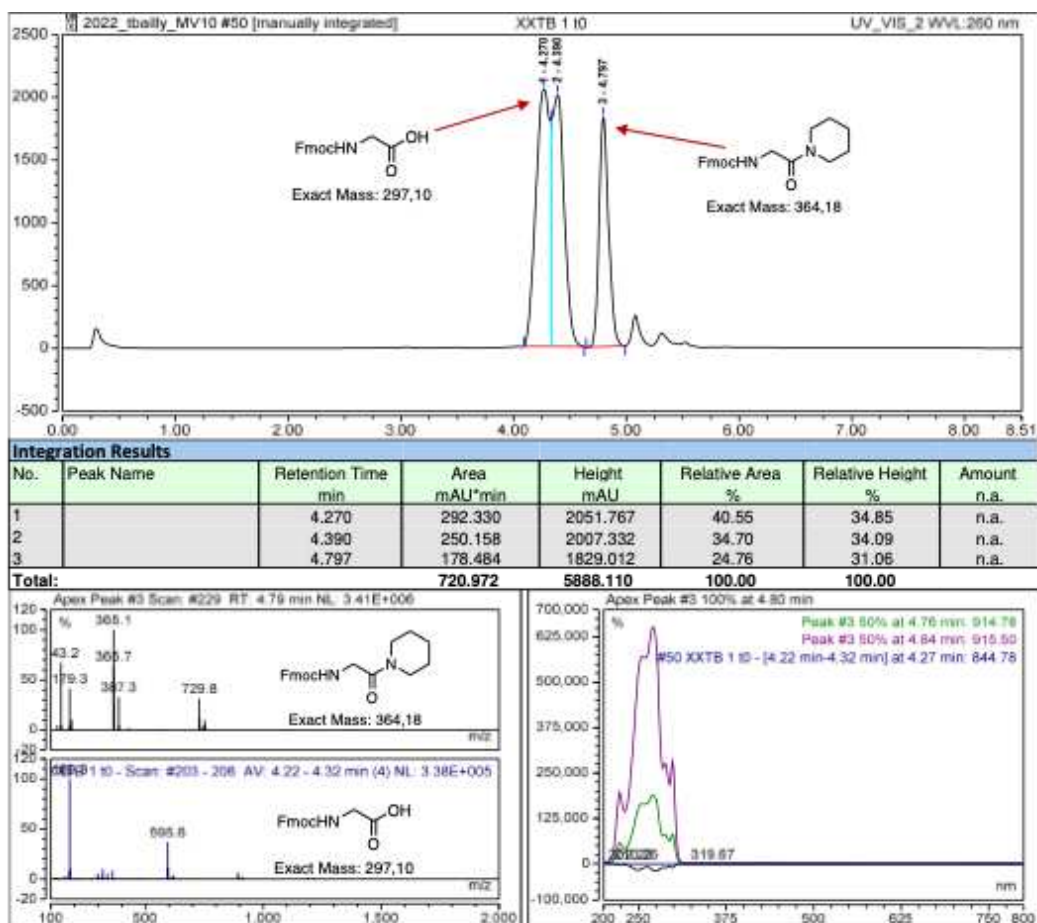


Figure 69 : Chromatogramme HPLC-MS ( $\lambda = 260 \text{ nm}$ ) d'un échantillon pris juste après ajout de la pipéridine dans le milieu réactionnel,  $t = 4,27 \text{ min}$   $m/z = 595,6$  (Fmoc-Gly-OH,  $[2M+H]^+$ ),  $t = 4,39 \text{ min}$  (tétrazine non identifiée),  $t = 4,80 \text{ min}$   $m/z = 365,1$  (Fmoc-Gly-pipéridine,  $[M+H]^+$ )

Cette expérience nous a permis de confirmer l'hypothèse selon laquelle les acides carboxyliques peuvent réagir en milieu basique avec la 3,6-dichlorotétrazine pour former un intermédiaire instable, qui peut par la suite être déplacé par un nucléophile à la manière d'un ester activé. Ainsi, la 3,6-dichlorotétrazine se comporte dans ce cas comme un agent de

couplage. Cependant, nous observons également la formation d'un dérivé comportant un cœur tétrazine non identifié, identifié par son spectre d'absorbance UV-visible acquis durant l'analyse par HPLC-MS. Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin d'isoler et d'identifier ce composé, ce qui nous permettrait probablement d'obtenir plus d'informations sur le mécanisme de cette réaction de couplage.

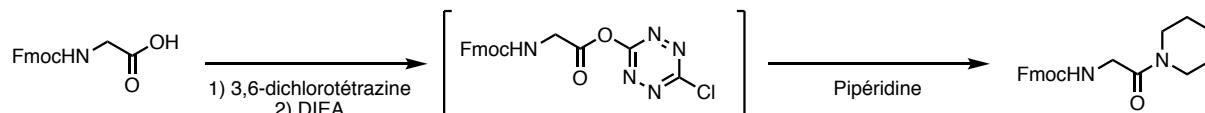


Figure 70 : Schéma réactionnel proposé pour la synthèse de Fmoc- Gly-pipéridine à partir de Fmoc- Gly-OH et de 3,6-dichlorotétrazine.

### Deuxième $S_NAr$ : incorporation du motif JMV594

La deuxième étape d'assemblage des ligands hétérobivalents consiste en une seconde réaction de substitution nucléophile aromatique avec le dérivé de JMV594 fonctionnalisé par un thiol. Comme vu dans la première partie de ce chapitre, la densité électronique accrue de la chlorotétrazine monosubstituée nous impose l'emploi de conditions plus vigoureuses pour effectuer cette réaction. La tétrazine disubstituée est donc générée par substitution du second atome de chlore par un thiol, à 80 °C dans le DMF anhydre en présence de DIEA.

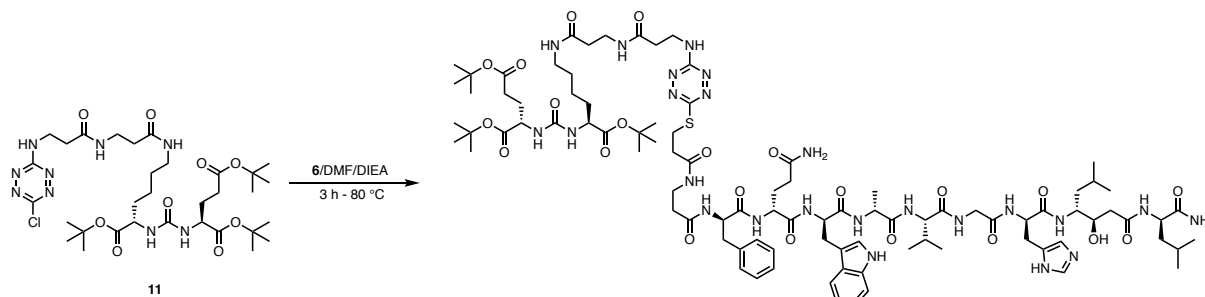


Figure 71 : Seconde substitution nucléophile avec le dérivé de JMV594 fonctionnalisé par un thiol sur le composé **11**.

En raison de l'orthogonalité de la réaction de IEDDA, nous avons fait le choix de réaliser la dernière étape sans purification préliminaire.

### Dernière étape : Réaction IEDDA et déprotection finale pour les dérivés DOTA et NODAGA

Pour finir, le DOTA-BCN ou le NODAGA-BCN (3 équivalents) ont été ajoutés au milieu réactionnel et celui-ci a été agité à 37 °C pendant 20 h. Les composés protégés ont ensuite été purifiés par RP-HPLC, puis repris dans une solution de déprotection (TFA, triisopropylsilane, DODT, eau, 94 :2 :2 :1). Après précipitation dans l'éther diéthylique, les dérivés DOTA (**12**, DOTA-HBL1) et NODAGA (**13**, NODAGA-HBL1) ont été obtenus avec des rendements globaux (depuis la 3,6-dichlorotétrazine) de 17 et 8 % (Figure 72).

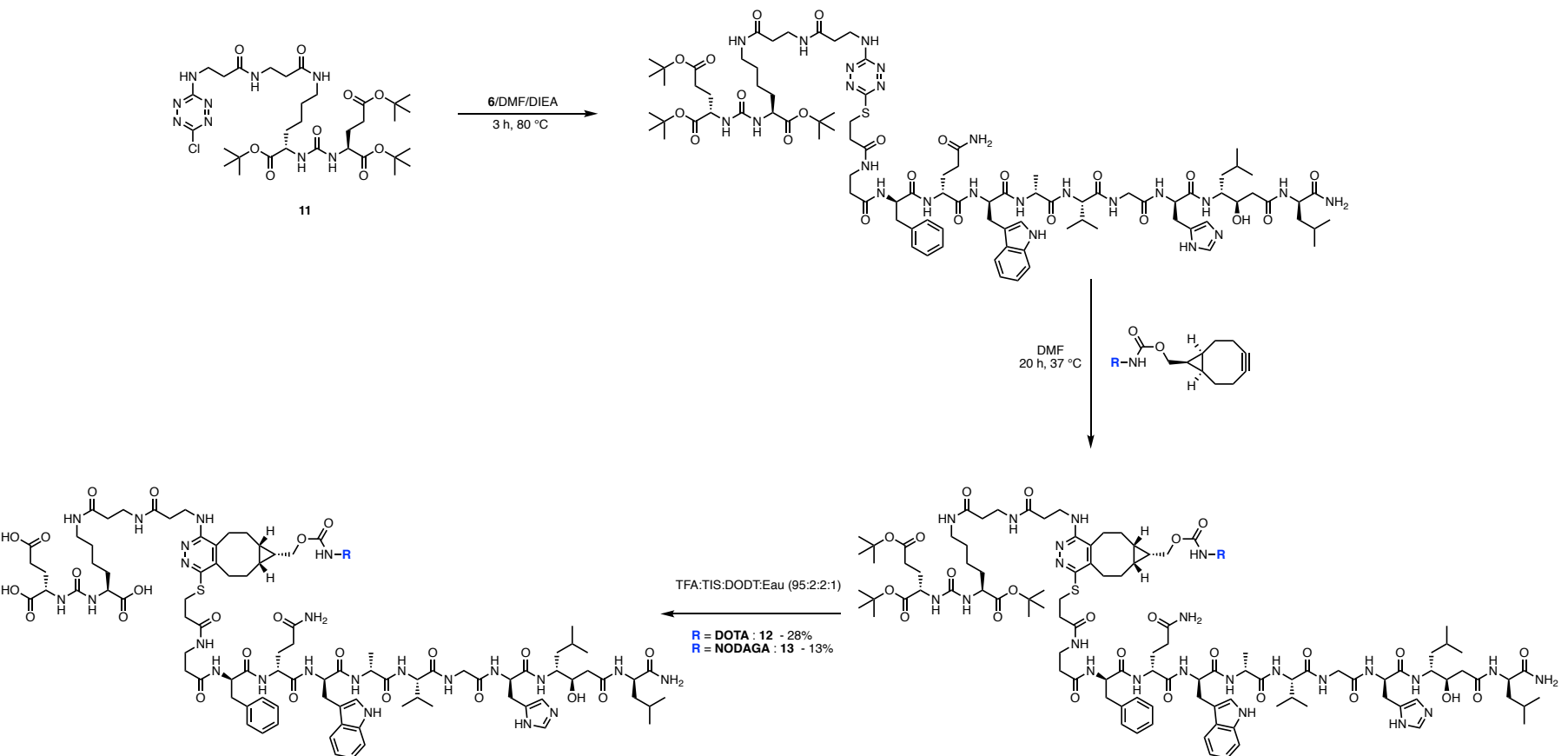


Figure 72 : Synthèse des composés **12** et **13** par substitution du composé **11**, puis réaction de IEDDA avec DOTA-BCN (**12**) ou NODAGA-BCN (**13**), suivie d'une déprotection des esters tert-butyliques.

*Dernière étape : Réaction IEDDA et déprotection finale pour le dérivé Cyanine-5*

En raison de la sensibilité de la cyanine-5 en milieu très acide, il a été nécessaire d'adopter une approche alternative à la déprotection au TFA pour éliminer les esters *tert*-butyliques. Nous avons opté pour l'acide formique. Cette approche fut un succès étant donné que nous avons pu déprotéger les acides carboxyliques en 24 h à température ambiante.

Cependant, nous avons également observé la formation d'un produit de monoformylation du ligand hétérobivalent fluorescent (*Figure 73*). Après évaporation de l'acide formique, nous avons donc traité le produit formylé obtenu avec une solution d'ammoniaque (10% dans l'acétonitrile) pendant 1 h, menant au composé **14** avec un rendement de 4% (rendement global de 2%).

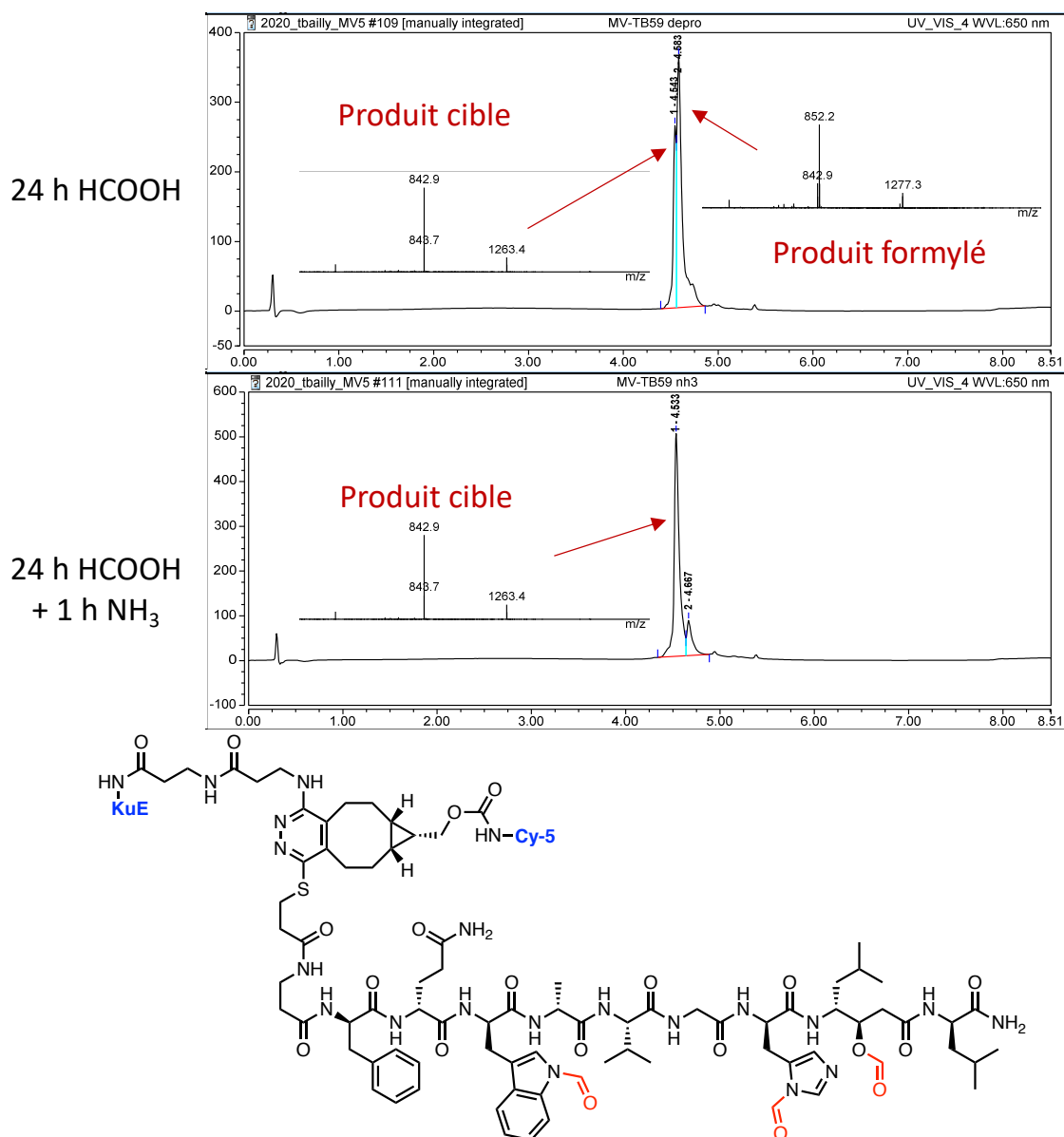


Figure 73 : Haut : chromatogramme RP-HPLC ( $\lambda = 650$  nm) et spectres LRMS des bruts réactionnels de déprotection du ligand hétérobivalent Cy-5, avant et après traitement par une solution d'ammoniaque (10 % dans l'acétonitrile). Bas : Structure de Cy5-HBL1 formylé, en rouge sont représentés les sites de formylation potentiels.

## B. Mise au point d'une procédure « one-pot »

Bien que nous ayons développé une approche modulaire et directe, qui combine les avantages des stratégies branchées et linéaires que l'on peut trouver dans la littérature<sup>113,126</sup>, nous souhaitons encore augmenter le potentiel de notre approche en développant une procédure « *one-pot* ». Celle-ci permettrait de générer des ligands hétérobivalents rapidement, avec un rendement satisfaisant tout en minimisant le nombre de purifications. Nous avons donc décidé de reprendre la synthèse du composé NODAGA-HBL1 (**13**).

**Première étape :** dans un premier temps, le composé **11** a été ajouté à une solution de 3,6-dichlorotétrazine dans le DMF (10 mg/mL, 1 équivalent). Directement après l'ajout de DIEA (3 équivalents) au milieu réactionnel, une première analyse par RP-HPLC-MS a montré que la 3,6-dichlorotétrazine est immédiatement substituée (*Figure 74*).

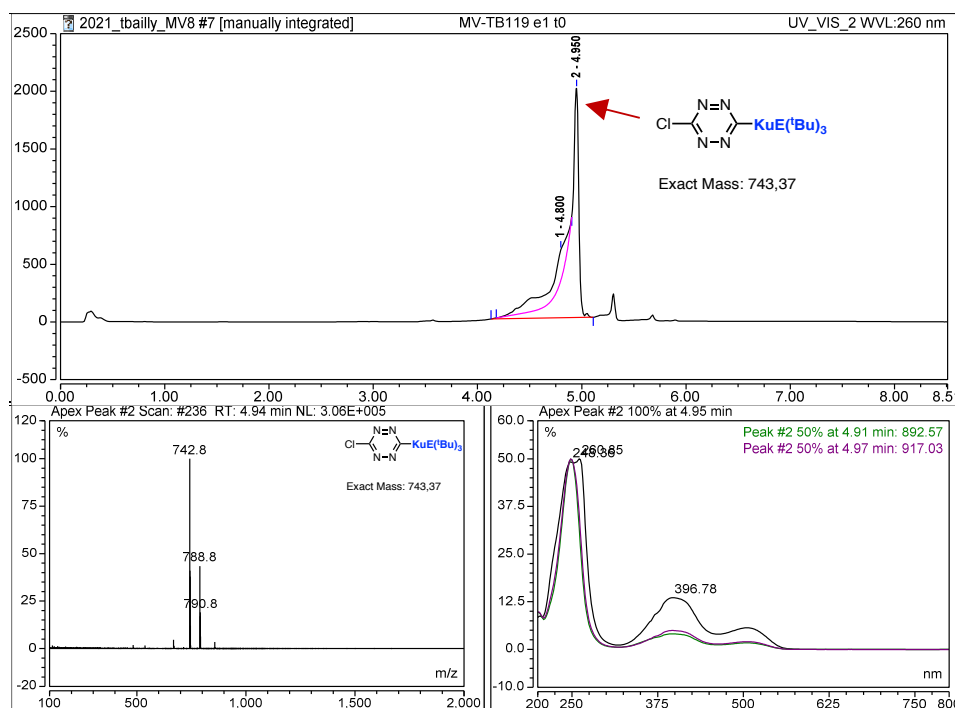


Figure 74 : Chromatogramme HPLC-MS obtenu juste après ajout de DIEA dans le milieu réactionnel contenant **11** et la dichlorotétrazine dans le DMF.

**Deuxième étape :** le composé **6** (1 équivalent) a ensuite été directement ajouté au milieu réactionnel qui a été agité à 80 °C pendant 3 h. Le suivi par RP-HPLC-MS (*Figure 75*) nous a permis d'observer la formation du produit désiré. Cependant, comme en témoigne le chromatogramme HPLC-MS, la tétrazine monosubstituée n'a pas été consommée en intégralité, et ce même en allongeant le temps de réaction et en ajoutant un excès de **6**.



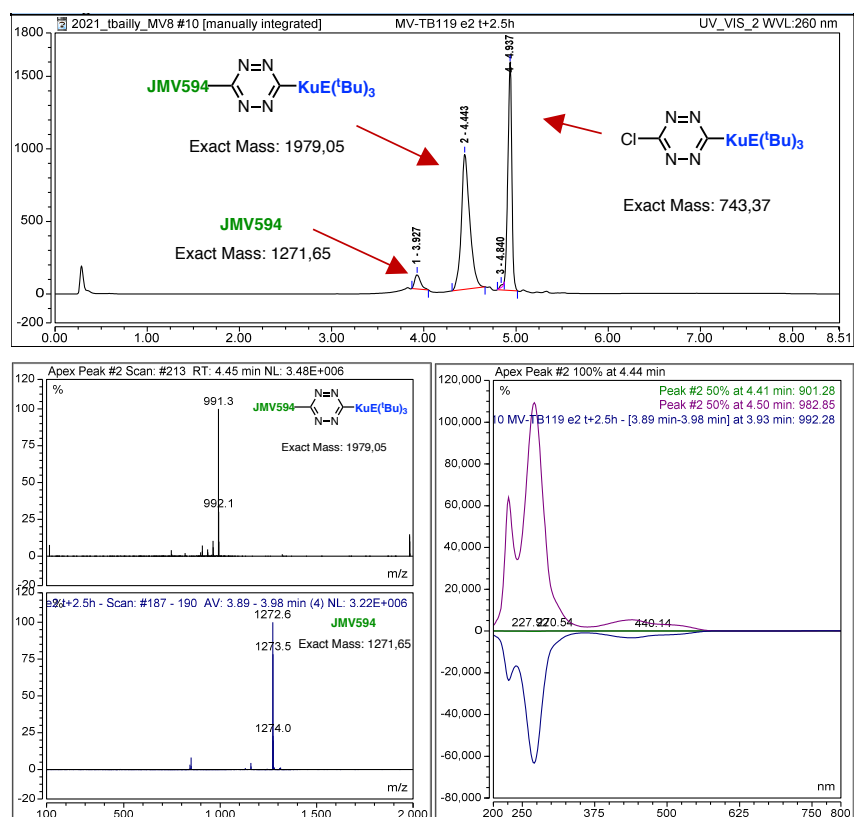


Figure 75 : Chromatogramme HPLC-MS obtenu 3 h après ajout du composé **6** dans le milieu réactionnel et agitation à 80 °C.

**Troisième étape :** l'agent chélatant NODAGA-BCN (3 équivalents) a été ajouté au milieu réactionnel après 3 h de réaction. Le milieu réactionnel a été agité pendant 20 h à 37 °C, permettant la conversion totale de la tétrazine disubstituée en pyridazine par réaction de IEDDA (Figure 76, haut). On observe également à cette étape la formation de chloropyridazine monosubstituée, résultant de la conversion incomplète observée dans l'étape précédente. Il est intéressant de souligner que la réaction de IEDDA avec la chlorotétrazine monosubstituée s'est effectuée quasiment instantanément (suivi HPLC à  $t_0$  de l'étape 3) quand celle avec la tétrazine disubstituée a nécessité 20 h d'agitation à 37 °C. Deux phénomènes permettent d'expliquer ceci : premièrement l'encombrement stérique, généré par la présence du peptide, est un effet bien connu pour ralentir les réactions de IEDDA avec les tétrazines<sup>127</sup>. Deuxièmement, l'effet électro attracteur de l'atome de soufre est moins prononcé que celui de l'atome de chlore, en conséquence, le cœur tétrazine est plus riche en électrons, ralentissant ainsi la cycloaddition.

Le composé *tert*-butylé a pu être isolé par RP-HPLC avec une excellente pureté (Figure 76, bas).

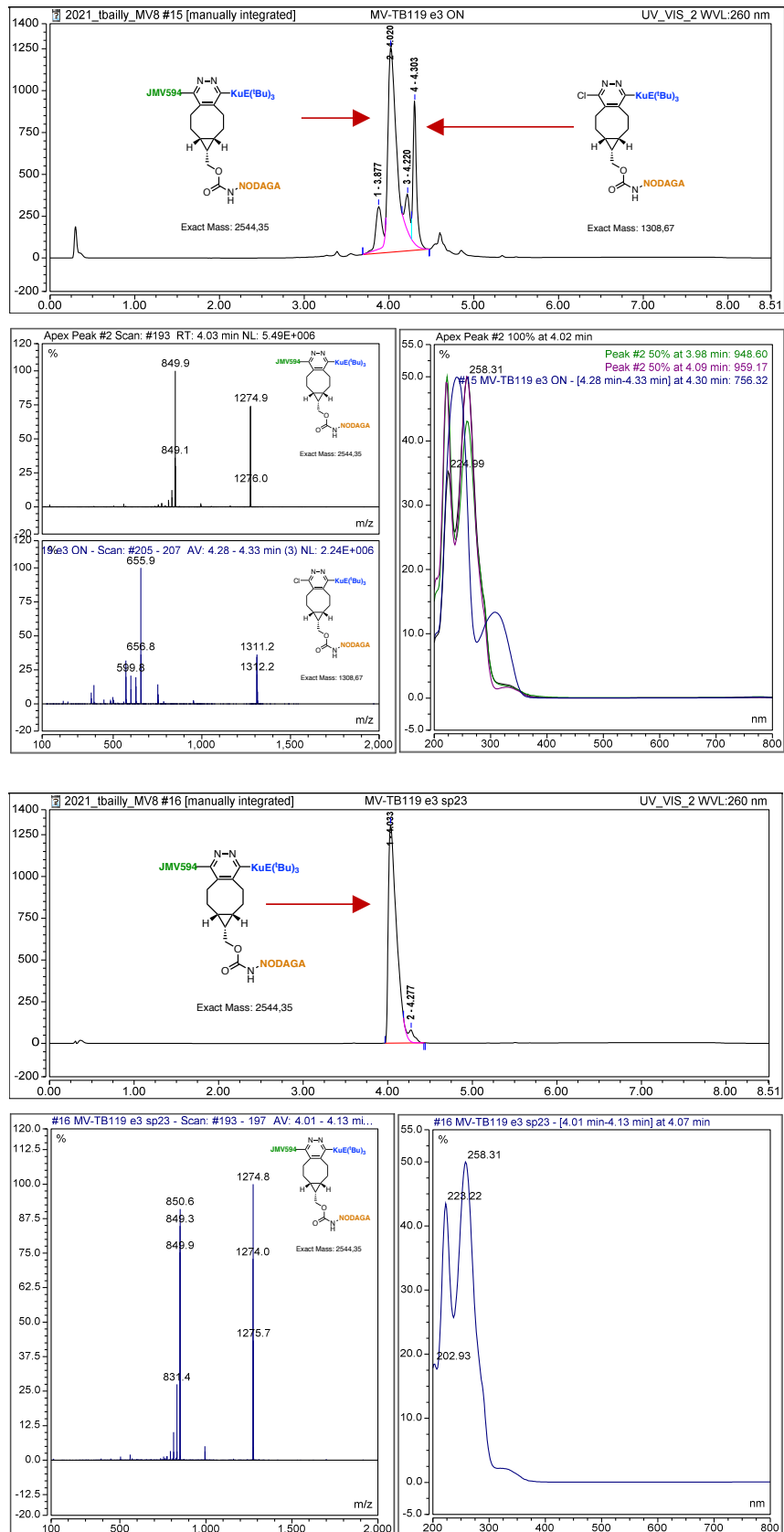


Figure 76 : Haut : chromatogramme HPLC-MS obtenu 20 h après ajout de NODABA-BCN dans le milieu réactionnel et agitation à 37 °C. Bas : Chromatogramme HPLC-MS obtenu après purification de l'hétérovalent protégé par RP-HPLC.

**Dernière étape :** l'étape finale de cette approche « *one-pot* » est la déprotection des acides carboxyliques de la partie lysine-urée-acide glutamique, par déprotection en milieu acide pendant 1 h à température ambiante. Le composé **13** obtenu de manière quantitative après la dernière étape a finalement été précipité dans l'éther diéthylique (4 °C) (Figure 77).

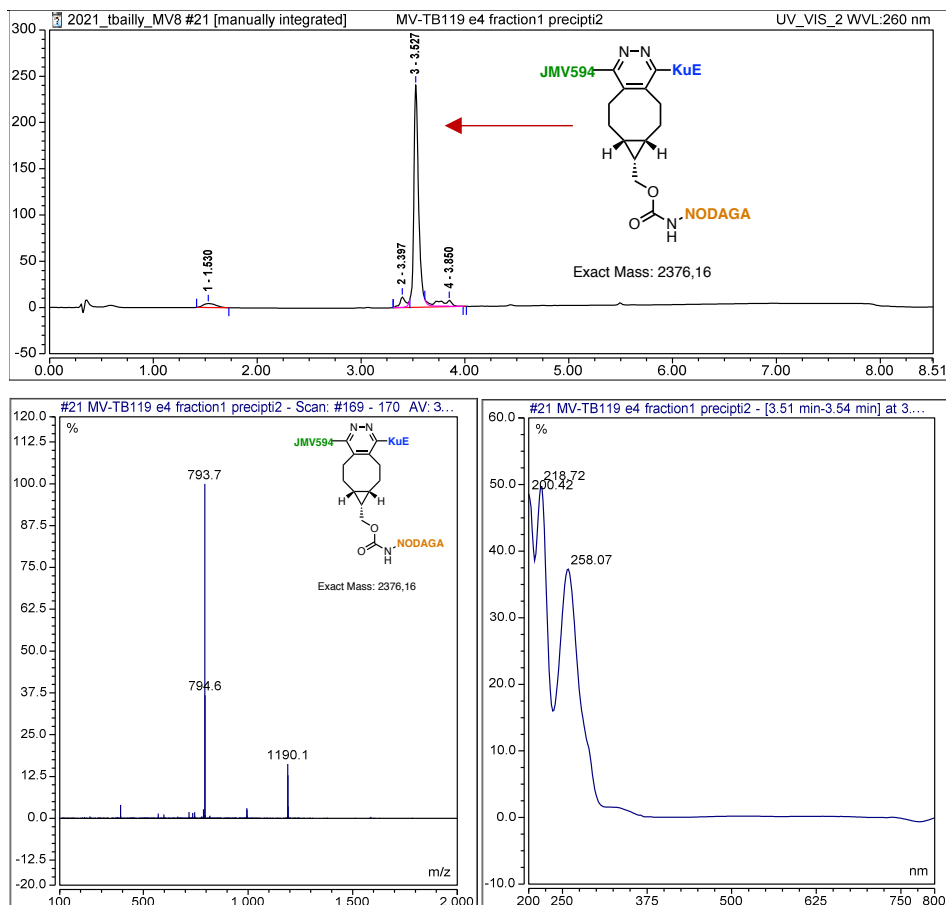


Figure 77 : Chromatogramme HPLC-MS obtenu après déprotection et précipitation de NODAGA-HBL1 (**13**).

**Conclusion :** Cette approche « *one-pot* » garantit un accès rapide et efficace à différents types de molécules trisubstituées basées sur une plateforme pyridazine. La synthèse du composé **13**, en utilisant cette méthode, a pu être conduite en moins de 24 h, avec une seule étape finale de purification par HPLC. Nous avons ainsi obtenu un rendement global de 26 % (au départ de la 3,6-dichlorotétrazine) contre un rendement de 8% lorsque la procédure par étapes était utilisée. Le développement de cette nouvelle approche nous permettra de synthétiser une large bibliothèque de traceurs hétérobivalents.

### C. Synthèse de deux ligands monovalents de référence

La suite de nos travaux a consisté à synthétiser des ligands monovalents basés sur la même structure que les ligands hétérobivalents dont la synthèse a été décrite dans la partie précédente. Ces ligands monovalents seront utilisés comme références afin de confirmer l'hypothèse selon laquelle l'hétérobivalence conférerait au traceur des propriétés améliorées de ciblage des cellules cancéreuses.

### a. Conception

Les ligands que nous nous sommes proposés de synthétiser ont une structure analogue au composé **13**. La partie assurant le ciblage est liée à la plateforme par une fonction amine, et, en *para*, le second vecteur est remplacé par l'acide 3-mercaptopropanoïque, lié à la plateforme par l'atome de soufre (*Figure 78*).

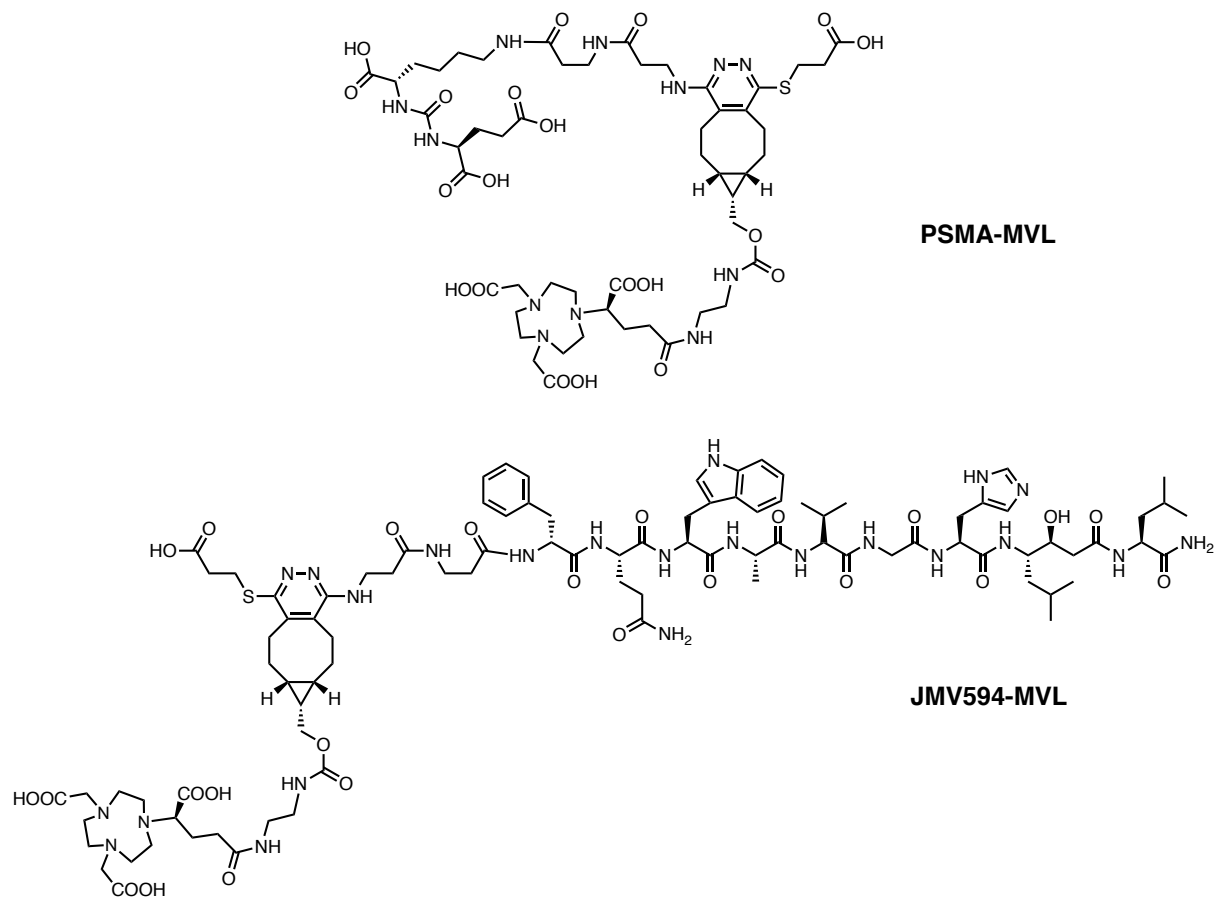
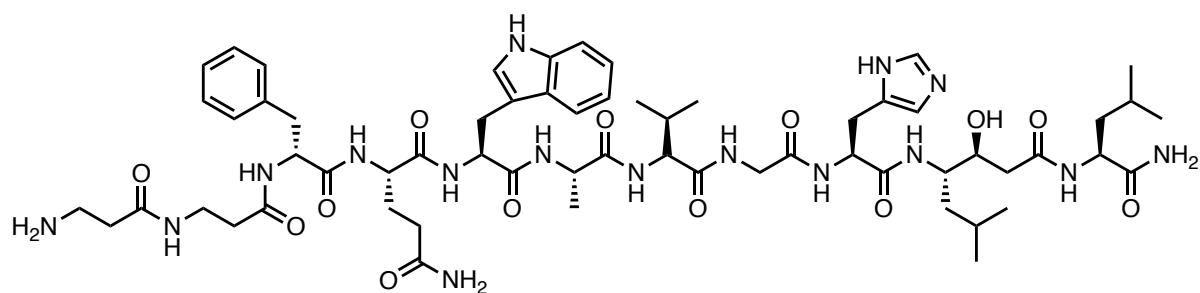


Figure 78 : Structure des monovalents PSMA-MVL (haut) et JMV594-MVL (bas).

### b. Synthèse de H-(βAla)<sub>2</sub>-JMV594

Comme nous l'avons vu dans la partie « Réactivité des acides carboxyliques avec la 3,6-dichlorotétrazine », la présence d'acides carboxyliques lors de la première étape de synthèse de nos molécules est préjudiciable à son bon déroulement. C'est pourquoi nous avons décidé, pour la synthèse de JMV594-MVL, d'incorporer le motif ciblant GRPR lors de la première étape. Pour ce faire, il a fallu réaliser la synthèse de H-(βAla)<sub>2</sub>-JMV594 (**15**). Le composé **15** a été synthétisé par SPPS, en utilisant le composé **2** au lieu du composé **3** lors de la dernière étape de couplage manuel. Le composé **15** (*Figure 79*) a ainsi pu être obtenu avec un rendement de 18 %.

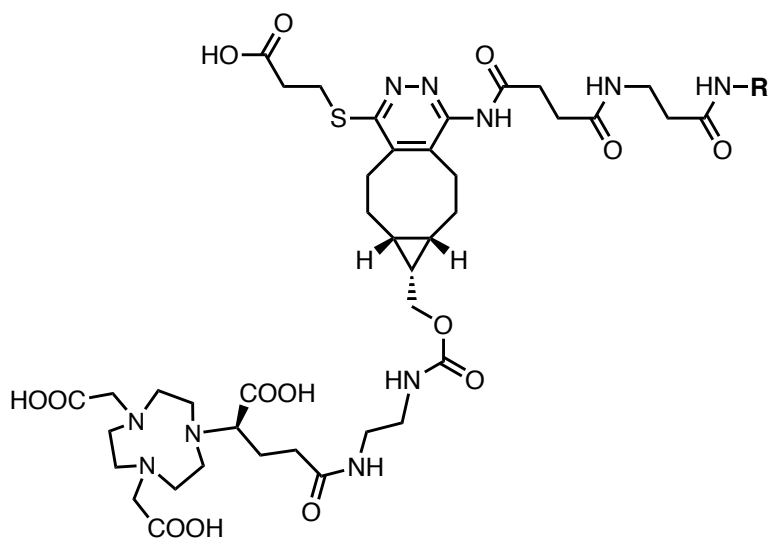


15

Figure 79 : Structure du composé 15.

### c. Assemblage des ligands monovalents

En raison de son efficacité, nous avons choisi d'assembler nos deux molécules cibles au moyen de l'approche *one-pot*. Les ligands monovalents PSMA-MVL (**16**) et JMV594-MVL (**17**) ont ainsi pu être obtenus avec des rendements respectifs de 35 % et 8 % (Figure 41).



R = **PSMA (16)** ou **JMV594 (17)**

Figure 80 : Structures des ligands monovalents 16 et 17.

### III. Évaluation de NODAGA-HBL1 pour l'imagerie du cancer de la prostate

NODAGA-HBL1 (**13**) a été sélectionné pour être évalué *in vitro* et *in vivo* sur des modèles du cancer de la prostate : les cellules PC3 (GRPR<sup>+</sup>) et les cellules 22Rv1 (PSMA<sup>+</sup>). Les objectifs de cette étude étaient : 1) de vérifier si les vecteurs que nous avons sélectionnés conservaient leur affinité pour leur récepteur *in vitro* et, 2) d'étudier si le ligand hétérobivalent rassemblant ces deux vecteurs était capable de s'accumuler de manière spécifique au sein des cellules tumorales dans un modèle murin. Nous avons choisi de travailler dans un premier temps sur le composé **13** en raison de sa fonctionnalisation avec le chélateur NODAGA, idéal pour effectuer de l'imagerie nucléaire au gallium-68. Des études préliminaires *in vivo* ont également été effectuées sur le composé **12**, fonctionnalisé par le chélateur universel DOTA.

#### 1. Études *in vitro*

Les études *in vitro* ont été réalisées à l'Institut de neurosciences cognitives et intégratives d'Aquitaine (INICIA UMR 5287, Bordeaux) par le Dr Clément Morgat dans le cadre du projet BIVALIMAG financé par l'infrastructure « France Life Imaging » (FLI).

##### A. Radiomarquage et évaluation de l'hydrophilie (logD)

Les composés **13**, **16**, et **17** ont été radiomarqués avec succès au gallium-68 (voir partie expérimentale) avec de bons rendements (79 à 95 %) et puretés radiochimiques (> 80 %). L'hydrophilie des radioconjugués [<sup>68</sup>Ga]Ga-**16**, [<sup>68</sup>Ga]Ga-**17** et [<sup>68</sup>Ga]Ga-**13** a été estimée par mesure des logD<sub>octanol/PBS (pH = 7,4)</sub> suivant la méthode *shake-flask*. Les radioconjugués ont tous trois montré un caractère hydrophile, les valeurs de logD étant négatives (*Tableau 9*). La valeur de logD plus élevée affichée par [<sup>68</sup>Ga]Ga-**17** (JMV594-MVL), se justifie par le nombre inférieur de groupements acides carboxyliques hydrosolubilisants.

##### B. Mesure des constantes de dissociation et du pourcentage d'internalisation sur cellules PC3 et 22Rv1

L'affinité, le pourcentage d'internalisation ainsi que l'efflux des trois radioconjugués ont été évalués sur cellules PC3 (GRPR<sup>+</sup>) et 22Rv1 (PSMA<sup>+</sup>). La spécificité des interactions observées a été confirmée pour chaque étude par des expériences contrôle, en présence d'un large excès (10 μM) de ligand de référence non marqué : 2-PMPA pour les cellules 22Rv1 et bombésine (sel de trifluoroacétate) pour les cellules PC3.

Les expériences cinétiques d'interaction avec les récepteurs du GRP (sur cellules PC3) ont montré une internalisation du composé [<sup>68</sup>Ga]Ga-**13** dès 30 min (4.7 ± 3.9%) après l'ajout et 5.4 ± 1.8 % de l'activité associée à la cellule après 1 h ainsi qu'une fraction importante d'activité liée à la membrane (11.5 ± 4.9% après 1 h d'incubation). Ces données sont en accord avec une forte fraction membranaire du peptide utilisé pour cibler le GRPR (*Tableau 9*)<sup>128</sup>.

D'autre part, des expériences de détermination d'affinité par saturation ont permis de démontrer que le composé monovalent [<sup>68</sup>Ga]Ga-16 possède une forte affinité pour la PSMA ( $K_D = 10,5$  nM) et que le monovalent ciblant GRPR [<sup>68</sup>Ga]Ga-17 se lie à sa cible avec une affinité de 17,9 nM. L'hétérobivalent [<sup>68</sup>Ga]Ga-13 a également démontré sa capacité à se lier au GRPR et à la PSMA, avec une faible constante de dissociation ( $K_D$  (PSMA) =  $17,7 \pm 4,9$  nM ;  $K_D$  (GRPR) =  $1,9 \pm 1,2$  nM).

Il est intéressant de constater que les affinités de l'hétérobivalent [<sup>68</sup>Ga]Ga-13 et du monovalent [<sup>68</sup>Ga]Ga-16 envers PSMA sont comparables, alors que [<sup>68</sup>Ga]Ga-13 est près de 10 fois plus affiné de GRPR que le monovalent [<sup>68</sup>Ga]Ga-17. Puisque la caractérisation *in vitro* de ces composés a été effectuée sur cellules de lignée PC-3 (PSMA<sup>-</sup>, GRPR<sup>+</sup>), le gain en affinité ne peut pas être attribué à une interaction hétérobivalente. Nous en concluons donc que la présence du motif KuE ciblant PSMA au sein du radiotracteur hétérobivalent agit comme un pharmacomodulateur qui améliore l'affinité de JMV594 pour sa cible. Des études complémentaires sont actuellement en projet afin de déterminer la manière avec laquelle le motif KuE influe sur l'affinité de l'hétérobivalent pour GRPR.

Radioconjugué	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-13	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-16	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-17
LogD	$-2,47 \pm 0,19$	$-3,47 \pm 0,06$	$-1,85 \pm 0,03$
$K_D$ PSMA (nM)	$17,7 \pm 4,9$	10,5 (95 % CI = 5,0 – 20,2nM)	/
$K_D$ GRPR (nM)	$1,9 \pm 1,2$	/	17,9
Internalisation GRPR (1 h)	$5,4 \pm 1,8$ % (internalisé) $11,5 \pm 4,9$ % (membrane)	/	$3,6 \pm 0,4$ % (internalisé) $6,3 \pm 4,8$ % (membrane)
Internalisation PSMA (1 h)	-	$17,5 \pm 4,1$ % (internalisé) $22,2 \pm 8,6$ % (membrane)	-

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des études *in vitro* menées sur les composés [<sup>68</sup>Ga]Ga-13, [<sup>68</sup>Ga]Ga-16 et [<sup>68</sup>Ga]Ga-17.

Les résultats *in vitro* présentés dans ce paragraphe nous ont permis de démontrer que notre approche pour générer des traceurs hétérobivalents de manière simple et directe n'entravait pas l'affinité des vecteurs pour leur cible. Afin de confirmer les résultats obtenus *in vitro*, les résultats obtenus ont dû être complétés par une étude *in vivo*.

## 2. Études *in vivo* et *ex vivo*

Parallèlement à ces études *in vitro*, une étude préliminaire *in vivo* a été effectuée sur les composés 12, 13, 16 et 17. L'ensemble des études *in vivo* ont été réalisées au sein du Laboratoire d'imagerie moléculaire positronique (LIMP, UMS28, Paris) par la Dr Aurélie Prignon. Nos radioconjugués ont été comparés à deux références disponibles commercialement : le PSMA11 et l'AMBA, évoqués précédemment.

## A. Radiomarquage

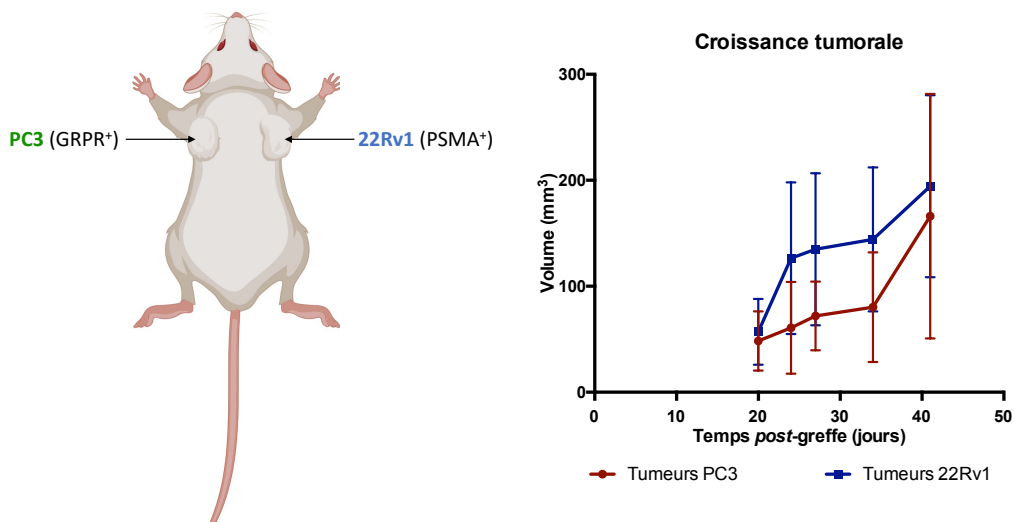
Les composés **12**, **13**, **16**, **17** ainsi que les composés de référence **AMBA** et **PSMA11** ont pu être radiomarqués au gallium-68 à l'aide d'un automate de marquage. Après radiosynthèse, les composés ont été isolés par purification sur colonne C18 Sep-pack et ont été obtenus avec des rendements et puretés radiochimiques élevés (*Tableau 10*).

Radioconjugué	RRC (%)	PRC (%)
[ <sup>68</sup> Ga]Ga- <b>12</b>	97	> 99
[ <sup>68</sup> Ga]Ga- <b>13</b>	97	98
[ <sup>68</sup> Ga]Ga- <b>16</b>	93	> 99
[ <sup>68</sup> Ga]Ga- <b>17</b>	88	94
[ <sup>68</sup> Ga]Ga- <b>PSMA11</b>	95	> 99
[ <sup>68</sup> Ga]Ga- <b>AMBA</b>	79	82

*Tableau 10 : Bilan des rendements (RRC) et puretés radiochimiques (PRC) obtenus suite au radiomarquage des six composés avec du gallium-68*

## B. Modèle murin

Les études *in vivo* ont été réalisées sur souris athymiques *nude*, doublement xéno greffées avec des cellules PC3 sur l'épaule gauche et des cellules 22Rv1 sur l'épaule droite. 1,8 million de cellules ont été implantées par voie sous-cutanée à chaque épaule et la taille des tumeurs a été mesurée tout au long de la croissance tumorale jusqu'à 41 jours post-greffe (*Figure 81*).



*Figure 81 : Représentation du modèle murin (gauche) et évolution du volume des tumeurs sur 34 jours (droite)*

La croissance des tumeurs s'est avérée être relativement linéaire entre 20 et 41 jours post-implantation. De plus, les tumeurs 22Rv1 et PC3 ont montré un rythme de croissance similaire, permettant ainsi d'effectuer les expériences avec des tumeurs de tailles comparables.



### C. Étude TEP

#### a. Traceurs de référence [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA11 et [<sup>68</sup>Ga]Ga-AMBA

Afin de mener une étude d'imagerie *in vivo*, la première étape consistait à valider le modèle murin que nous avons développé. Pour ce faire, après anesthésie, une série de souris fut injectée avec [<sup>68</sup>Ga]Ga-AMBA ( $n = 790 \pm 30$  pmol,  $5,6 \pm 0,2$  MBq) et une souris avec [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA11 (1,5 nmol, 4,15 MBq). Les souris ont ensuite subi un examen TEP, entre 50 et 70 minutes après l'injection des composés radiomarqués. Les images ainsi obtenues ont montré à chaque fois une accumulation dans la tumeur ciblée par le radiotracer, sans signal détecté dans l'autre, validant ainsi le modèle animal. La spécificité de la fixation des radiotraceurs est attestée grâce à l'absence de radioactivité dans la xénogreffe non ciblée par le traceur injecté.

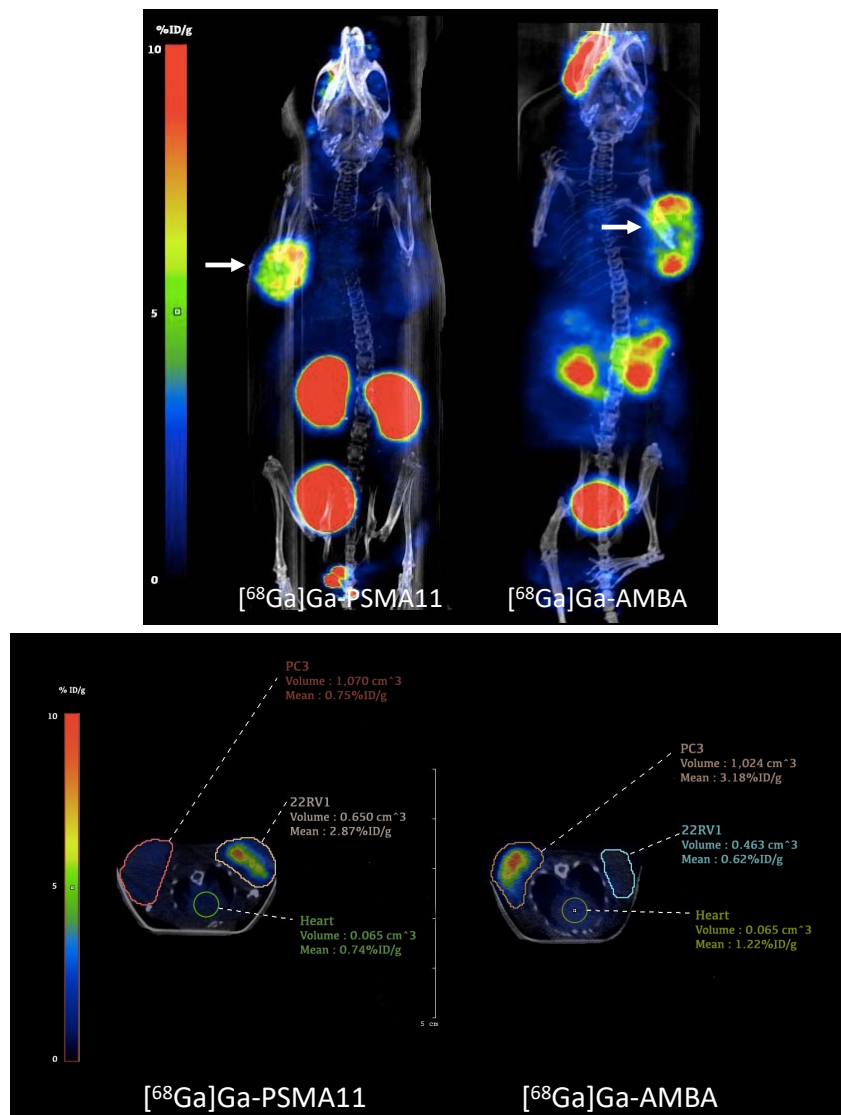


Figure 82 : Coupes longitudinales (haut) et coupes transversales (bas) d'images TEP/CT (MIP, maximum intensity projection) obtenues entre 50 et 70 minutes après injection de [<sup>68</sup>Ga]Ga-AMBA et [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA11. Les tumeurs sont marquées d'une flèche blanche.

La biodistribution *in vivo* calculée à la suite du traitement de ces images est reportée dans le *Tableau 11*. Dans le cas de [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA11, on remarque une forte excrétion rénale, qui est moins marquée lorsqu'on observe la biodistribution de [<sup>68</sup>Ga]Ga-AMBA. Cette différence est

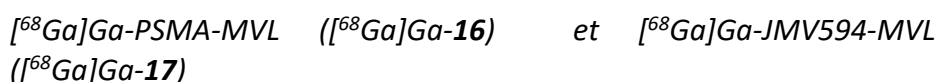
premièrement la conséquence du caractère plus lipophile de l'AMBA en comparaison à PSMA-11 mais s'explique également par la présence endogène de GRPR dans le système digestif.

Radioconjugué	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-AMBA	[ <sup>68</sup> Ga]Ga-PSMA11
Tumeur 22Rv1 (%IA/cm <sup>3</sup> )	0,20	3,31
Tumeur PC3 (%IA/cm <sup>3</sup> )	1,32	0,73
Rein droit (%IA/cm <sup>3</sup> )	3,0	32,2
Rein gauche (%IA/cm <sup>3</sup> )	2,8	35,4
Foie (%IA/cm <sup>3</sup> )	0,46	0,28

Tableau 11 : Biodistribution *in vivo* des traceurs de référence [<sup>68</sup>Ga]Ga-AMBA et [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA11 entre 50 et 70 minutes après leur injection.

#### b. Traceurs JMV594-MVL, PSMA-MVL, NODAGA-HBL1 et DOTA-HBL1

Après validation du modèle animal, l'étude s'est poursuivie avec les expériences TEP sur les composés monovalents [<sup>68</sup>Ga]Ga-JMV594-MVL ([<sup>68</sup>Ga]Ga-**17**) et [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA-MVL ([<sup>68</sup>Ga]Ga-**16**) ainsi que les ligands hétérobivalents [<sup>68</sup>Ga]Ga-NODAGA-HBL1 ([<sup>68</sup>Ga]Ga-**13**) et [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-HBL1 ([<sup>68</sup>Ga]Ga-**12**).



**TEP statique – 1 h et 2 h post-injection.** Les composés monovalents [<sup>68</sup>Ga]Ga-**16** (n = 3, 1,306 ± 0,181 nmol, 8,57 ± 1,19 MBq) et [<sup>68</sup>Ga]Ga-**17** (n = 1, 527 pmol, 5,20 MBq) ont été à leur tour injectés. Deux séries d'images TEP ont été acquises, la première entre 40 et 60 minutes après injection, et la seconde entre 1 h 40 et 2 h après injection (*Figure 83*).

On observe une nette accumulation du composé [<sup>68</sup>Ga]Ga-**16** au sein de la tumeur 22Rv1. En revanche, et comme nous le laissaient présager les résultats *in vitro*, le composé [<sup>68</sup>Ga]Ga-**17** ne semble s'accumuler que très légèrement dans la tumeur PC3, ce qui peut s'expliquer par sa constante de dissociation défavorable.

Contrairement à [<sup>68</sup>Ga]Ga-**16**, [<sup>68</sup>Ga]Ga-**17** semble être éliminé partiellement *via* une excrétion hépatobiliaire, comme en témoigne l'accumulation de signal observé dans le foie ainsi que dans la vésicule biliaire. Ce profil d'élimination peut s'expliquer notamment par la lipophilie supérieure de ce traceur, comparée à son analogue ciblant la PSMA. L'analyse de ces images a tout de même montré que [<sup>68</sup>Ga]Ga-**17** s'accumule de manière spécifique au sein de la tumeur PC3, exprimant le GRPR. En effet, entre 40 et 60 minutes après injection, une activité de 1,88 %IA/cm<sup>3</sup> (contre 0,44 %IA/cm<sup>3</sup> pour la tumeur 22Rv1) et 1,38 %IA/cm<sup>3</sup> entre 1 h 40 et 2 h (contre 0,24 %IA/cm<sup>3</sup> pour 22Rv1) a été mesurée. [<sup>68</sup>Ga]Ga-**16**, pour sa part, montre une accumulation de 1,91 ± 0,76 %IA/cm<sup>3</sup> entre 40 et 60 minutes après injection (contre 0,44 ± 0,19 %IA/cm<sup>3</sup> dans la tumeur PC3) et 1,61 ± 0,81 %IA/cm<sup>3</sup> (0,25 ± 0,11 %IA/cm<sup>3</sup> pour la PC3) au bout de 1 h 40 à 2 h.

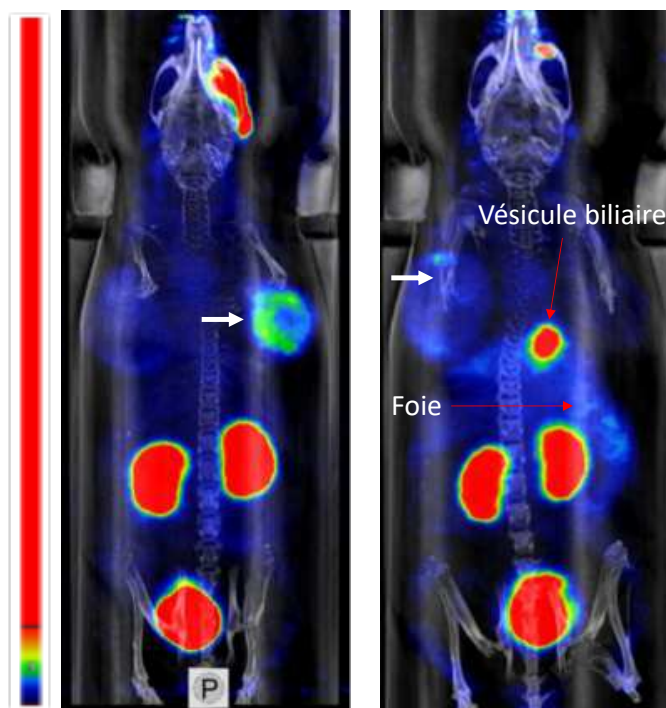


Figure 83 : Coupes longitudinales (images TEP-CT, maximum intensity projection) entre 50 et 70 minutes après injection de  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-16}$  (gauche) et  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-17}$  (droite).

Les composés **16** et **17** ont été synthétisés afin d'étudier si la plateforme d'assemblage peut avoir une influence négative sur la biodistribution du composé et pour servir de contrôle afin de comparer les performances des composés hétérovalents et des monovalents de façon systématique. D'une part, **16** semble se comporter comme attendu, suivant un profil de biodistribution très similaire à celui de **PSMA-11**. D'autre part, grâce à l'étude de TEP statique, nous avons pu constater que le composé **17** a retenu une affinité envers les récepteurs GRPR. Cependant, il semble être partiellement excrété par voie hépatobiliaire, ce qui n'est pas observé pour d'autres dérivés de JMV594. Cette observation pourrait indiquer que la plateforme pourrait agir négativement sur la biodistribution des composés. Cependant, les résultats obtenus à ce jour pour  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-17}$  reposent sur des expériences réalisées sur une unique souris. Ces résultats sont donc préliminaires et ne peuvent pas présager du comportement général du traceur *in vivo*.

**Biodistribution *ex vivo* – 2 h post-injection de  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-16}$ .** Afin de confirmer les résultats de l'expérience de TEP statique, nous avons procédé à une expérience de biodistribution *ex vivo* de  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-16}$ . Pour ce faire, deux heures après injection de  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-16}$  ( $1306 \pm 181$  pmol,  $8,57 \pm 1,19$  MBq,  $n = 3$ ), les souris ont été sacrifiées, disséquées, leurs organes pesés et la radioactivité au sein de ces derniers mesurée, pour donner le diagramme de biodistribution présenté dans la Figure 84.

En accord avec les images TEP obtenues,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-16}$  affiche une biodistribution favorable pour l'imagerie. En effet, on observe du signal majoritairement dans les reins ( $9,95 \pm 8,02$  %ID/g) et au sein de la tumeur 22Rv1 ( $2,17 \pm 0,75$  %ID/g). Ceci confirme que le traceur est éliminé par voie rénale plutôt que par voie hépatobiliaire. L'accumulation de signal dans les reins est également due à l'expression de la PSMA dans ce tissu<sup>129</sup>. Cette étude confirme donc les résultats obtenus *in vitro*, à savoir que  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-MVL-PSMA}$  est un bon ligand de référence pour la PSMA.

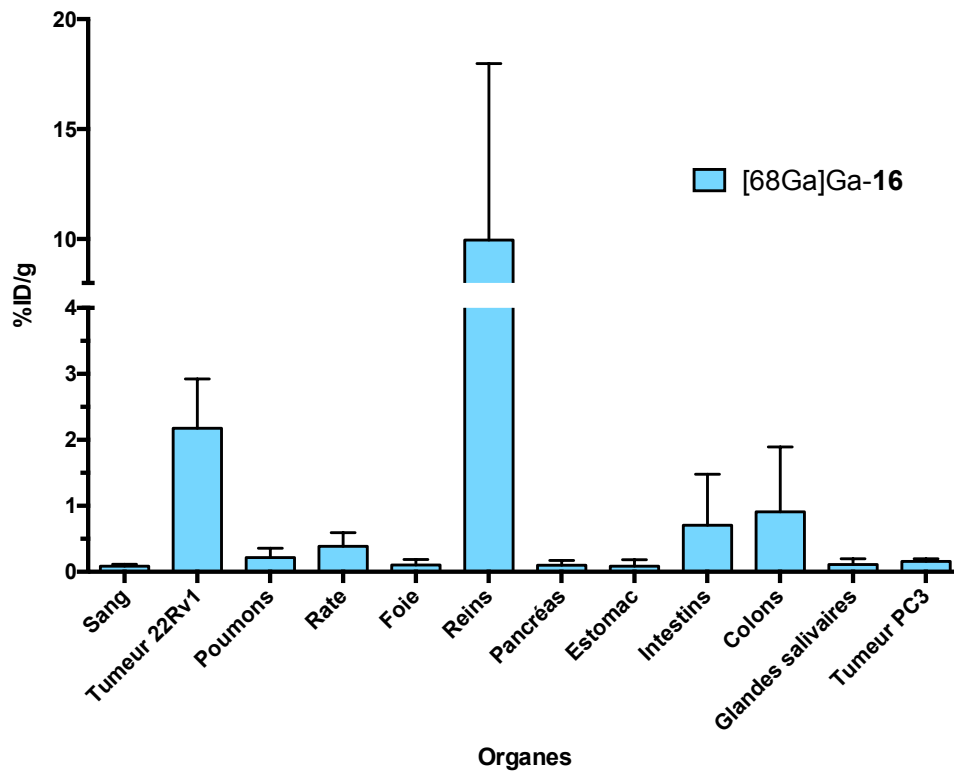


Figure 84 : Biodistribution 2 h p.i. de  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-16}$ .

**Biodistribution *ex vivo* – 2 h post-injection de  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-17}$ .** La même expérience a été effectuée avec  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-17}$  ( $911 \pm 110$  pmol,  $2,27 \pm 0,25$  MBq,  $n = 4$ ).

Les résultats obtenus pour  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-17}$  ne sont pas aussi encourageants. Bien que  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-17}$  s'accumule au sein de la tumeur PC3 ( $1,26 \pm 0,33$  %ID/g), le composé affiche un fort signal circulant, la radioactivité dans le sang n'étant pas négligeable ( $0,69 \pm 0,06$  %ID/g). De plus l'excrétion hépatobiliaire de ce composé est responsable d'une forte activité au niveau du foie ( $1,02 \pm 0,45$  %ID/g) ainsi qu'au niveau des intestins ( $4,51 \pm 4,73$  %ID/g). L'accumulation importante de signal au niveau du pancréas ( $3,53 \pm 2,09$  %ID/g) est quant à elle attribuée à la présence de GRPR au sein de cet organe (à confirmer par des études de *blocking*). Pour finir, il semblerait que  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-MVL-JMV594}$  ne soit pas un bon ligand de référence pour le ligand hétérobivalent. En effet, bien qu'il s'accumule dans la tumeur, le bruit de fond important ne permet pas une délimitation sans équivoque des tissus tumoraux.

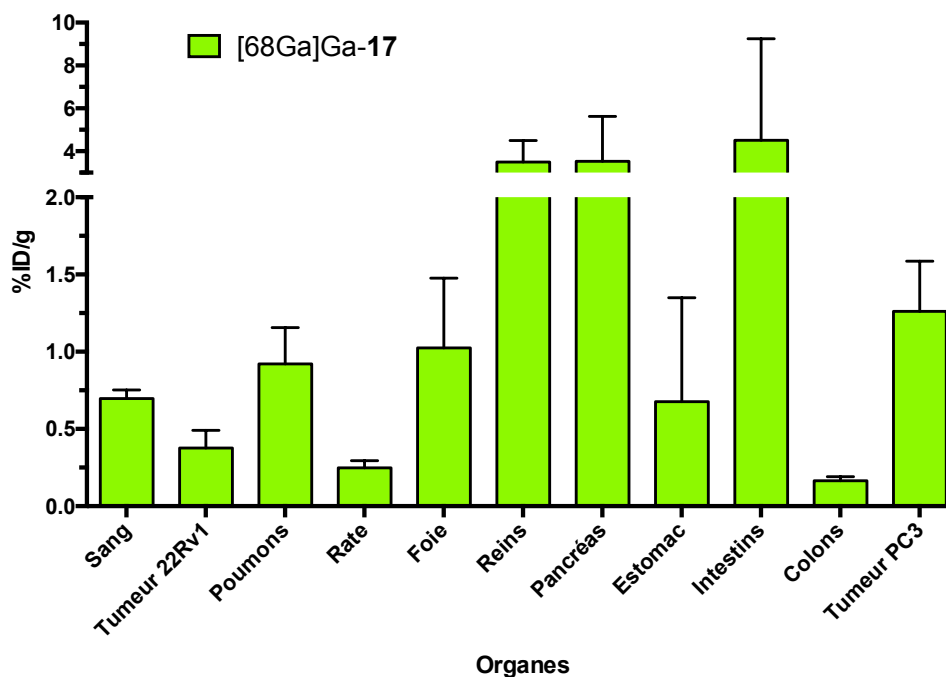


Figure 85 : Biodistribution 2 h p.i. de  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-17}$

#### $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-HBL1}$ ( $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-13}$ )

**TEP statique – 1 h post-injection.** Le composé  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-13}$  ( $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-HBL1}$ ) fut le premier de nos radioligands hétérobivalents à avoir été testé *in vivo*. Deux séries d’images TEP ont été enregistrées 1 h p.i (entre 50 et 70 minutes après injection) sur deux groupes de 3 souris ( $631,16 \pm 78,89$  pmol,  $4,03 \pm 0,74$  MBq, n = 3).

Les images ainsi obtenues ont montré des résultats cohérents avec ceux obtenus *in vitro* (Figure 87, haut-gauche). En effet,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-13}$  est capable de s’accumuler dans chacune des tumeurs. On note aussi la présence de radioactivité dans les reins, conséquence de la présence de récepteurs à la PSMA dans cet organe et à l’excrétion rénale du composé. La présence de radioactivité dans la zone oculaire est liée à une extravasation lors de l’administration rétro-orbitale du composé.

Cependant, le bruit de fond étant trop important, il est difficile d’identifier les limites des masses tumorales de manière précise. Le traitement des images nous a néanmoins permis d’estimer la biodistribution du traceur à ce temps d’acquisition. Les résultats sont reportés dans la Figure 86.

***in vivo* biodistribution of [<sup>68</sup>Ga]Ga-NODAGA-HBL1 1 h *p.i.***

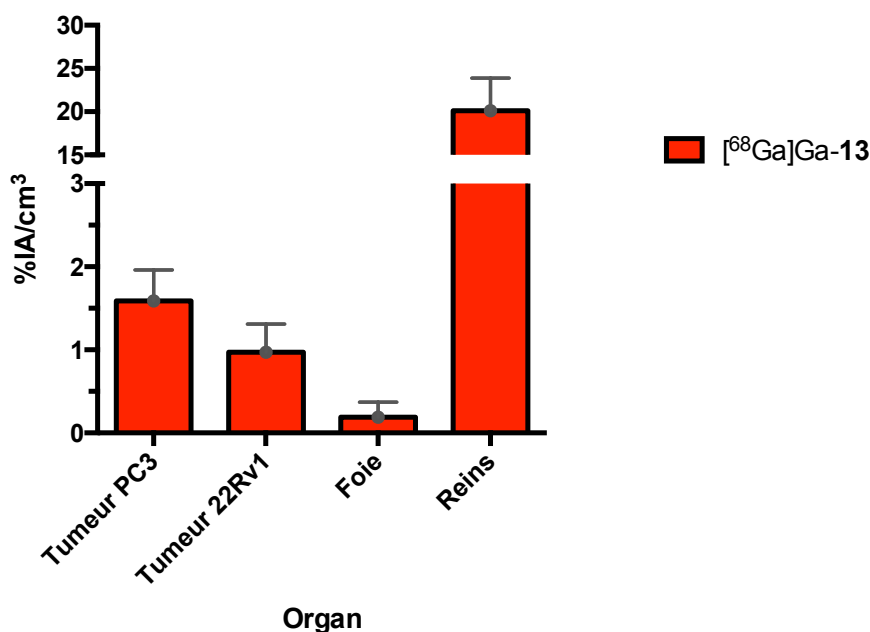


Figure 86 : Biodistribution de [<sup>68</sup>Ga]Ga-13 entre 50 et 70 minutes après l'administration du traceur dans : la tumeur PC3, la tumeur 22Rv1, les reins et le foie.

Cette première étude de biodistribution nous apprend notamment que [<sup>68</sup>Ga]Ga-13 semble être éliminé exclusivement par voie rénale. [<sup>68</sup>Ga]Ga-13 affiche donc une excrétion très similaire à celle du monovalent [<sup>68</sup>Ga]Ga-16, ciblant la PSMA. Si on compare maintenant la différence entre l'excrétion de [<sup>68</sup>Ga]Ga-17, de [<sup>68</sup>Ga]Ga-AMBA à celle de [<sup>68</sup>Ga]Ga-13, il semblerait que l'ajout d'un motif KuE soit capable de restaurer l'affinité de 13 pour le GRPR. De plus, les images de [<sup>68</sup>Ga]Ga-17 à 1 h *p.i.* montrent une fixation sur la vésicule biliaire, qui est absente des images de [<sup>68</sup>Ga]Ga-13. Il semblerait donc que le motif KuE soit également capable de moduler la pharmacocinétique du composé [<sup>68</sup>Ga]Ga-13.

**TEP statique – 1 h 30 – 1 h 50 *post*-injection.** Le second groupe de souris ( $690,33 \pm 67,47$  pmol,  $4,03 \pm 0,43$  MBq,  $n = 3$ ) a également subi un scanner TEP entre 1 h 30 et 1 h 50 après injection de [<sup>68</sup>Ga]Ga-13.

Les images TEP résultant de cette expérience (Figure 87, haut-droite) montrent un profil bien différent de celles obtenues à temps plus court. Les limites des masses tumorales sont nettes et permettent de distinguer clairement les tissus sains des tissus tumoraux. En termes de bruit de fond, les images obtenues à ces temps sont comparables à celles obtenues 1 h après l'injection des radioconjugués de référence [<sup>68</sup>Ga]Ga-AMBA et [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA11. Pour obtenir un contraste tumeur/signal circulant similaire, les images doivent être acquises à des temps *p.i.* de l'hétérobivalent supérieurs. Nous formulons deux hypothèses pour expliquer la circulation plus lente de [<sup>68</sup>Ga]Ga-13 en comparaison aux ligands monovalent de référence [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA11 et [<sup>68</sup>Ga]Ga-AMBA : un poids moléculaire plus élevé couplé à la présence de liaisons difficilement digérable par les enzymes grâce à la plateforme pyridazine.

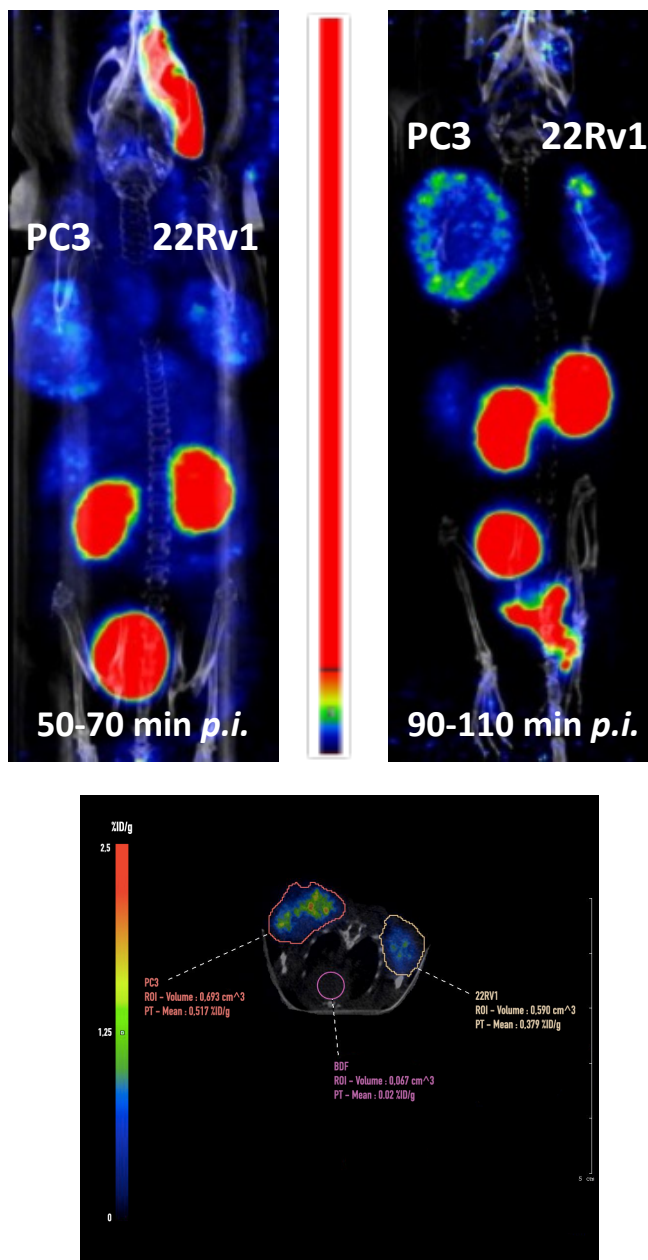


Figure 87 : Images TEP/CT (MIP) en coupes longitudinales, enregistrées entre 50 et 70 minutes p.i. (haut-gauche), 90 et 110 min p.i. de  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-13}$  (haut droite), et en coupe transversale enregistrée entre 90 et 110 minutes p.i. de  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-13}$  (bas)

Les données de biodistribution dans les tumeurs ainsi que dans les reins et le foie sont rapportées dans la Figure 88. Les valeurs obtenues montrent qu'entre 1 h 30 à 1 h 50 après injection du traceur, on observe une diminution du signal au sein des organes non ciblés et au sein des tumeurs. Cependant, les images obtenues à ce temps d'incubation permettent une délimitation claire des masses tumorales en raison de la diminution du signal circulant.

***in vivo* biodistribution of [<sup>68</sup>Ga]Ga-NODAGA-HBL1 1 h 30 - 1 h 50 *p.i.***

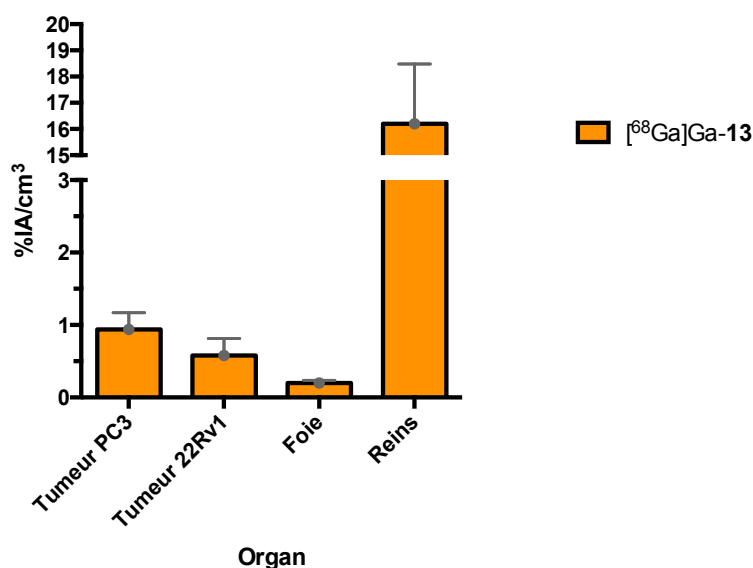


Figure 88 : biodistribution *In vivo* de [<sup>68</sup>Ga]Ga-13 entre 90 et 110 minutes après administration du traceur dans : la tumeur PC3, la tumeur 22Rv1, les reins et le foie.

**TEP dynamique – de 10 min à 1 h 30 *post*-injection.** Dans le but d’obtenir davantage de données sur la pharmacodynamique du composé [<sup>68</sup>Ga]Ga-13, nous avons également réalisé des expériences de TEP dynamique sur les deux groupes de souris ( $633,5 \pm 115,7$  pmol ;  $6,11 \pm 0,62$  MBq, n = 4).

Pour chaque souris, une série de 8 images a été enregistrée. Une première image a été prise 5 minutes après injection, la suivante 15, puis 45, 50, 75 et enfin 90 minutes (*Figure 89*). Les données obtenues à 75 et 90 minutes semblent être en accord avec les biodistributions générées à partir des TEP statiques une heure et une heure trente après injection. On observe effectivement une accumulation de signal au sein des deux tumeurs ciblées ainsi que dans les reins. On observe également un faible signal au niveau du foie. Cependant, cette expérience nous apprend que dans les 15 premières minutes après injection, une quantité de traceur plus élevée se situe dans le foie. Toutefois, cela ne traduit pas nécessairement une clairance hépatique, mais serait plutôt dû à un signal circulant élevé. D’après ces données, le temps d’acquisition *post*-injection pour lequel l’accumulation dans chacune des tumeurs est la plus élevée semble être compris entre 45 et 50 minutes. Néanmoins, ce temps ne correspond pas au temps idéal d’imagerie. En effet, comme nous l’avons vu avec les images TEP statiques, des images de meilleure qualité, plus contrastées, sont obtenues 90 minutes *post*-injection, en raison d’un signal circulant très amoindri.



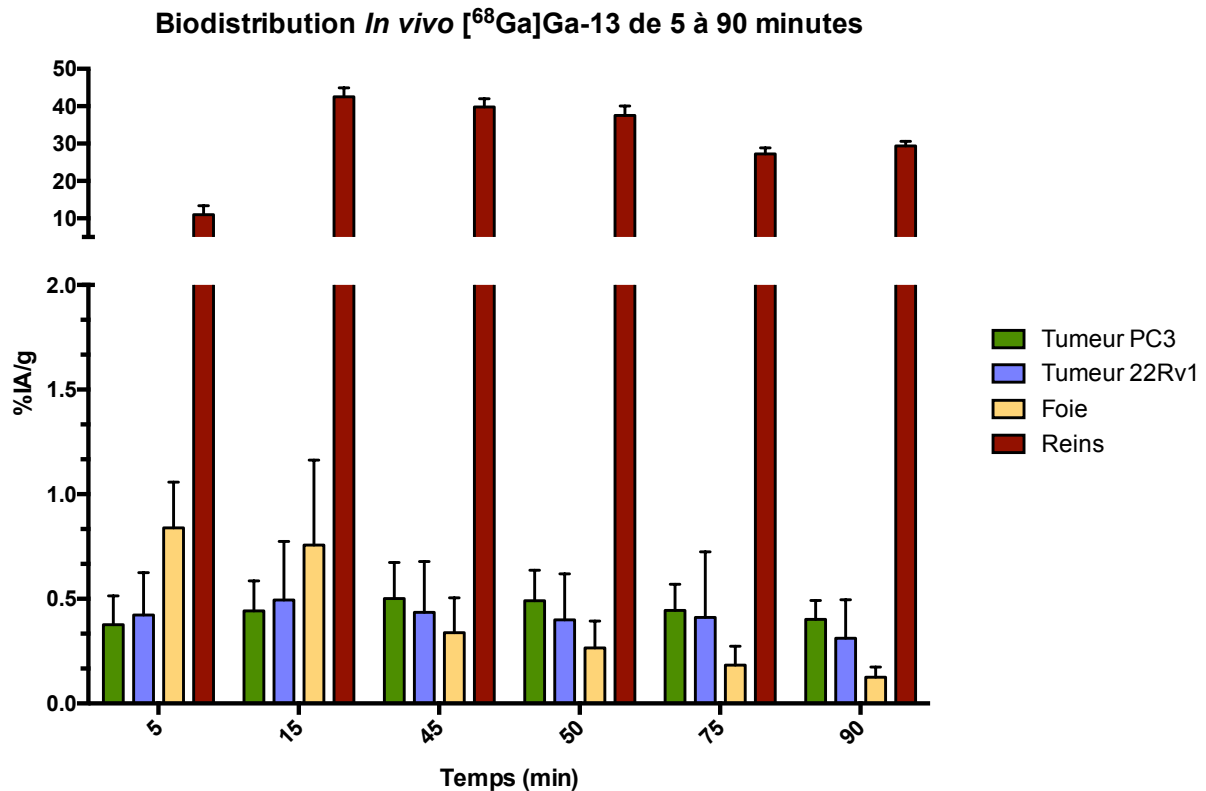


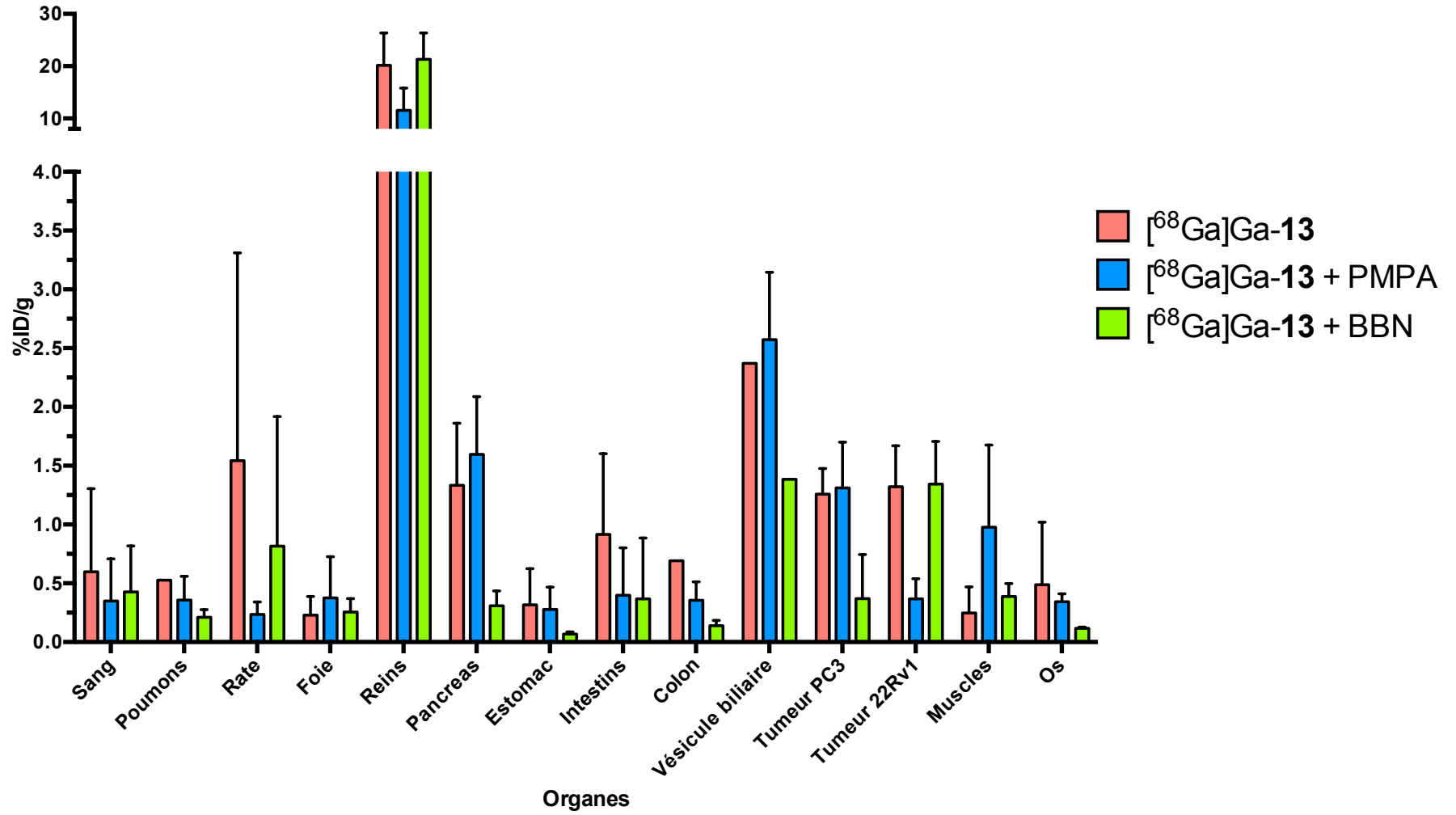
Figure 89 : Biodistribution *in vivo* déterminée par traitement d'images TEP dynamiques, 5, 15, 45, 50, 75 et 90 minutes après injection de [<sup>68</sup>Ga]Ga-13

**Biodistribution *ex vivo* et expériences de « blocking ».** Afin de confirmer la spécificité des interactions observées durant les expériences précédemment décrites, nous avons procédé à une expérience de « *blocking* ». Ce type d'expérience consiste à co-injecter avec le traceur un excès de ligand non marqué afin de saturer les récepteurs présents sur les cellules tumorales et sur les organes sains les exprimant, empêchant ainsi le ligand marqué de s'y fixer. Pour ce faire, les souris ont été divisées en 3 groupes : le premier injecté avec [<sup>68</sup>Ga]Ga-13 ( $470 \pm 33$  pmol,  $3,87 \pm 0,43$  MBq,  $n = 3$ ), le second injecté avec [<sup>68</sup>Ga]Ga-13 ( $498 \pm 30$  pmol,  $4,05 \pm 0,60$  MBq,  $n = 4$ ) et 2-PMPA (553 nmol,  $n = 4$ ) et le dernier avec [<sup>68</sup>Ga]Ga-13 ( $524 \pm 100$  pmol,  $4,15 \pm 0,03$  MBq,  $n = 3$ ) et BBN (480 nmol). Deux heures après les injections, les souris ont été sacrifiées, disséquées, leurs organes prélevés, pesés et leur radioactivité mesurée permettant d'obtenir le diagramme de biodistribution de la Figure 90.

[<sup>68</sup>Ga]Ga-13 est majoritairement accumulé au niveau des reins ( $20,16 \pm 6,17$  %ID/g), sa voie d'excrétion, de la vésicule biliaire ( $2,37$  %ID/g), du pancréas ( $1,33 \pm 0,53$  %ID/g) ainsi que de la tumeur PC3 ( $1,26 \pm 0,22$  %ID/g) et la tumeur 22Rv1 ( $1,32 \pm 0,35$  %ID/g). On note aussi une accumulation dans la rate ( $1,54 \pm 1,77$  %ID/g). Cependant, comme en témoigne l'écart-type élevé, les résultats obtenus sur les deux souris pour lesquelles la rate a été prélevée étaient divergents, c'est pourquoi nous ne nous attarderons pas sur cet organe. Ces données démontrent également que [<sup>68</sup>Ga]Ga-13 présente une accumulation dans les organes non ciblés inférieure à celle des tumeurs.

### Biodistribution ex vivo 2h p.i. de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-13}$ , $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-13} + \text{PMPA}$ et $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-13} + \text{BBN}$

Figure 90 : Biodistribution ex vivo effectuée 2 h p.i. de  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-13}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-13} + \text{PMPA}$  et  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-13} + \text{BBN}$ .



Lorsque [<sup>68</sup>Ga]Ga-**13** est injecté avec un excès de PMPA, l'accumulation dans la tumeur 22Rv1 est comparable à celle des organes non ciblés ( $0,37 \pm 0,35$  %ID/g) confirmant la spécificité de l'accumulation du traceur dans cette tumeur PSMA<sup>+</sup>. On observe également une diminution de l'accumulation au niveau des reins ( $11,53 \pm 4,28$  %ID/g) qui s'explique par l'expression de la PSMA dans cet organe. Les diminutions observées sont statistiquement significatives.

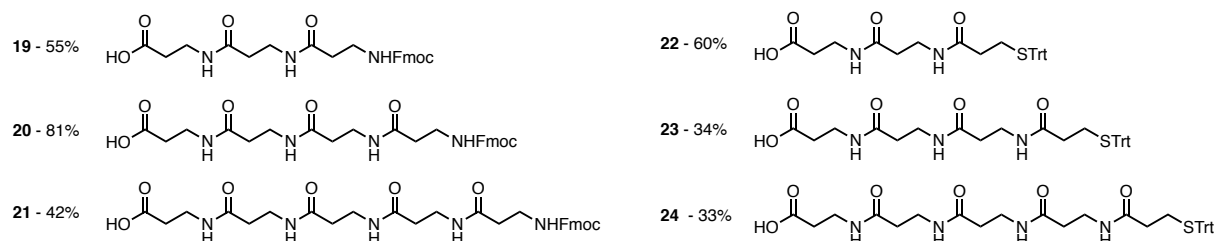
De la même manière, lorsque [<sup>68</sup>Ga]Ga-**13** est co-injecté avec un excès de BBN, on observe une chute de son accumulation au sein de la tumeur PC3 ( $0,37 \pm 0,37$  %ID/g) attestant de la spécificité de l'interaction entre notre traceur et le récepteur GRPR. Comme précédemment, on observe une chute de l'accumulation dans les organes sains exprimant GRPR, à savoir, le pancréas ( $0,31 \pm 0,13$  %ID/g) ainsi que la vésicule biliaire (1,38 %ID/g).

## IV. Synthèse de ligands hétérobivalents présentant 3, 4 et 5 itérations de $\beta$ Alanine

Dans cette dernière partie, nous nous sommes intéressés à l'optimisation du composé **13** dont la première étape est de trouver la longueur optimale entre les deux vecteurs afin de maximiser les bénéfices de l'hétérobivalence.

### 1. Synthèse des espaceurs et couplage à KuE et JMV594

Premièrement, nous avons réalisé la synthèse de six espaceurs, **19** – **24**, par synthèse sur phase solide en utilisant une résine de type chlorure de 2-chlorotrityl (2-CTC), sur laquelle a été préalablement greffé un résidu Fmoc- $\beta$ Ala-OH (1,3 mmol/g). La synthèse a été réalisée manuellement, en utilisant HATU (1 équivalent par équivalent d'acide aminé) comme agent de couplage, et la DIEA (3 équivalents) comme base. Les composés **19** à **24**, dont les structures sont décrites dans la *Figure 91*, ont été obtenus avec des rendements allant de 33 à 81 %.



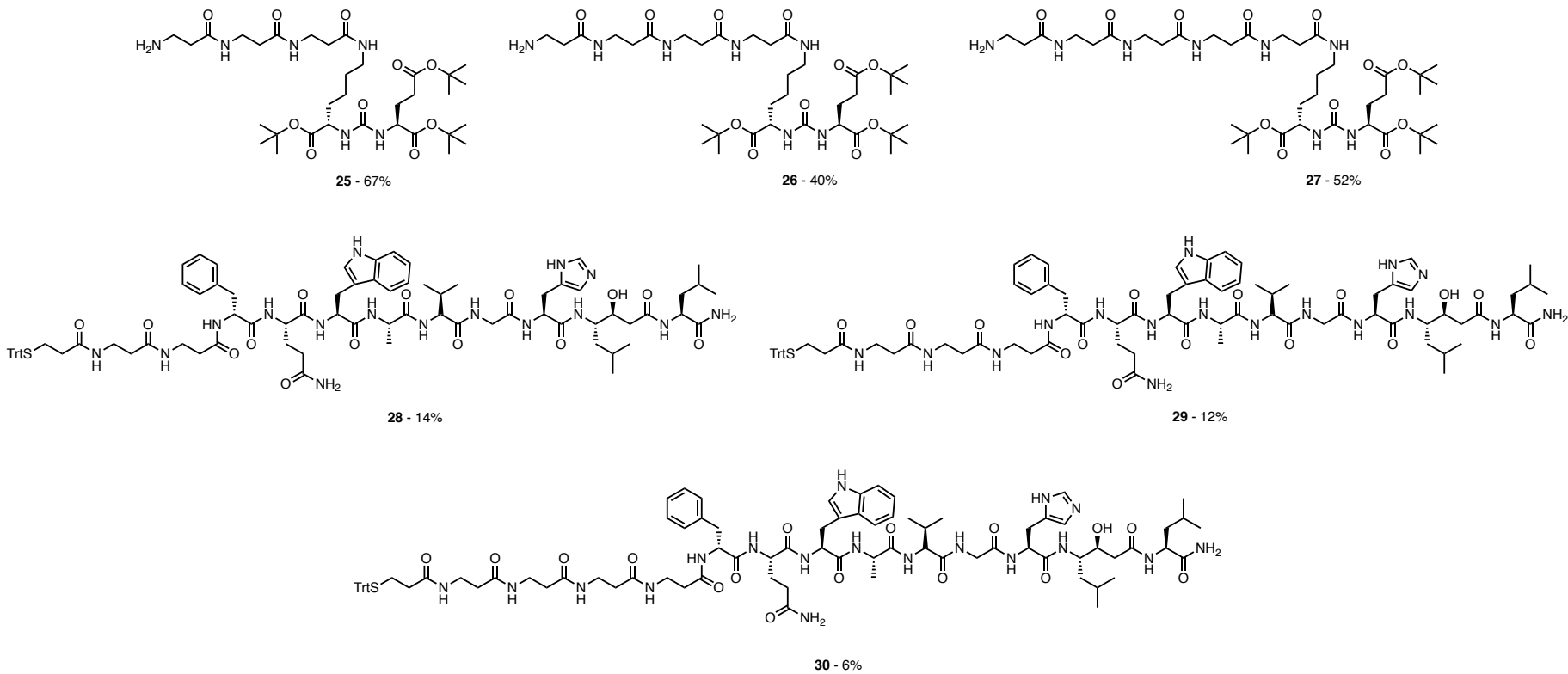
*Figure 91 : Structures et rendements de synthèse des composés 19 à 24.*

Après relargage de la résine par une solution de 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (20 % vol. dans le DCM), les peptides ont été précipités par une solution d'éther diéthylique à 4 °C. Les six composés ont ensuite été utilisés dans le couplage avec le vecteur sans étape de purification supplémentaire.

La synthèse des composés **25**, **26** et **27** a été effectuée en phase homogène par réaction de KuE(*t*Bu)<sub>3</sub> dans le DMF en utilisant HATU comme agent de couplage, la triéthylamine comme base et respectivement les composés **19**, **20** et **21**. Les vecteurs ciblant la PSMA, étendus avec les différents espaceurs, ont été obtenus avec des rendements de 42 à 61 % (*Figure 92*).

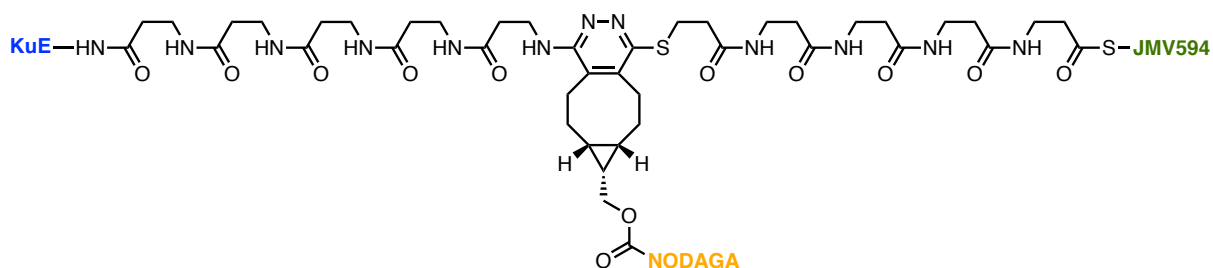
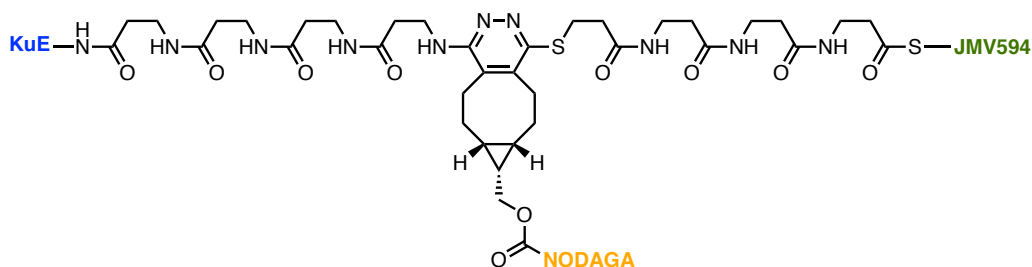
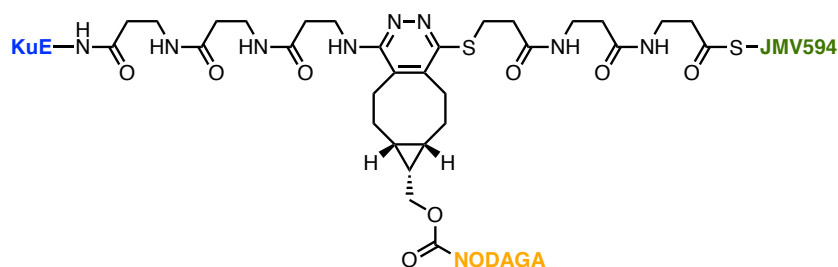
La synthèse des dérivés de JMV594 **28**, **29** et **30** a été réalisée sur résine Rink amide (0,48 mmol/g). Les composés **22**, **23** et **24** ont été directement couplés par HATU, utilisé comme agent de couplage, et la DIEA comme base. Cette stratégie nous a permis d'obtenir les analogues de JMV594 avec des rendements allant 6 à 14 % (*Figure 92*).

Les vecteurs ont été purifiés par RP-HPLC semi-préparative et caractérisés avant d'être engagés dans les réactions d'assemblage des ligands hétérobivalents.



## 2. Assemblage des ligands hétérobivalents

Les composés NODAGA-HBL2 **31** et NODAGA-HBL3 **32** ont été synthétisés grâce à l'approche « one-pot » que nous avons développée et décrite précédemment. Cette méthode s'est avérée fructueuse pour la synthèse de ces deux ligands puisqu'ils ont été obtenus avec des rendements globaux respectifs de 21 et 28 % après déprotection des esters *tert*-butyliques par l'acide trifluoroacétique. En revanche, cette méthode d'assemblage pour le composé NODAGA-HBL3 (**33**) a échoué. À ce jour, nous ne sommes pas en mesure d'expliquer la raison de cet échec. Cependant, des expériences supplémentaires sont en cours afin de déterminer la possibilité ou non de synthétiser ce composé par le biais de cette approche.



La caractérisation *in vitro* de ces composés à l'égard des récepteurs PSMA et GRPR, sera effectuée prochainement.

## Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons tout d'abord sélectionné deux protéines d'intérêt, surexprimées à la surface des cellules cancéreuses de la prostate : PSMA et GRPR. Ces deux protéines ont toutes deux été très étudiées dans l'optique de synthétiser des traceurs ou agents thérapeutiques pour cette maladie. En raison de l'hétérogénéité que présentent les cancers, il nous paraissait d'un intérêt majeur de développer des ligands hétérobivalents capables de se lier à l'un et l'autre de ces récepteurs. C'est pourquoi nous avons décidé de mettre à disposition de la communauté une méthode modulaire, efficace et directe pour synthétiser de tels ligands. Nous pensons que l'approche « one-pot » que nous avons développée, en nous basant sur les travaux précédemment effectués au laboratoire, réunit ces trois propriétés, pouvant être utilisée non seulement pour générer des ligands hétérobivalents ciblant la PSMA et GRPR, mais également toute sorte de conjugués ternaires.

Par la suite, nous avons éprouvé notre méthode en effectuant avec succès la synthèse d'une série de ligands hétérobivalents ciblant GRPR et PSMA, fonctionnalisés avec différents types de sondes, et reliés à la plateforme pyridazine *via* des espaceurs de longueurs différentes. Les essais biologiques que nous avons menés ensuite sur NODAGA-HBL1 et DOTA-HBL1 ont établi que de telles structures permettent de conserver l'affinité des vecteurs pour leurs récepteurs *in vitro* et sont capables de s'accumuler spécifiquement au sein des tumeurs dans des modèles murins *in vivo*. En conséquence, nous avons démontré que cette nouvelle approche présente un intérêt majeur pour générer ce nouveau type de ligands.

NODAGA-HBL1, le ligand hétérobivalent ciblant GRPR et PSMA, pour lequel nous avons collecté le plus de données au cours de cette étude, affiche des propriétés intéressantes *in vivo* et *in vitro*. La suite de cette étude consistera dans un premier temps à comprendre le rôle du motif KuE ciblant la PSMA quant à l'affinité de JMV594 pour son récepteur. Par la suite, sera également évalué l'apport de l'interaction bivalente sur l'affinité envers l'une et l'autre des cibles en utilisant une lignée cellulaire co-exprimant GRPR et PSMA (PC3-pip).

Nous poursuivrons ce projet en étudiant l'influence des espaceurs sur l'affinité pour les récepteurs, en particulier par des études *in vitro* des ligands NODAGA-HBL2 et NODAGA-HBL3. Nous procéderons également à des études sur la nature des espaceurs (charge, hydrophilie, rigidité...) en nous basant sur la littérature dans le but d'optimiser l'affinité de chaque ligand pour sa cible. Ainsi, nous visons à produire une deuxième génération de ligands hétérobivalents ciblant PSMA et GRPR, présentant une affinité augmentée pour ces récepteurs, dans le but d'effectuer une nouvelle série d'études *in vivo*.

Par ailleurs, une étude sur les propriétés *in vitro* et *in vivo* de DOTA-HBL1 (12) permettrait d'étudier l'influence du chélateur sur l'affinité des vecteurs pour leur cible ainsi que sur la pharmacocinétique du traceur, qui bien souvent possède une forte influence sur ces deux propriétés<sup>130,131</sup>.

## Bibliographie

- (1) Schirmer, U.; Wuerzer, B.; Meyer, N.; Neugebauer, F. A.; Fischer, H. Neue Tetrazine, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung als Herbizide. *Deutsches patentamt* **1986**, DE3508214A1.
- (2) Cobrun, M. D.; Buntain, G. A.; Harris, B. W.; Hiskey, M. A.; Lee, K.-Y.; Ott, D. G. An Improved Synthesis of 3,6-Siamino-1,2,4,5-Tetrazine from Triaminoguanidine and 2,4-Pentanedione. *J. Heterocyclic Chem.* **1991**, *28*, 2049. <https://doi.org/10.1080/07370650008219115>.
- (3) Chavez, D. E.; Hiskey, M. A. Synthesis of the Bi-Heterocyclic Parent Ring System 1,2,4-Triazolo[4,3-b][1,2,4,5]Tetrazine and Some 3,6-Disubstituted Derivatives. *J. Heterocyclic Chem.* **1998**, *35* (6), 1329–1332. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570350616>.
- (4) Helm, M. D.; Plant, A.; Harrity, J. P. A. A Novel Approach to Functionalised Pyridazinone Arrays. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (23), 4278. <https://doi.org/10.1039/b613223e>.
- (5) Glidewell, C.; Lightfoot, P.; Royles, B. J. L.; Smith, D. M. The ‘inverse Electron-Demand’ Diels–Alder Reaction in Polymer Synthesis. Part 4.1 The Preparation and Crystal Structures of Some Bis(1,2,4,5-Tetrazines). *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, No. 6, 1167–1174. <https://doi.org/10.1039/a607646g>.
- (6) Boger, D. L.; Schaum, R. P.; Garbaccio, R. M. Regioselective Inverse Electron Demand Diels–Alder Reactions of *N*-Acyl 6-Amino-3-(Methylthio)-1,2,4,5-Tetrazines. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (18), 6329–6337. <https://doi.org/10.1021/jo980795g>.
- (7) Sakya, S. M.; Groskopt, K. K. Preparation and Inverse Electron Demand Diels–Alder Reactions of 3-Methoxy-6-Methylthio-1,2,4,5-Tetrazine. *Tet. Lett.* **1997**, *38* (22), 3805–3808.
- (8) Novák, Z.; Bostai, B.; Csékei, M. Selective Nucleophilic Substitutions On Tetrazines. *Heterocycles* **2003**, *60* (12), 2653–2668.
- (9) Gong, Y.-H.; Audebert, P.; Tang, J.; Miomandre, F.; Clavier, G.; Badré, S.; Méallet-Renault, R.; Marrot, J. New Tetrazines Substituted by Heteroatoms Including the First Tetrazine Based Cyclophane: Synthesis and Electrochemical Properties. *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *592* (2), 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2006.05.014>.
- (10) Venkateswara Rao, B.; Dhokale, S.; Rajamohanan, P. R.; Hotha, S. A Tetrazine Templated Method for the Synthesis of Ternary Conjugates. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (92), 10808. <https://doi.org/10.1039/c3cc46634e>.
- (11) Meyer, J.-P.; Houghton, J. L.; Kozlowski, P.; Abdel-Atti, D.; Reiner, T.; Pillarsetty, N. V. K.; Scholz, W. W.; Zeglis, B. M.; Lewis, J. S. <sup>18</sup>F-Based Pretargeted PET Imaging Based on Bioorthogonal Diels–Alder Click Chemistry. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (2), 298–301. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00504>.
- (12) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596–2599. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4).
- (13) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5).
- (14) Li, S.; Cai, H.; He, J.; Chen, H.; Lam, S.; Cai, T.; Zhu, Z.; Bark, S. J.; Cai, C. Extent of the Oxidative Side Reactions to Peptides and Proteins During the CuAAC Reaction. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (10), 2315–2322. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00267>.
- (15) Dommerholt, J.; Schmidt, S.; Temming, R.; Hendriks, L. J. A.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest,



- J. C. M.; Lefeber, D. J.; Friedl, P.; van Delft, F. L. Readily Accessible Bicyclononynes for Bioorthogonal Labeling and Three-Dimensional Imaging of Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (49), 9422–9425. <https://doi.org/10.1002/anie.201003761>.
- (16) Kim, E.; Koo, H. Biomedical Applications of Copper-Free Click Chemistry: *In Vitro*, *in Vivo*, and *Ex Vivo*. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (34), 7835–7851. <https://doi.org/10.1039/C9SC03368H>.
- (17) 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>.
- (18) 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.* **2016**, *374* (2), 16. <https://doi.org/10.1007/s41061-016-0016-4>.
- (19) 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>.
- (20) Edem, P. E.; Sinnes, J.-P.; Pektor, S.; Bausbacher, N.; Rossin, R.; Yazdani, A.; Miederer, M.; Kjær, A.; Valliant, J. F.; Robillard, M. S.; Rösch, F.; Herth, M. M. Evaluation of the Inverse Electron Demand Diels–Alder Reaction in Rats Using a Scandium-44-Labelled Tetrazine for Pretargeted PET Imaging. *EJNMMI Res.* **2019**, *9* (1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13550-019-0520-y>.
- (21) Denk, C.; Svatunek, D.; Mairinger, S.; Stanek, J.; Filip, T.; Matscheko, D.; Kuntner, C.; Wanek, T.; Mikula, H. Design, Synthesis, and Evaluation of a Low-Molecular-Weight <sup>11</sup>C-Labeled Tetrazine for Pretargeted PET Imaging Applying Bioorthogonal *In Vivo* Click Chemistry. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (7), 1707–1712. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00234>.
- (22) Reiner, T.; Earley, S.; Turetsky, A.; Weissleder, R. Bioorthogonal Small-Molecule Ligands for PARP1 Imaging in Living Cells. *ChemBioChem* **2010**, *11* (17), 2374–2377. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000477>.
- (23) Yang, K. S.; Budin, G.; Tassa, C.; Kister, O.; Weissleder, R. Bioorthogonal Approach to Identify Unsuspected Drug Targets in Live Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (40), 10593–10597. <https://doi.org/10.1002/anie.201304096>.
- (24) Allott, L.; Chen, C.; Braga, M.; Leung, S. F. J.; Wang, N.; Barnes, C.; Brickute, D.; Carroll, L.; Aboagye, E. O. Detecting Hypoxia *In Vitro* Using <sup>18</sup>F-Pretargeted IEDDA “Click” Chemistry in Live Cells. *RSC Adv.* **2021**, *11* (33), 20335–20341. <https://doi.org/10.1039/D1RA02482E>.
- (25) Ruivo, E.; Adhikari, K.; Elvas, F.; Fissers, J.; Vangestel, C.; Staelens, S.; Stroobants, S.; Van der Veken, P.; Wyffels, L.; Augustyns, K. Improved Stability of a Novel Fluorine-18 Labeled TCO Analogue for Pretargeted PET Imaging. *Nucl. Med. Biol.* **2019**, *76–77*, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2019.11.001>.
- (26) Ferreira, V. F. C.; Oliveira, B. L.; D’Onofrio, A.; Farinha, C. M.; Gano, L.; Paulo, A.; Bernardes, G. J. L.; Mendes, F. *In Vivo* Pretargeting Based on Cysteine-Selective Antibody Modification with IEDDA Bioorthogonal Handles for Click Chemistry. *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32* (1), 121–132. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00551>.
- (27) Satpati, D.; Shinto, A.; Kamaleshwaran, K. K.; Sane, S.; Banerjee, S. Convenient Preparation of [68Ga]DKFZ-PSMA-11 Using a Robust Single-Vial Kit and Demonstration of Its Clinical Efficacy. *Mol. Imaging Biol.* **2016**, *18* (3), 420–427. <https://doi.org/10.1007/s11307-016-0943-z>.
- (28) Pandya, D. N.; Bhatt, N.; Yuan, H.; Day, C. S.; Ehrmann, B. M.; Wright, M.; Bierbach, U.;

Wadas, T. J. Zirconium Tetraazamacrocyclic Complexes Display Extraordinary Stability and Provide a New Strategy for Zirconium-89-Based Radiopharmaceutical Development. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (3), 2309–2314. <https://doi.org/10.1039/C6SC04128K>.

(29) Poty, S.; Membreno, R.; Glaser, J. M.; Ragupathi, A.; Scholz, W. W.; Zeglis, B. M.; Lewis, J. S. The Inverse Electron-Demand Diels–Alder Reaction as a New Methodology for the Synthesis of <sup>225</sup>Ac-Labelled Radioimmunoconjugates. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (21), 2599–2602. <https://doi.org/10.1039/C7CC09129J>.

(30) Keinänen, O.; Li, X.-G.; Chenna, N. K.; Lumen, D.; Ott, J.; Molthoff, C. F. M.; Sarparanta, M.; Helariutta, K.; Vuorinen, T.; Windhorst, A. D.; Airaksinen, A. J. A New Highly Reactive and Low Lipophilicity Fluorine-18 Labeled Tetrazine Derivative for Pretargeted PET Imaging. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7* (1), 62–66. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00330>.

(31) Battisti, U. M.; Bratteby, K.; Jørgensen, J. T.; Hvass, L.; Shalgunov, V.; Mikula, H.; Kjær, A.; Herth, M. M. Development of the First Aliphatic <sup>18</sup>F-Labeled Tetrazine Suitable for Pretargeted PET Imaging—Expanding the Bioorthogonal Tool Box. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (20), 15297–15312. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01326>.

(32) Sato, D.; Wu, Z.; Fujita, H.; Lindsey, J. Design, Synthesis, and Utility of Defined Molecular Scaffolds. *Organics* **2021**, *2* (3), 161–273. <https://doi.org/10.3390/org2030013>.

(33) 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>.

(34) Larsen, M. T.; Kuhlmann, M.; Hvam, M. L.; Howard, K. A. Albumin-Based Drug Delivery: Harnessing Nature to Cure Disease. *Mol. Cell. Ther.* **2016**, *4* (1), 3. <https://doi.org/10.1186/s40591-016-0048-8>.

(35) 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>.

(36) 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*, BIC.S38542. <https://doi.org/10.4137/BIC.S38542>.

(37) Renard, E.; Collado Camps, E.; Canovas, C.; Kip, A.; Gotthardt, M.; Rijpkema, M.; Denat, F.; Goncalves, V.; van Lith, S. A. M. Site-Specific Dual-Labeling of a VHH with a Chelator and a Photosensitizer for Nuclear Imaging and Targeted Photodynamic Therapy of EGFR-Positive Tumors. *Cancers* **2021**, *13* (3), 428. <https://doi.org/10.3390/cancers13030428>.

(38) Muyldermans, S.; Baral, T. N.; Retamozzo, V. C.; De Baetselier, P.; De Genst, E.; Kinne, J.; Leonhardt, H.; Magez, S.; Nguyen, V. K.; Revets, H.; Rothbauer, U.; Stijlemans, B.; Tillib, S.; Wernery, U.; Wyns, L.; Hassanzadeh-Ghassabeh, Gh.; Saerens, D. Camelid Immunoglobulins and Nanobody Technology. *Vet. Immunol. Immunop.* **2009**, *128* (1–3), 178–183. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.299>.

(39) Rawla, P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World. J. Oncol.* **2019**, *10* (2), 63–89. <https://doi.org/10.14740/wjon1191>.

(40) Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2018**, *68* (6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.

(41) Han, M.; Piantadosi, S.; Zahurak, M. L.; Sokoll, L. J.; Chan, D. W.; Epstein, J. I.; Walsh, P.

- C.; Partin, A. W. Serum Acid Phosphatase Level and Biochemical Recurrence Following Radical Prostatectomy for Men with Clinically Localized Prostate Cancer. *Urology* **2001**, *57* (4), 707–711. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(00\)01073-6](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(00)01073-6).
- (42) Cabarkapa, S.; Perera, M.; McGrath, S.; Lawrentschuk, N. Prostate Cancer Screening with Prostate-Specific Antigen: A Guide to the Guidelines. *Prostate Int.* **2016**, *4* (4), 125–129. <https://doi.org/10.1016/j.pnrl.2016.09.002>.
- (43) Carter, H. B.; Albertsen, P. C.; Barry, M. J.; Etzioni, R.; Freedland, S. J.; Greene, K. L.; Holmberg, L.; Kantoff, P.; Konety, B. R.; Murad, M. H.; Penson, D. F.; Zietman, A. L. Early Detection of Prostate Cancer: AUA Guideline. *J. Urol.* **2013**, *190* (2), 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.04.119>.
- (44) Kozikowski, A. P.; Nan, F.; Conti, P.; Zhang, J.; Ramadan, E.; Bzdega, T.; Wroblewska, B.; Neale, J. H.; Pshenichkin, S.; Wroblewski, J. T. Design of Remarkably Simple, Yet Potent Urea-Based Inhibitors of Glutamate Carboxypeptidase II (NAALADase). *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (3), 298–301. <https://doi.org/10.1021/jm000406m>.
- (45) Wright, G. L.; Haley, C.; Beckett, M. L.; Schellhammer, P. F. Expression of Prostate-Specific Membrane Antigen in Normal, Benign, and Malignant Prostate Tissues. *Urol. Oncol-Semin ORI.* **1995**, *1* (1), 18–28. [https://doi.org/10.1016/1078-1439\(95\)00002-Y](https://doi.org/10.1016/1078-1439(95)00002-Y).
- (46) Bostwick et al. - 1998 - Prostate Specific Membrane Antigen Expression in p.Pdf.
- (47) Beer, M.; Montani, M.; Gerhardt, J.; Wild, P. J.; Hany, T. F.; Hermanns, T.; Müntener, M.; Kristiansen, G. Profiling Gastrin-Releasing Peptide Receptor in Prostate Tissues: Clinical Implications and Molecular Correlates: GRPR in Prostate Cancer. *Prostate* **2012**, *72* (3), 318–325. <https://doi.org/10.1002/pros.21434>.
- (48) Jensen, R. T.; Battey, J. F.; Spindel, E. R.; Benya, R. V. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian Bombesin Receptors: Nomenclature, Distribution, Pharmacology, Signaling, and Functions in Normal and Disease States. *Pharmacol. Rev.* **2008**, *60* (1), 1–42. <https://doi.org/10.1124/pr.107.07108>.
- (49) Markwalder, R.; Reubi, J. C. Gastrin-Releasing Peptide Receptors in the Human Prostate: Relation to Neoplastic Transformation. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 1152–1159.
- (50) Reubi, J. C.; Wenger, S.; Schmuckli-Maurer, J.; Schaer, J.-C.; Gugger, M. Bombesin Receptor Subtypes in Human Cancers: Detection with the Universal Radioligand 125I-[D-TYR6, <sup>3</sup>H-ALA11, PHE13, NLE14] Bombesin(6–14). *Clin. Cancer Res.* **8** (4), 1139–1146.
- (51) Nagda, S. N.; Mohideen, N.; Lo, S. S.; Khan, U.; Dillehay, G.; Wagner, R.; Campbell, S.; Flanigan, R. Long-Term Follow-up of 111In-Capromab Pendetide (ProstaScint) Scan as Pretreatment Assessment in Patients Who Undergo Salvage Radiotherapy for Rising Prostate-Specific Antigen after Radical Prostatectomy for Prostate Cancer. *Int. J. Radiat. Oncol.* **2007**, *67* (3), 834–840. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2006.09.026>.
- (52) Vahidfar, N.; Fallahpoor, M.; Farzanehfar, S.; Divband, G.; Ahmadzadehfar, H. Historical Review of Pharmacological Development and Dosimetry of PSMA-Based Theranostics for Prostate Cancer. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2019**, *322* (2), 237–248. <https://doi.org/10.1007/s10967-019-06800-6>.
- (53) Wolf, P.; Freudenberg, N.; Bühler, P.; Alt, K.; Schultze-Seemann, W.; Wetterauer, U.; Elsässer-Beile, U. Three Conformational Antibodies Specific for Different PSMA Epitopes Are Promising Diagnostic and Therapeutic Tools for Prostate Cancer: Anti-PSMA Antibodies. *Prostate* **2010**, *70* (5), 562–569. <https://doi.org/10.1002/pros.21090>.
- (54) Bander, N. H.; Trabulsi, E. J.; Kostakoglu, L.; Yao, D.; Vallabhajosula, S.; Smith-Jones, P.; Joyce, M. A.; Milowsky, M.; Nanus, D. M.; Goldsmith, S. J. Targeting Metastatic Prostate Cancer With Radiolabeled Monoclonal Antibody J591 to the Extracellular Domain of Prostate Specific

- Membrane Antigen. *J. Urol.* **2003**, *170* (5), 1717–1721. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000091655.77601.0c>.
- (55) Psimadas, D.; Valotassiou, V.; Alexiou, S.; Tsougos, I.; Georgoulas, P. Radiolabeled MAbs as Molecular Imaging and/or Therapy Agents Targeting PSMA. *Cancer Invest.* **2018**, *36* (2), 118–128. <https://doi.org/10.1080/07357907.2018.1430816>.
- (56) Majer, P.; Jančařík, A.; Krečmerová, M.; Tichý, T.; Tenora, L.; Wozniak, K.; Wu, Y.; Pommier, E.; Ferraris, D.; Rais, R.; Slusher, B. S. Discovery of Orally Available Prodrugs of the Glutamate Carboxypeptidase II (GCPII) Inhibitor 2-Phosphonomethylpentanedioic Acid (2-PMPA). *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (6), 2810–2819. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00062>.
- (57) Nedrow-Byers, J. R.; Jabbes, M.; Jewett, C.; Ganguly, T.; He, H.; Liu, T.; Benny, P.; Bryan, J. N.; Berkman, C. E. A Phosphoramidate-Based Prostate-Specific Membrane Antigen-Targeted SPECT Agent: A Phosphoramidate PSMA-Targeted SPECT Agent. *Prostate* **2012**, *72* (8), 904–912. <https://doi.org/10.1002/pros.21493>.
- (58) Machulkin, A. E.; Ivanenkov, Y. A.; Aladinskaya, A. V.; Veselov, M. S.; Aladinskiy, V. A.; Beloglazkina, E. K.; Koteliansky, V. E.; Shakhbazyan, A. G.; Sandulenko, Y. B.; Majouga, A. G. Small-Molecule PSMA Ligands. Current State, SAR and Perspectives. *J. Drug. Target.* **2016**, *24* (8), 679–693. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2016.1154564>.
- (59) Pomper, M. G.; Musachio, J. L.; Zhang, J.; Scheffel, U.; Zhou, Y.; Hilton, J.; Maini, A.; Dannals, R. F.; Wong, D. F.; Kozikowski, A. P. <sup>11</sup>C-MCG: Synthesis, Uptake Selectivity, and Primate PET of a Probe for Glutamate Carboxypeptidase II (NAALADase). *Mol. Imaging* **2002**, *1* (2), 96–101.
- (60) Gourni, E.; Henriksen, G. Metal-Based PSMA Radioligands. *Molecules* **2017**, *22* (4), 523. <https://doi.org/10.3390/molecules22040523>.
- (61) Eder, M.; Schäfer, M.; Bauder-Wüst, U.; Hull, W.-E.; Wängler, C.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Eisenhut, M. <sup>68</sup>Ga-Complex Lipophilicity and the Targeting Property of a Urea-Based PSMA Inhibitor for PET Imaging. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23* (4), 688–697. <https://doi.org/10.1021/bc200279b>.
- (62) Hillier, S. M.; Maresca, K. P.; Femia, F. J.; Marquis, J. C.; Foss, C. A.; Nguyen, N.; Zimmerman, C. N.; Barrett, J. A.; Eckelman, W. C.; Pomper, M. G.; Joyal, J. L.; Babich, J. W. Preclinical Evaluation of Novel Glutamate-Urea-Lysine Analogues That Target Prostate-Specific Membrane Antigen as Molecular Imaging Pharmaceuticals for Prostate Cancer. *Cancer Res.* **2009**, *69* (17), 6932–6940. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1682>.
- (63) Kularatne, S. A.; Zhou, Z.; Yang, J.; Post, C. B.; Low, P. S. Design, Synthesis, and Preclinical Evaluation of Prostate-Specific Membrane Antigen Targeted <sup>99m</sup>Tc-Radioimaging Agents. *Mol. Pharmaceutics* **2009**, *6* (3), 790–800. <https://doi.org/10.1021/mp9000712>.
- (64) Afshar-Oromieh, A.; Zechmann, C. M.; Malcher, A.; Eder, M.; Eisenhut, M.; Linhart, H. G.; Holland-Letz, T.; Hadaschik, B. A.; Giesel, F. L.; Debus, J.; Haberkorn, U. Comparison of PET Imaging with a <sup>68</sup>Ga-Labelled PSMA Ligand and <sup>18</sup>F-Choline-Based PET/CT for the Diagnosis of Recurrent Prostate Cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2014**, *41* (1), 11–20. <https://doi.org/10.1007/s00259-013-2525-5>.
- (65) Afshar-Oromieh, A.; da Cunha, M. L.; Wagner, J.; Haberkorn, U.; Debus, N.; Weber, W.; Eiber, M.; Holland-Letz, T.; Rauscher, I. Performance of [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA-11 PET/CT in Patients with Recurrent Prostate Cancer after Prostatectomy—a Multi-Centre Evaluation of 2533 Patients. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2021**, *48* (9), 2925–2934. <https://doi.org/10.1007/s00259-021-05189-3>.
- (66) Seifert, R.; Schafigh, D.; Bögemann, M.; Weckesser, M.; Rahbar, K. Detection of Local

Relapse of Prostate Cancer With 18F-PSMA-1007. *Clin. Nucl. Med.* **2019**, *44* (6), e394–e395. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000002543>.

(67) Schäfer, M.; Bauder-Wüst, U.; Leotta, K.; Zoller, F.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Eisenhut, M.; Eder, M. A Dimerized Urea-Based Inhibitor of the Prostate-Specific Membrane Antigen for 68Ga-PET Imaging of Prostate Cancer. *EJNMMI Res.* **2012**, *2* (1), 23. <https://doi.org/10.1186/2191-219X-2-23>.

(68) Benešová, M.; Schäfer, M.; Bauder-Wüst, U.; Afshar-Oromieh, A.; Kratochwil, C.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Kopka, K.; Eder, M. Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56* (6), 914–920. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.147413>.

(69) Afshar-Oromieh, A.; Hetzheim, H.; Kratochwil, C.; Benesova, M.; Eder, M.; Neels, O. C.; Eisenhut, M.; Kübler, W.; Holland-Letz, T.; Giesel, F. L.; Mier, W.; Kopka, K.; Haberkorn, U. The Theranostic PSMA Ligand PSMA-617 in the Diagnosis of Prostate Cancer by PET/CT: Biodistribution in Humans, Radiation Dosimetry, and First Evaluation of Tumor Lesions. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56* (11), 1697–1705. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.161299>.

(70) Rahbar, K.; Bode, A.; Weckesser, M.; Avramovic, N.; Claesener, M.; Stegger, L.; Bögemann, M. Radioligand Therapy With 177Lu-PSMA-617 as A Novel Therapeutic Option in Patients With Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer. *Clin. Nucl. Med.* **2016**, *41* (7), 522–528. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000001240>.

(71) Seitzer, K. E.; Seifert, R.; Kessel, K.; Roll, W.; Schlack, K.; Boegemann, M.; Rahbar, K. Lutetium-177 Labelled PSMA Targeted Therapy in Advanced Prostate Cancer: Current Status and Future Perspectives. *Cancers* **2021**, *13* (15), 3715. <https://doi.org/10.3390/cancers13153715>.

(72) Kratochwil, C.; Bruchertseifer, F.; Rathke, H.; Bronzel, M.; Apostolidis, C.; Weichert, W.; Haberkorn, U.; Giesel, F. L.; Morgenstern, A. Targeted  $\alpha$ -Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer with  $^{225}\text{Ac}$ -PSMA-617: Dosimetry Estimate and Empiric Dose Finding. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (10), 1624–1631. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.191395>.

(73) Morgenstern, A.; Apostolidis, C.; Kratochwil, C.; Sathekge, M.; Krolicki, L.; Bruchertseifer, F. An Overview of Targeted Alpha Therapy with  $^{225}\text{Ac}$  Actinium and  $^{213}\text{Bi}$  Bismuth. *Curr. Radopharm.* **2018**, *11* (3), 200–208. <https://doi.org/10.2174/1874471011666180502104524>.

(74) 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>.

(75) Hidayati, N. R.; Mailana, W.; Dewi, A. R.; Rosilawaty, E.; Shintawati, R.; Kartamihardja, A. H. S. First Individualized Patient Dosimetry in Radionuclide Therapy with 177Lu-PSMA-CC34 in Indonesia. *AIP Conf. Proc.* **2021**, *2381*, 020019. <https://doi.org/10.1063/5.0066286>.

(76) Cardinale, J.; Schäfer, M.; Benešová, M.; Bauder-Wüst, U.; Leotta, K.; Eder, M.; Neels, O. C.; Haberkorn, U.; Giesel, F. L.; Kopka, K. Preclinical Evaluation of  $^{18}\text{F}$ -PSMA-1007, a New Prostate-Specific Membrane Antigen Ligand for Prostate Cancer Imaging. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (3), 425–431. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.181768>.

(77) Cardinale, J.; Martin, R.; Remde, Y.; Schäfer, M.; Hienzsch, A.; Hübner, S.; Zerges, A.-M.; Marx, H.; Hesse, R.; Weber, K.; Smits, R.; Hoepfing, A.; Müller, M.; Neels, O.; Kopka, K. Procedures for the GMP-Compliant Production and Quality Control of [18F]PSMA-1007: A Next Generation Radiofluorinated Tracer for the Detection of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals* **2017**, *10* (4), 77. <https://doi.org/10.3390/ph10040077>.



- (78) Giesel, F. L.; Hadaschik, B.; Cardinale, J.; Radtke, J.; Vinsensia, M.; Lehnert, W.; Kesch, C.; Tolstov, Y.; Singer, S.; Grabe, N.; Duensing, S.; Schäfer, M.; Neels, O. C.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Kopka, K.; Kratochwil, C. F-18 Labelled PSMA-1007: Biodistribution, Radiation Dosimetry and Histopathological Validation of Tumor Lesions in Prostate Cancer Patients. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2017**, *44* (4), 678–688. <https://doi.org/10.1007/s00259-016-3573-4>.
- (79) Erspamer, V.; Erspamer, G. F.; Inselvini, M. Some Pharmacological Actions of Alytesin and Bombesin. *J. Pharm. Pharmacol.* **1970**, *22* (11), 875–876. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1970.tb08465.x>.
- (80) McDonald, T. J.; Nilsson, G.; Vagne, M.; Ghatei, M.; Bloom, S. R.; Mutt, V. A Gastrin Releasing Peptide from the Porcine Nonantral Gastric Tissue. *Gut* **1978**, *19* (9), 767–774. <https://doi.org/10.1136/gut.19.9.767>.
- (81) Mansi, R.; Minamimoto, R.; Mäcke, H.; Iagaru, A. H. Bombesin-Targeted PET of Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57* (Supplement 3), 67S-72S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.170977>.
- (82) Broccardo, M.; Erspamer, G. F.; Melchiorri, P.; Negri, L.; Castiglione, R. Relative Potency Of Bombesin-Like Peptides. *Br. J. Pharmacol.* **1975**, *55* (2), 221–227. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1975.tb07631.x>.
- (83) Schuhmacher, J.; Zhang, H.; Doll, J.; Macke, H. R.; Matys, R.; Hauser, H.; Henze, M.; Haberkorn, U.; Eisenhut, M. GRP Receptor-Targeted PET of a Rat Pancreas Carcinoma Xenograft in Nude Mice with a 68Ga-Labeled Bombesin(6–14) Analog. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46*, 691–699.
- (84) Dimitrakopoulou-Strauss, A.; Hohenberger, P.; Haberkorn, U.; Macke, H. R.; Eisenhut, M.; Strauss, L. G. 68Ga-Labeled Bombesin Studies in Patients with Gastrointestinal Stromal Tumors: Comparison with 18F-FDG. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48* (8), 1245–1250. <https://doi.org/10.2967/jnumed.106.038091>.
- (85) Lantry, L. E.; Cappelletti, E.; Maddalena, M. E.; Fox, J. S.; Feng, W.; Chen, J.; Thomas, R.; Eaton, S. M.; Bogdan, N. J.; Arunachalam, T.; Reubi, J. C.; Raju, N.; Metcalfe, E. C.; Lattuada, L.; Linder, K. E.; Swenson, R. E.; Tweedle, M. F.; Nunn, A. D. 177Lu-AMBA: Synthesis and Characterization of a Selective 177Lu-Labeled GRP-R Agonist for Systemic Radiotherapy of Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.* **2006**, *47*, 1144–1152.
- (86) Prignon, A.; Nataf, V.; Provost, C.; Cagnolini, A.; Montravers, F.; Gruaz-Guyon, A.; Lantry, Le.; Talbot, Jn.; Nunn, Ad. 68Ga-AMBA and 18F-FDG for Preclinical PET Imaging of Breast Cancer: Effect of Tamoxifen Treatment on Tracer Uptake by Tumor. *Nucl. Med. Biol.* **2015**, *42* (2), 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2014.10.003>.
- (87) 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>.
- (88) Mansi, R.; Plas, P.; Vauquelin, G.; Fani, M. Distinct In Vitro Binding Profile of the Somatostatin Receptor Subtype 2 Antagonist [177Lu]Lu-OPS201 Compared to the Agonist [177Lu]Lu-DOTA-TATE. *Pharmaceuticals* **2021**, *14* (12), 1265. <https://doi.org/10.3390/ph14121265>.
- (89) Mansi, R.; Wang, X.; Forrer, F.; Kneifel, S.; Tamma, M.-L.; Waser, B.; Cescato, R.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R. Evaluation of a 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-Tetraacetic Acid–Conjugated Bombesin-Based Radioantagonist for the Labeling with Single-Photon Emission Computed Tomography, Positron Emission Tomography, and Therapeutic Radionuclides. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15* (16), 5240–5249. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-3145>.
- (90) Abiraj, K.; Mansi, R.; Tamma, M.-L.; Fani, M.; Forrer, F.; Nicolas, G.; Cescato, R.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R. Bombesin Antagonist–Based Radioligands for Translational Nuclear Imaging

of Gastrin-Releasing Peptide Receptor–Positive Tumors. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52* (12), 1970–1978. <https://doi.org/10.2967/jnumed.111.094375>.

(91) Llinares, M.; Devin, C.; Chaloin, O.; Azay, J.; Noel-Artis, A. M.; Bernad, N.; Fehrentz, J. A.; Martinez, J. Syntheses and Biological Activities of Potent Bombesin Receptor Antagonists: Bombesin Receptor Antagonists. *J. Pept. Res.* **1999**, *53* (3), 275–283. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.1999.00028.x>.

(92) Mansi, R.; Wang, X.; Forrer, F.; Waser, B.; Cescato, R.; Graham, K.; Borkowski, S.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R. Development of a Potent DOTA-Conjugated Bombesin Antagonist for Targeting GRPr-Positive Tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, *38* (1), 97–107. <https://doi.org/10.1007/s00259-010-1596-9>.

(93) Varasteh, Z.; Velikyan, I.; Lindeberg, G.; Sörensen, J.; Larhed, M.; Sandström, M.; Selvaraju, R. K.; Malmberg, J.; Tolmachev, V.; Orlova, A. Synthesis and Characterization of a High-Affinity NOTA-Conjugated Bombesin Antagonist for GRPR-Targeted Tumor Imaging. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24* (7), 1144–1153. <https://doi.org/10.1021/bc300659k>.

(94) Roivainen, A.; Kähkönen, E.; Luoto, P.; Borkowski, S.; Hofmann, B.; Jambor, I.; Lehtiö, K.; Rantala, T.; Rottmann, A.; Sipilä, H.; Sparks, R.; Suilamo, S.; Tolvanen, T.; Valencia, R.; Minn, H. Plasma Pharmacokinetics, Whole-Body Distribution, Metabolism, and Radiation Dosimetry of <sup>68</sup>Ga Bombesin Antagonist BAY 86-7548 in Healthy Men. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54* (6), 867–872. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.114082>.

(95) Kähkönen, E.; Jambor, I.; Kemppainen, J.; Lehtiö, K.; Grönroos, T. J.; Kuisma, A.; Luoto, P.; Sipilä, H. J.; Tolvanen, T.; Alanen, K.; Silén, J.; Kallajoki, M.; Roivainen, A.; Schäfer, N.; Schibli, R.; Dragic, M.; Johayem, A.; Valencia, R.; Borkowski, S.; Minn, H. *In Vivo* Imaging of Prostate Cancer Using [<sup>68</sup>Ga]-Labeled Bombesin Analog BAY86-7548. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19* (19), 5434–5443. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3490>.

(96) Touijer, K. A.; Michaud, L.; Alvarez, H. A. V.; Gopalan, A.; Kossatz, S.; Gonen, M.; Beattie, B.; Sandler, I.; Lysachenko, S.; Eastham, J. A.; Scardino, P. T.; Hricak, H.; Weber, W. A. Prospective Study of the Radiolabeled GRPR Antagonist BAY86-7548 for Positron Emission Tomography/Computed Tomography Imaging of Newly Diagnosed Prostate Cancer. *Eur. Urol. Oncol.* **2019**, *2* (2), 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.euo.2018.08.011>.

(97) Velikyan, I.; Maecke, H.; Langstrom, B. Convenient Preparation of <sup>68</sup>Ga-Based PET-Radiopharmaceuticals at Room Temperature. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (2), 569–573. <https://doi.org/10.1021/bc700341x>.

(98) Cooper, M. S.; Ma, M. T.; Sunassee, K.; Shaw, K. P.; Williams, J. D.; Paul, R. L.; Donnelly, P. S.; Blower, P. J. Comparison of <sup>64</sup>Cu-Complexing Bifunctional Chelators for Radioimmunoconjugation: Labeling Efficiency, Specific Activity, and *in Vitro* / *in Vivo* Stability. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23* (5), 1029–1039. <https://doi.org/10.1021/bc300037w>.

(99) Varasteh, Z.; Åberg, O.; Velikyan, I.; Lindeberg, G.; Sörensen, J.; Larhed, M.; Antoni, G.; Sandström, M.; Tolmachev, V.; Orlova, A. In Vitro and In Vivo Evaluation of a <sup>18</sup>F-Labeled High Affinity NOTA Conjugated Bombesin Antagonist as a PET Ligand for GRPR-Targeted Tumor Imaging. *PLoS ONE* **2013**, *8* (12), e81932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081932>.

(100) McBride, W. J.; Sharkey, R. M.; Karacay, H.; D'Souza, C. A.; Rossi, E. A.; Laverman, P.; Chang, C.-H.; Boerman, O. C.; Goldenberg, D. M. A Novel Method of <sup>18</sup>F Radiolabeling for PET. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50* (6), 991–998. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.060418>.

(101) 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 PEG 2 -RM26. *Nucl. Med. Biol.* **2015**, *42* (5), 446–454.

<https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2014.12.009>.

(102) Baun, C.; Mitran, B.; Rinne, S. S.; Dam, J. H.; Olsen, B. B.; Tolmachev, V.; Orlova, A.; Thisgaard, H. Preclinical Evaluation of the Copper-64 Labeled GRPR-Antagonist RM26 in Comparison with the Cobalt-55 Labeled Counterpart for PET-Imaging of Prostate Cancer. *Molecules* **2020**, *25* (24), 5993. <https://doi.org/10.3390/molecules25245993>.

(103) Mitran, B.; Rinne, S. S.; Konijnenberg, M. W.; Maina, T.; Nock, B. A.; Altai, M.; Vorobyeva, A.; Larhed, M.; Tolmachev, V.; Jong, M.; Rosenström, U.; Orlova, A. Trastuzumab Cotreatment Improves Survival of Mice with PC-3 Prostate Cancer Xenografts Treated with the GRPR Antagonist <sup>177</sup>Lu-DOTAGA-PEG<sub>2</sub>-RM26. *Int. J. Cancer* **2019**, *145* (12), 3347–3358. <https://doi.org/10.1002/ijc.32401>.

(104) Gourni, E.; Mansi, R.; Jamous, M.; Waser, B.; Smerling, C.; Burian, A.; Buchegger, F.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R. N-Terminal Modifications Improve the Receptor Affinity and Pharmacokinetics of Radiolabeled Peptidic Gastrin-Releasing Peptide Receptor Antagonists: Examples of <sup>68</sup>Ga- and <sup>64</sup>Cu-Labeled Peptides for PET Imaging. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55* (10), 1719–1725. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.141242>.

(105) Gnesin, S.; Cicone, F.; Mitsakis, P.; Van der Gucht, A.; Baechler, S.; Miralbell, R.; Garibotto, V.; Zilli, T.; Prior, J. O. First In-Human Radiation Dosimetry of the Gastrin-Releasing Peptide (GRP) Receptor Antagonist <sup>68</sup>Ga-NODAGA-MJ9. *EJNMMI Res.* **2018**, *8* (1), 108. <https://doi.org/10.1186/s13550-018-0462-9>.

(106) Mansi, R.; Abiraj, K.; Wang, X.; Tamma, M. L.; Gourni, E.; Cescato, R.; Berndt, S.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R. Evaluation of Three Different Families of Bombesin Receptor Radioantagonists for Targeted Imaging and Therapy of Gastrin Releasing Peptide Receptor (GRP-R) Positive Tumors. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (2), 682–691. <https://doi.org/10.1021/jm5012066>.

(107) Azay, J.; Gagne, D.; Devin, C.; Llinares, M.; Fehrentz, J. A.; Martinez, J. JMV641: A Potent Bombesin Receptor Antagonist That Inhibits Swiss 3T3 Cell Proliferation. *Regul. Peptides* **1996**, *65* (1), 91–97. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(96\)00077-8](https://doi.org/10.1016/0167-0115(96)00077-8).

(108) Varga, G.; Reidelberger, R. D.; Liehr, R.-M.; Bussjaeger, L. J.; Coy, D. H.; Solomon, T. E. Effects of Potent Bombesin Antagonist on Exocrine Pancreatic Secretion in Rats. *Peptides* **1991**, *12* (3), 493–497. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(91\)90090-C](https://doi.org/10.1016/0196-9781(91)90090-C).

(109) Dalm, S. U.; Bakker, I. L.; de Blois, E.; Doeswijk, G. N.; Konijnenberg, M. W.; Orlandi, F.; Barbato, D.; Tedesco, M.; Maina, T.; Nock, B. A.; de Jong, M. <sup>68</sup>Ga/<sup>177</sup>Lu-NeoBOMB1, a Novel Radiolabeled GRPR Antagonist for Theranostic Use in Oncology. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (2), 293–299. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.176636>.

(110) Heimbrook, D. C.; Saari, W. S.; Balishin, N. L.; Fisher, T. W.; Friedman, A.; Kiefer, D. M.; Rotberg, N. S.; Wallen, J. W.; Oliff, A. Gastrin Releasing Peptide Antagonists with Improved Potency and Stability. *J. Med. Chem.* **1991**, *34* (7), 2102–2107. <https://doi.org/10.1021/jm00111a027>.

(111) Gruber, L.; Jiménez-Franco, L. D.; Decristoforo, C.; Uprimny, C.; Glatting, G.; Hohenberger, P.; Schoenberg, S. O.; Reindl, W.; Orlandi, F.; Mariani, M.; Jaschke, W.; Virgolini, I. MITIGATE-NeoBOMB1, a Phase I/IIa Study to Evaluate Safety, Pharmacokinetics, and Preliminary Imaging of <sup>68</sup>Ga-NeoBOMB1, a Gastrin-Releasing Peptide Receptor Antagonist, in GIST Patients. *J. Nucl. Med.* **2020**, *61* (12), 1749–1755. <https://doi.org/10.2967/jnumed.119.238808>.

(112) Eder, M.; Schäfer, M.; Bauder-Wüst, U.; Haberkorn, U.; Eisenhut, M.; Kopka, K. Preclinical Evaluation of a Bispecific Low-molecular Heterodimer Targeting Both PSMA and GRPR for Improved PET Imaging and Therapy of Prostate Cancer. *Prostate* **2014**, *74* (6), 659–



668. <https://doi.org/10.1002/pros.22784>.

(113) Liolios, C.; Schäfer, M.; Haberkorn, U.; Eder, M.; Kopka, K. Novel Bispecific PSMA/GRPr Targeting Radioligands with Optimized Pharmacokinetics for Improved PET Imaging of Prostate Cancer. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (3), 737–751. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00687>.

(114) Hofström, C.; Orlova, A.; Altai, M.; Wångsell, F.; Gräslund, T.; Tolmachev, V. Use of a HEHEHE Purification Tag Instead of a Hexahistidine Tag Improves Biodistribution of Affibody Molecules Site-Specifically Labeled with <sup>99m</sup>Tc, <sup>111</sup>In, and <sup>125</sup>I. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (11), 3817–3826. <https://doi.org/10.1021/jm200065e>.

(115) Mitran, B.; Varasteh, Z.; Abouzayed, A.; Rinne, S. S.; Puuvuori, E.; De Rosa, M.; Larhed, M.; Tolmachev, V.; Orlova, A.; Rosenström, U. Bispecific GRPR-Antagonistic Anti-PSMA/GRPR Heterodimer for PET and SPECT Diagnostic Imaging of Prostate Cancer. *Cancers* **2019**, *11* (9), 1371. <https://doi.org/10.3390/cancers11091371>.

(116) Abouzayed, A.; Yim, C.-B.; Mitran, B.; Rinne, S. S.; Tolmachev, V.; Larhed, M.; Rosenström, U.; Orlova, A. Synthesis and Preclinical Evaluation of Radio-Iodinated GRPR/PSMA Bispecific Heterodimers for the Theranostics Application in Prostate Cancer. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (7), 358. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11070358>.

(117) Lundmark, F.; Abouzayed, A.; Mitran, B.; Rinne, S. S.; Varasteh, Z.; Larhed, M.; Tolmachev, V.; Rosenström, U.; Orlova, A. Heterodimeric Radiotracer Targeting PSMA and GRPR for Imaging of Prostate Cancer—Optimization of the Affinity towards PSMA by Linker Modification in Murine Model. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (7), 614. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070614>.

(118) Gerlinger, M.; Rowan, A. J.; Horswell, S.; Larkin, J.; Endesfelder, D.; Gronroos, E.; Martinez, P.; Matthews, N.; Stewart, A.; Tarpey, P.; Varela, I.; Phillimore, B.; Begum, S.; McDonald, N. Q.; Butler, A.; Jones, D.; Raine, K.; Latimer, C.; Santos, C. R.; Nohadani, M.; Eklund, A. C.; Spencer-Dene, B.; Clark, G.; Pickering, L.; Stamp, G.; Gore, M.; Szallasi, Z.; Downward, J.; Futreal, P. A.; Swanton, C. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366* (10), 883–892. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113205>.

(119) Vauquelin, G.; Charlton, S. J. Exploring Avidity: Understanding the Potential Gains in Functional Affinity and Target Residence Time of Bivalent and Heterobivalent Ligands: Exploring Bivalent Ligand Binding Properties. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *168* (8), 1771–1785. <https://doi.org/10.1111/bph.12106>.

(120) Vauquelin, G. Simplified Models for Heterobivalent Ligand Binding: When Are They Applicable and Which Are the Factors That Affect Their Target Residence Time. *N-S Arch. Pharmacol.* **2013**, *386* (11), 949–962. <https://doi.org/10.1007/s00210-013-0881-0>.

(121) Valverde, I. E.; Bauman, A.; Kluba, C. A.; Vomstein, S.; Walter, M. A.; Mindt, T. L. 1,2,3-Triazoles as Amide Bond Mimics: Triazole Scan Yields Protease-Resistant Peptidomimetics for Tumor Targeting. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (34), 8957–8960. <https://doi.org/10.1002/anie.201303108>.

(122) Kumai, J.; Hozumi, K.; Yamada, Y.; Katagiri, F.; Kikkawa, Y.; Nomizu, M. Effect of Spacer Length and Type on the Biological Activity of Peptide-Polysaccharide Matrices: Spacer for Peptide-Polysaccharide Matrices. *Biopolymers* **2016**, *106* (4), 512–520. <https://doi.org/10.1002/bip.22785>.

(123) 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>.

- (124) 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>.
- (125) Canovas, C.; Bellaye, P.-S.; Moreau, M.; Romieu, A.; Denat, F.; Goncalves, V. Site-Specific near-Infrared Fluorescent Labelling of Proteins on Cysteine Residues with *Meso*-Chloro-Substituted Heptamethine Cyanine Dyes. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (45), 8831–8836. <https://doi.org/10.1039/C8OB02646G>.
- (126) Lindner, S.; Fiedler, L.; Wängler, B.; Bartenstein, P.; Schirmacher, R.; Wängler, C. Design, Synthesis and in Vitro Evaluation of Heterobivalent Peptidic Radioligands Targeting Both GRP- and VPAC1-Receptors Concomitantly Overexpressed on Various Malignancies – Is the Concept Feasible? *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *155*, 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.047>.
- (127) Yang, J.; Liang, Y.; Šečkutė, J.; Houk, K. N.; Devaraj, N. K. Synthesis and Reactivity Comparisons of 1-Methyl-3-Substituted Cyclopropene Mini-Tags for Tetrazine Bioorthogonal Reactions. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20* (12), 3365–3375. <https://doi.org/10.1002/chem.201304225>.
- (128) Valverde, I. E.; Huxol, E.; Mindt, T. L. Radiolabeled Antagonistic Bombesin Peptidomimetics for Tumor Targeting: Radiopeptidomimetics. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2014**, *57* (4), 275–278. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3162>.
- (129) Barinka, C.; Rojas, C.; Slusher, B.; Pomper, M. Glutamate Carboxypeptidase II in Diagnosis and Treatment of Neurologic Disorders and Prostate Cancer. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (6), 856–870. <https://doi.org/10.2174/092986712799034888>.
- (130) 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>.
- (131) Renard, E.; Moreau, M.; Bellaye, P.-S.; Guillemin, M.; Collin, B.; Prignon, A.; Denat, F.; Goncalves, V. Positron Emission Tomography Imaging of Neurotensin Receptor-Positive Tumors with <sup>68</sup>Ga-Labeled Antagonists: The Chelate Makes the Difference Again. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (12), 8564–8578. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00523>.



**Synthèse de  
radiopharmaceutiques ciblant  
les protéines CXCR4 et FAP**

## Table des matières

<b>I. Introduction .....</b>	<b>145</b>
<b>1. Le récepteur à chimiokine C-X-C de type 4 (CXCR4) .....</b>	<b>145</b>
A. CXCR4 en oncologie .....	145
B. Les ligands de CXCR4 pour l'imagerie .....	146
a. Dérivés de CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ) .....	146
b. Les anticorps monoclonaux .....	147
c. Petites molécules .....	147
d. Les peptides .....	150
<b>2. Protéine d'activation des fibroblastes (FAP) .....</b>	<b>153</b>
A. Le micro-environnement tumoral et la FAP .....	153
B. Les ligands de la FAP pour l'imagerie .....	154
a. Anticorps .....	154
b. Peptides .....	154
c. Petites molécules .....	156
<b>3. Objectifs du projet .....</b>	<b>158</b>
<b>II. Synthèse de radiotraceurs ciblant CXCR4 .....</b>	<b>159</b>
<b>1. Synthèse de [N-Me-D-Orn<sup>2</sup>]FC131 protégé .....</b>	<b>159</b>
<b>2. Voie de synthèse alternative grâce au synthon Fmoc-N(Me)-D-Orn(Dde)-OH et synthèse de Pentixafor .....</b>	<b>161</b>
A. Synthèse de l'acide aminé Fmoc-N(Me)-D-Orn(Dde)-OH .....	161
B. Synthèse du composé <b>34</b> via le synthon Fmoc-N(Me)-D-Orn(Dde)-OH .....	163
<b>3. Synthèse de ligands hétérobivalents et monovalents ciblant CXCR4 .....</b>	<b>163</b>
A. Synthèse de [N-Me-D-Orn- $\beta$ Ala- $\beta$ Ala-H <sup>2</sup> ]FC131 et de [N-Me-D-Orn- $\beta$ Ala- $\beta$ Ala-SH <sup>2</sup> ]FC131 .....	163
B. Assemblage des ligands .....	164
<b>III. Synthèse de FAPI-04 .....</b>	<b>166</b>
<b>1. Synthèse des building blocks .....</b>	<b>166</b>
A. Synthèse du (S)-(2-(2-cyano-4,4-difluoropyrrolidin-1-yl)-2-oxoéthyl)carbamate ( <b>50</b> ) .....	166
B. Synthèse de l'acide 6-(3-(4-(tert-butoxycarbonyl)pipérazin-1-yl)propoxy)quinoline-4-carboxylique ( <b>54</b> ) .....	168
C. Couplage et conjugaison au DOTA .....	169
<b>Conclusion .....</b>	<b>171</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>172</b>

## I. Introduction

Nous avons vu dans le chapitre précédent que les protéines surexprimées à la surface des cellules cancéreuses constituent des cibles de choix en oncologie. Les traceurs ciblant ce type de protéines présentent l'avantage d'être extrêmement spécifiques, or, comme nous l'avons abordé dans le chapitre précédent, la distribution de ces cibles est hétérogène au sein des tumeurs. De ce fait, il est nécessaire de développer une multitude de traceurs spécifiques de chaque type de tumeur.

Une approche alternative consiste à cibler des marqueurs plus généraux communs à différents types de pathologies. L'exemple le plus connu de ces traceurs est le [<sup>18</sup>F]F-fluorodéoxyglucose, présenté dans l'introduction générale, qui cible la surconsommation de glucose observée dans le cadre de pathologies diverses, inflammatoires ou cancéreuses. Cependant, ces dernières années, notre meilleure compréhension de la biologie des tumeurs a permis l'émergence de nouvelles cibles thérapeutiques. Parmi elles, on compte notamment CXCR4, un récepteur membranaire surexprimé dans une large variété de cancers<sup>1,2</sup> et la protéine d'activation des fibroblastes (FAP, « fibroblast activation protein ») surexprimée dans le micro-environnement tumoral<sup>3</sup>.

### 1. Le récepteur à chimiokine C-X-C de type 4 (CXCR4)

#### A. CXCR4 en oncologie

CXCR4, autrement nommé fusine ou CD184, est un récepteur couplé aux protéines G connu pour jouer un rôle dans l'entrée du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) au sein des cellules T CD4<sup>+</sup>. CXCL12 (ou SDF-1 $\alpha$ ), une chimiokine, est le ligand naturel de CXCR4. Les chimiokines sont des petites protéines impliquées dans la réponse immunitaire<sup>5</sup>. Au-delà de son rôle dans l'immunité, CXCR4 exerce également une fonction cruciale durant l'embryogénèse<sup>6</sup>.

En oncologie, la surexpression de CXCR4 s'accompagne de la migration de cellules cancéreuses vers d'autres sites de l'organisme, notamment les poumons, le foie et la moelle osseuse, qui sont les principaux sites de production de la protéine CXCL12 (ou SDF-1 $\alpha$ ). Ainsi, CXCR4 est impliqué dans la formation des métastases<sup>7</sup> (*Figure 93*). Ce récepteur est surexprimé dans plus de 23 cancers, dont le cancer du sein, du poumon et du pancréas<sup>2</sup>. De plus, CXCR4 joue un rôle prépondérant dans le développement du micro-environnement tumoral<sup>8</sup>. La surexpression de la fusine à la surface des cellules tumorales est associée à un pronostic très défavorable<sup>9</sup>.

De ce fait, CXCR4 constitue une cible d'intérêt pour l'imagerie nucléaire. Différents types de traceurs ciblant ce récepteur ont été développés pour l'imagerie des tumeurs<sup>10</sup>.

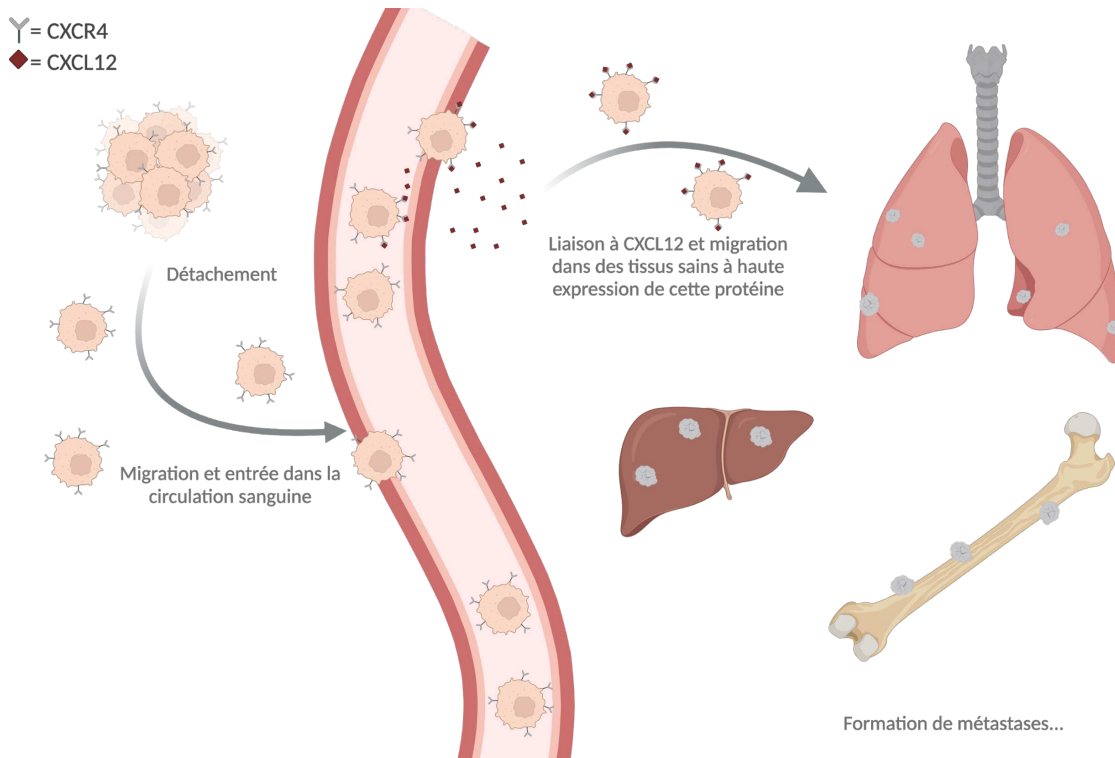


Figure 93 : Schéma représentatif de la migration des cellules tumorales vers le foie, les poumons et les os médiée par la surexpression du récepteur CXCR4, favorisant l'apparition de métastases dans ces tissus sains producteurs de CXCL12. (Adapté de la littérature<sup>7</sup>)

## B. Les ligands de CXCR4 pour l'imagerie

### a. Dérivés de CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ )

CXCL12, ou « stromal cell-derived factor 1 » (SDF-1 $\alpha$ ), est le ligand naturel de CXCR4. Son rôle physiologique principal est de promouvoir le recrutement des cellules immunitaires vers les zones d'inflammation<sup>11</sup>. Il s'agit d'une petite protéine de la famille des cytokines contenant 68 résidus d'acide aminé. Malgré sa faible stabilité *in vivo*, Misra *et al.* ont développé un dérivé de SDF-1 $\alpha$  marqué au technécium-99m, [<sup>99m</sup>Tc-MAS<sub>3</sub>]-SDF-1 $\alpha$ <sup>12</sup>. Le radiotracer a montré une capacité de se lier à CXCR4 avec une forte affinité de 2,7 nM, en affichant cependant une demi-vie dans le sang de 5 minutes *in vivo*, avec une clairance essentiellement rénale. Les études *in vivo*, sur des rats ayant subi un infarctus du myocarde, ont démontré une accumulation du traceur dans les tissus concernés. L'instabilité du traceur et sa faible accumulation, ajoutés à la synthèse non optimale du conjugué chélateur-protéine ont fait que le composé n'a pas été développé davantage.

Cette protéine, conjuguée au fluorophore proche-infrarouge IRDye 800CW, a également été utilisée pour effectuer des expériences *in vitro* et *in vivo* d'imagerie optique<sup>13</sup>. Les études *in vitro* ont notamment démontré que ce ligand, en plus de se lier au récepteur CXCR4, présente une affinité pour un autre récepteur : CXCR7. *In vivo*, chez la souris saine, le traceur bénéficie d'une distribution rapide dans l'organisme et est complètement éliminé en 24 h. Sur souris greffées avec des tumeurs MCF-7 (CXCR4<sup>+</sup>, CXCR7<sup>+</sup>) et A764 (CXCR4<sup>-</sup>, CXCR7<sup>+</sup>) les tumeurs, ainsi que le foie, le squelette et la moelle osseuse sont visibles 1 h après injection. Le signal circulant est éliminé en quasi-totalité 24 h après injection et les tumeurs MCF-7 restent visibles jusqu'à 96 h après l'administration du traceur, contrairement aux tumeurs A764 qui ne sont plus détectables après 48 h. Malgré une clairance du reste de l'organisme, du signal au niveau des

os des pattes arrière de la souris était toujours très nettement visible 48 h après injection du traceur, ce qui est attribué à l'expression de CXCR4 dans les cellules hématopoïétiques.

Si l'utilisation de SDF-1 comme agent de ciblage est donc possible, les résultats ne sont pas concluants. Les dérivés radiomarquables synthétisés par Misra *et al.*<sup>12</sup> se sont avérés inefficaces, car trop instables tandis que ceux marqués par un fluorophore semblent souffrir d'un temps de circulation trop long dans l'organisme probablement dû à la présence de CXCR4 sur les cellules hématopoïétiques.

### b. Les anticorps monoclonaux

Il existe également un exemple de ciblage spécifique de CXCR4 effectué à l'aide d'un anticorps monoclonal appelé 12G5 marqué à l'iode-125 pour l'imagerie SPECT de tumeurs cérébrales<sup>14</sup>. Comme on peut le voir sur les images SPECT de la *Figure 94*, le bioconjugué est capable de s'accumuler au sein de la tumeur U87-stb-CXCR4. Cependant, comme le confirme l'expérience contrôle obtenue après injection de [<sup>125</sup>I]I-IgG<sub>2A</sub> (anticorps murin non spécifique de CXCR4) une partie de l'accumulation observée précédemment est imputable à des interactions non spécifiques. De plus, utiliser un anticorps pour le ciblage de tumeurs cérébrales semble contradictoire avec le fait que les anticorps sont généralement incapables de passer la barrière hématoencéphalique, sauf lorsque la barrière hématoencéphalique est altérée<sup>15</sup>.

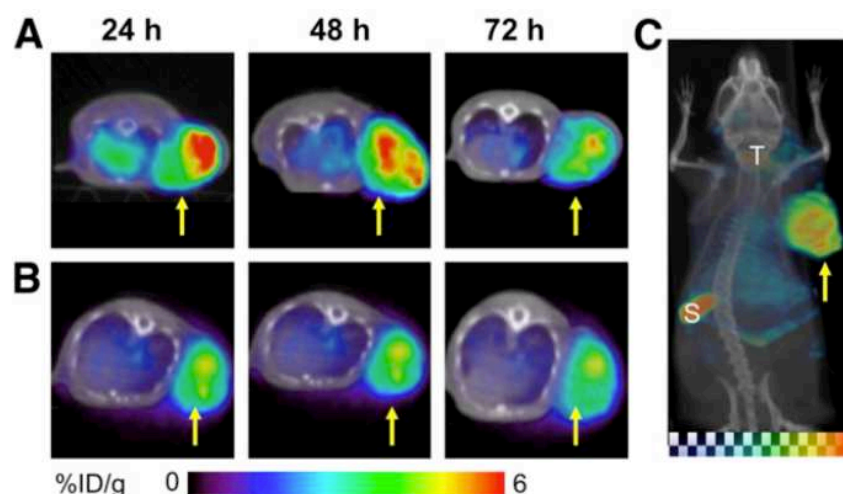


Figure 94 : Images MIP SPECT obtenues 24, 48 et 72 h p.i. de [<sup>125</sup>I]-12G5 (A) ou de [<sup>125</sup>I]-IgG<sub>2A</sub> (B). Les flèches jaunes indiquent la tumeur, T = Thyroïde et S = Rate. (Tiré de la littérature<sup>14</sup>)

### c. Petites molécules Dérivés du cyclame

Dans le contexte de la recherche contre le VIH, une petite molécule appelée **AMD3100** (anciennement nommée JM3100) a prouvé être capable de se lier à CXCR4 avec une forte affinité<sup>16,17</sup>. Il s'agit d'un biscyclame, dans lequel les deux macrocycles sont connectés *via* un espaceur aromatique (*Figure 95*). En plus d'être affiné de CXCR4, la nature polyazamacrocyclique de AMD3100 lui confère la capacité de chélater des atomes métalliques comme le fer ou le cuivre. Cette propriété est notamment d'un intérêt majeur en médecine nucléaire, où ce type de ligand peut être utilisé comme radiotracer une fois marqué avec des isotopes pour l'imagerie TEP ou TEMP.



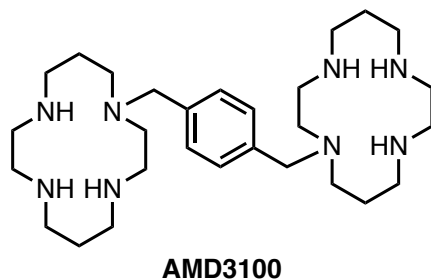


Figure 95 : Structure de AMD3100

Notamment, le complexe  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-AMD3100}$  a été évalué *in vivo* sur souris doublement xéno greffées avec des cellules tumorales surexprimant CXCR4 (U87-stb-CXCR4) et le surexprimant peu (U87)<sup>18</sup>. Les images TEP obtenues (Figure 96) 90 minutes après injection du radioconjugué permettent une nette identification de la masse tumorale CXCR4<sup>+</sup> attestant ainsi de la spécificité de l'interaction. Il est cependant important de noter qu'on observe un signal très intense au niveau du foie et des autres organes surexprimant CXCR4 (comme la rate).

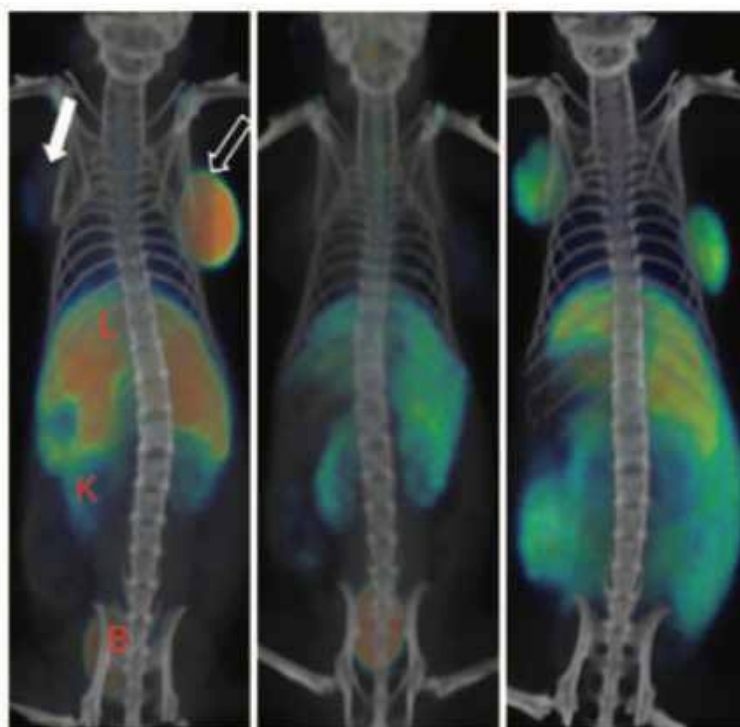


Figure 96 : Coupe longitudinale d'images TEP/CT obtenues 90 minutes après injection de  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-AMD3100}$  (gauche),  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-AMD3100}$  + AMD3100 non marqué (blocking, milieu), et  $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$  (droite) sur souris doublement xéno greffées avec des cellules U87 (faible surexpression de CXCR4) sur le flanc gauche et U87-stb-CXCR4 (forte surexpression de CXCR4) sur le flanc droit. Tiré de la littérature<sup>18</sup>

Bien qu'affichant des ratios tumeurs/muscles et tumeurs/sang favorables, l'accumulation excessive du traceur dans le foie, et dans une moindre mesure dans les reins, compliquerait toute utilisation clinique puisque d'une part, le foie est un des organes dans lesquels les tumeurs CXCR4<sup>+</sup> métastasent et d'autre part, une fixation *off-target* si importante rend difficile l'interprétation des images. De plus, une fixation hépatique importante est corrélée à un relargage du cuivre-64 du chélateur (Figure 96, gauche), ce qui témoigne d'une instabilité de la sonde.

Dans le souci de former des complexes plus stables avec les radiométaux (le cyclame n'étant pas un chélateur idéal), une autre approche consistant à fonctionnaliser l'AMD3100 avec un agent chélatant plus performant a émergé. Cette approche a notamment été étudiée au sein de notre laboratoire<sup>19</sup> mais cette modification n'a pas permis de diminuer l'accumulation dans le foie (Figure 97).

AMD3465 (Figure 97) est un autre antagoniste de CXCR4 développé par la même équipe ayant étudié l'AMD3100<sup>20</sup>. Il présente une affinité plus importante pour CXCR4 (42 nM contre 647 nM). De la même manière, ce composé macrocyclique a été marqué au cuivre-64 et a été testé *in vivo* sur souris xénotransplantées avec des cellules U87-stb-CXCR4. Malgré des propriétés supérieures *in vivo* par rapport à celles de [<sup>64</sup>Cu]Cu-AMD3100, [<sup>64</sup>Cu]Cu-AMD3465 s'accumule tout de même de manière excessive dans le foie.

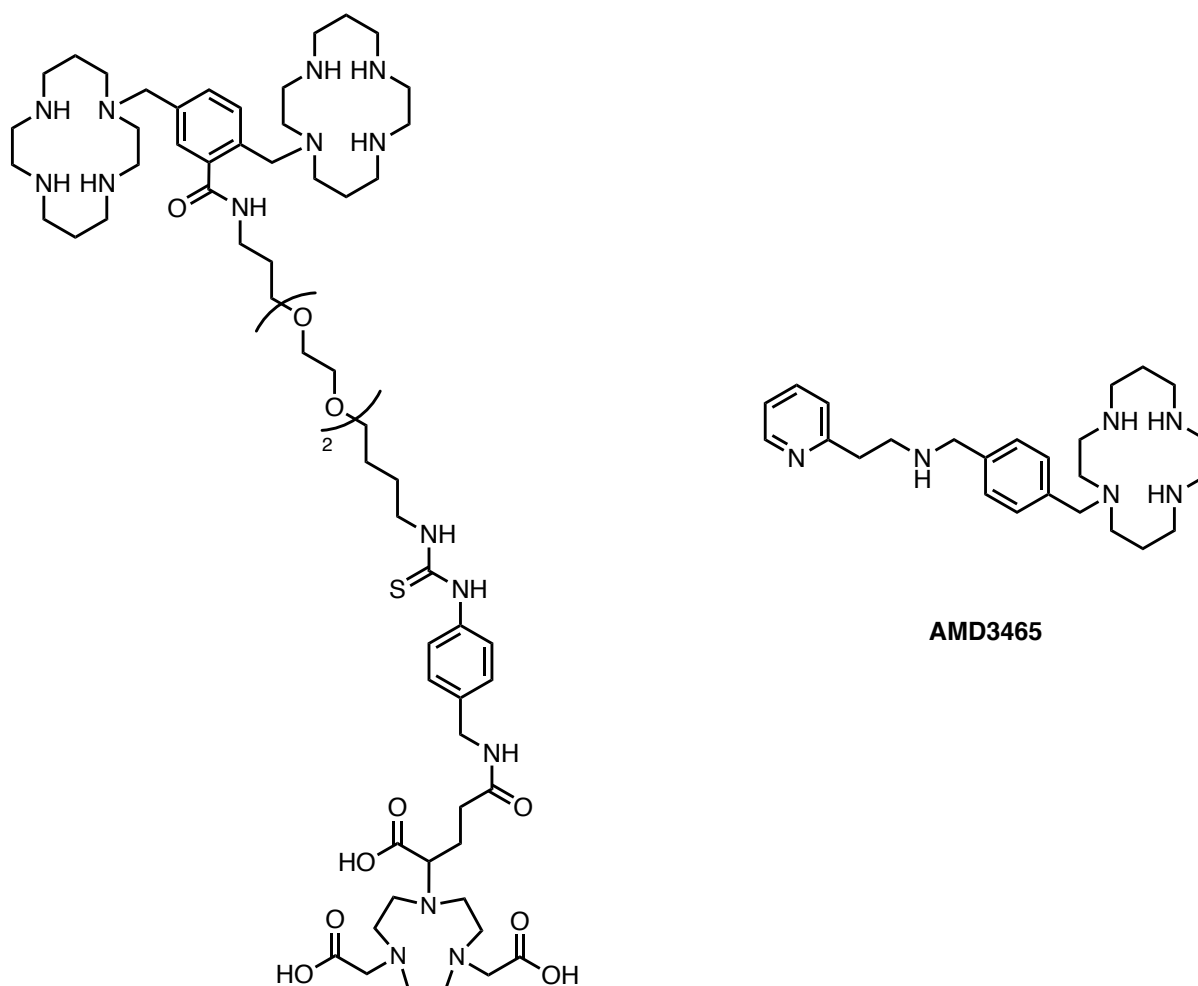


Figure 97 : Structure du dérivé de AMD3100 développé par Poty et al.<sup>19</sup> (gauche) et d'AMD3465 (droite)

### Autres molécules

Une multitude de petites molécules a été étudiée dans la recherche de nouveaux antagonistes de CXCR4<sup>21</sup>. Parmi elles, on peut notamment citer les dérivés d'indoles<sup>22</sup>, les dérivés de tétrahydroquinolines comme AMD070<sup>23</sup> ou les dérivés de guanidine<sup>24</sup> dont des exemples de structures sont donnés dans la Figure 98.

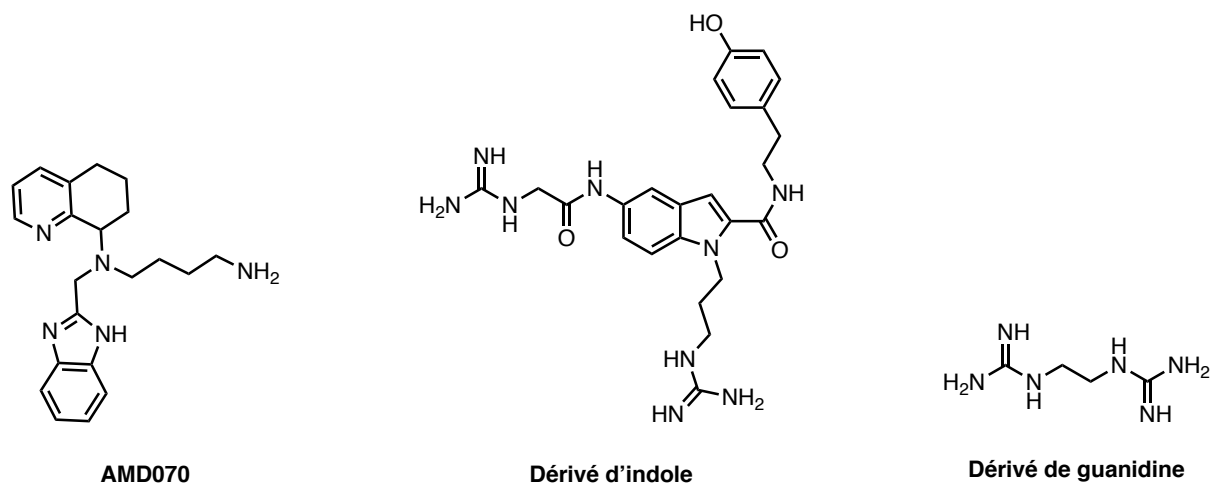


Figure 98 : Structure de trois différents types d'inhibiteurs de CXCR4

#### d. Les peptides T140 et dérivés

L'un des premiers peptides synthétiques ayant la capacité de se lier à CXCR4, **T140** (Figure 99), fut découvert en 1998 par Tamamura *et al.*<sup>25</sup> T140 possède une forte affinité pour CXCR4 ( $K_D = 3,5$  nM). Parmi les 14 acides aminés qui le composent, quatre ont été identifiés comme indispensables pour conserver l'affinité envers le récepteur<sup>26</sup> : Arg<sup>2</sup>, Nal<sup>3</sup>, Tyr<sup>5</sup> et Arg<sup>14</sup>. Différents dérivés de T140 ont été marqués à l'aide de différents émetteurs de positrons tels que le fluor-18<sup>27</sup>, le cuivre-64<sup>27</sup> et le gallium-68<sup>28</sup>. Tous ces dérivés présentent cependant le désavantage de se lier aux globules rouges, générant ainsi un fort signal de fond.

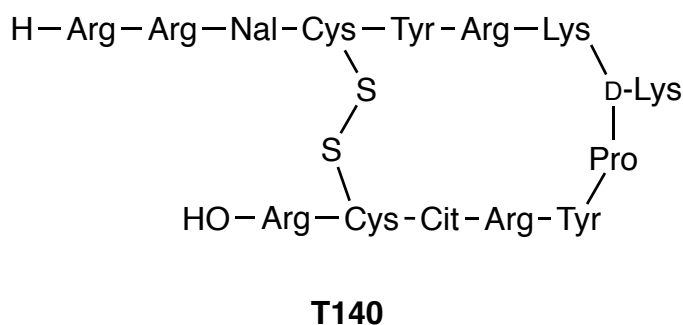


Figure 99 : Structure de T140

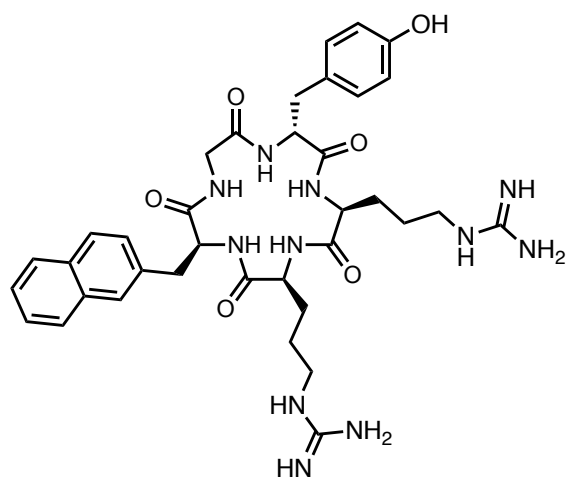
**Ac-TZ14011**, un dérivé de T140 développé en 2006 par une autre équipe, fonctionnalisé au niveau du  $N_\epsilon$  de la D-Lysine, a été radiomarqué à l'indium-111 pour effectuer de l'imagerie SPECT<sup>29</sup>. Le conjugué présente une affinité de 7,9 nM. Cependant, les études *in vivo*, réalisées sur souris greffées avec des cellules de carcinome pancréatique AsPC-1, ont montré que le composé ne s'accumulait que faiblement au sein de la tumeur avec un maximum de 0,51 %ID/g 1 h après injection (contre 50,9, 27,0 et 8,22 %ID/g dans les reins, le foie et la rate). Ce composé a également été marqué à l'iode-125 et testé *in vivo* sur souris saines, affichant une biodistribution plus favorable que son analogue marqué à l'indium-111, mais aucune donnée sur souris xéno-greffées avec des cellules surexprimant CXCR4 n'a été publiée<sup>30</sup>.

### *FC131 et dérivés*

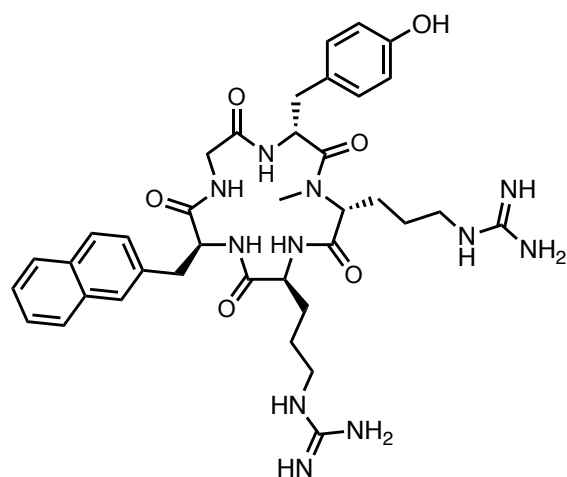
**FC131**, cyclo(D-Tyr-Arg-Arg-Nal-Gly), (*Figure 100*) est un pentapeptide cyclique présentant une affinité de 4 nM pour CXCR4, qui a été développé par Fuji *et al.* en 2003 à partir des études de relation structure-activité effectuées sur T140<sup>31</sup>. Ce même groupe a, par la suite, proposé un analogue optimisé de FC131 : cyclo(D-Tyr-D-N(Me)Arg-Arg-Nal-Gly) (*Figure 100*) possédant une affinité de 3 nM, légèrement supérieure à celle de FC131<sup>32</sup>.

La modification de FC131, en remplaçant l'Arg<sup>2</sup> par un résidu ornithine (acide 2,5-diaminopentanoïque), mène à une version fonctionnalisable de ce vecteur, qui a ainsi été utilisé pour la synthèse de [<sup>18</sup>F]F-CCIC-0007 (*Figure 100*) présentant une affinité modeste pour CXCR4 de 0,8 µM (contre [<sup>125</sup>I]I-SDF1)<sup>33</sup>. Cette perte d'affinité est attribuée à la modification de l'amine-δ de l'ornithine par l'espaceur PEG<sub>2</sub>, l'affinité de cyclo(D-Tyr-Orn-Arg-Nal-Gly) étant de 19 nM (contre [<sup>125</sup>I]I-SDF1), suggérant ainsi l'implication de ce résidu dans la liaison avec le récepteur. *In vivo*, le radiotracer a démontré une clairance rapide (60 minutes) des tissus non ciblés sur souris saines. Cependant, la faible accumulation dans les tissus exprimant CXCR4 interroge sur l'affinité du traceur envers son récepteur. Les auteurs ont donc souligné la nécessité d'optimiser ce composé afin de restaurer son affinité pour le récepteur.

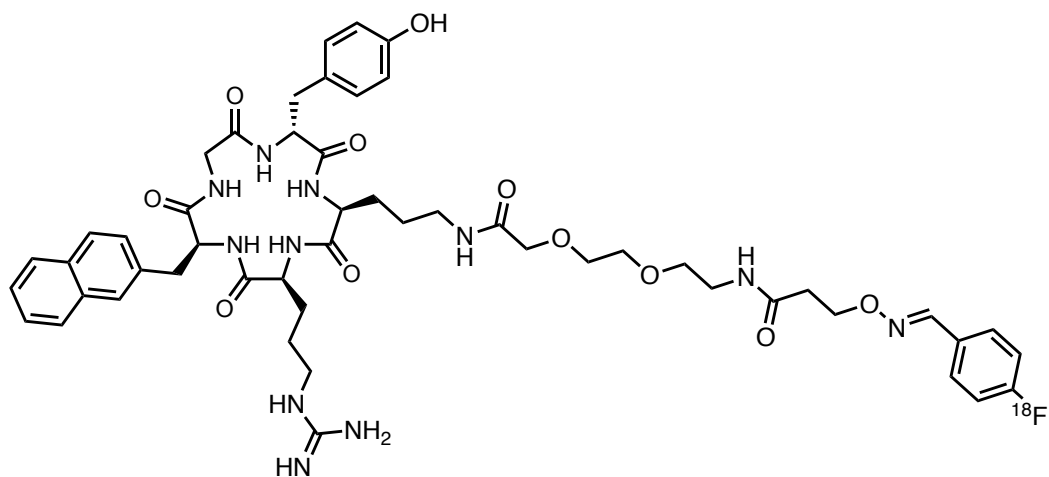
Ce problème a en partie été solutionné par Demmer *et al.* qui ont remplacé l'ornithine présente dans CCIC-0007 par un résidu D-ornithine N-méthylé générant ainsi un pentapeptide cyclique de conformation bloquée et fonctionnalisable au niveau de l'amine-δ de la D-ornithine *via* un espaceur aminobenzoyl porteur d'une charge positive. Ce vecteur présente une très forte affinité pour CXCR4 de 0,9 nM<sup>34</sup>. Par la suite, ce nouveau vecteur a pu être fonctionnalisé par un DOTA, puis radiomarqué au gallium-68. Le radiotracer [<sup>68</sup>Ga]Ga-CPCR4-2 (ou [<sup>68</sup>Ga]Ga-pentixafor) ainsi obtenu (*Figure 100*) possède une excellente affinité de 5 nM pour CXCR4. Les études *in vivo* effectuées sur ce nouveau traceur attestent d'une biodistribution très favorable permettant de générer des images où il est très aisé de discerner les tumeurs (*Figure 101*)<sup>35</sup>. À ce jour, le [<sup>68</sup>Ga]Ga-pentixafor demeure le meilleur traceur pour CXCR4. Ce dernier et son pendant thérapeutique, le [<sup>177</sup>Lu]Lu-pentixather, sont actuellement en phases I/II d'essais cliniques pour différentes pathologies telles que les myélomes multiples et les glioblastomes<sup>36-38</sup>.



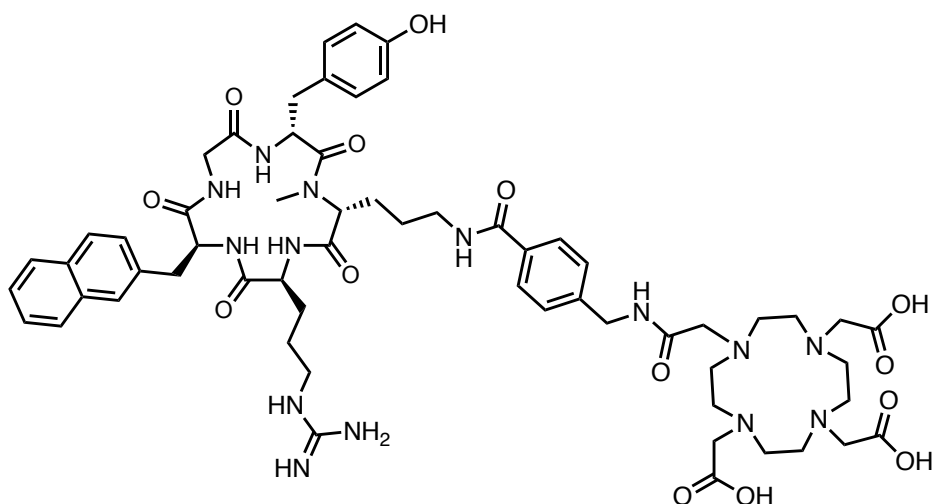
**FC131**



**[N-Me-D-Arg<sup>2</sup>]FC131**



**[<sup>18</sup>F]F-CCIC-0007**



**CPC4-2**

Figure 100 : Structure de FC131 (haut-gauche), de [N-Me-D-Arg<sup>2</sup>]FC131 (haut-gauche), de [<sup>18</sup>F]F-CCIC-0007 (milieu) et de CPC4-2 ou pentixafor (bas)

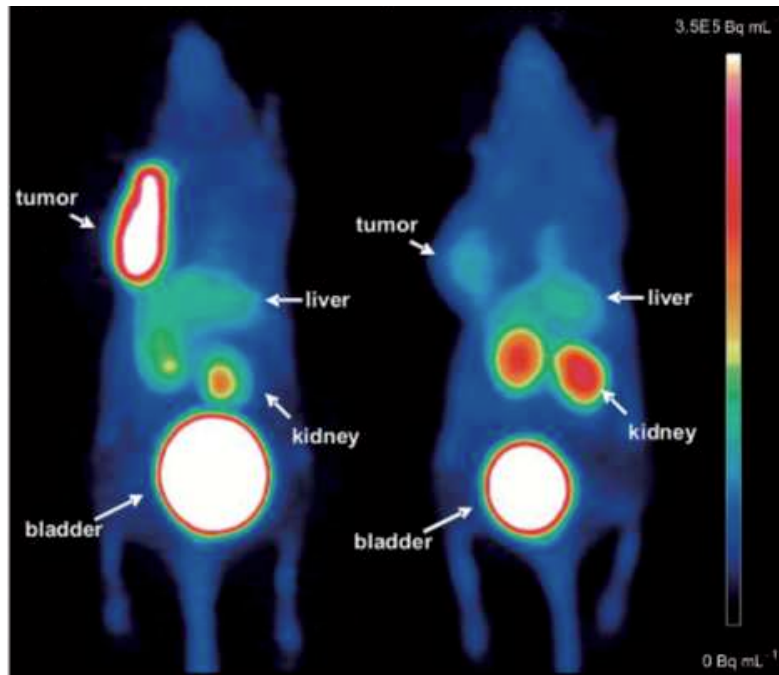


Figure 101 : Images TEP obtenues entre 90 et 110 min (MIP) après injection de  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-CPCR4-2}$  (gauche) et de  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-CPCR4-2} + 50 \mu\text{g}$  de FC131 sur souris xenogreffées avec des cellules tumorales OH1 h-SCLC (tirée de la littérature<sup>35</sup>)

## 2. Protéine d'activation des fibroblastes (FAP)

### A. Le micro-environnement tumoral et la FAP

Les tumeurs, pour se développer, ont besoin d'un certain nombre de conditions favorables à leur croissance. Celles-ci sont apportées par le micro-environnement tumoral (MET). Le MET est constitué de cellules non cancéreuses, immunitaires, de vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que différents types de protéines dont l'expression est différente de celle des tissus sains<sup>39</sup>. Les protéines exprimées au sein du MET constituent donc des cibles de choix pour l'imagerie et la thérapie des cancers et sont de plus en plus étudiées<sup>40</sup>.

L'angiogenèse tumorale, qui permet à la tumeur de détourner des vaisseaux sanguins existants afin de s'alimenter en oxygène et nutriments<sup>41</sup>, constitue le processus le plus étudié du MET. Les vaisseaux sanguins tumoraux surexpriment notamment des intégrines et en particulier l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ <sup>42</sup>. Cette protéine peut être ciblée à l'aide de la séquence RGD (Arg-Gly-Asp) découverte en 1984 par Ruoslahti et Pierschbacher<sup>43</sup>. Une multitude de dérivés de RGD ont par conséquent été évalués pour l'imagerie de tumeurs cancéreuses et leurs métastases<sup>44-47</sup>.

La protéine d'activation des fibroblastes (FAP ou FAP- $\alpha$ ) est une protéase membranaire surexprimée dans certains types de cancers<sup>48</sup>. Elle est également exprimée de manière physiologique pendant le développement embryonnaire<sup>49</sup>, durant le processus de guérison de plaies<sup>50</sup> ainsi que dans les maladies inflammatoires chroniques comme la fibrose pulmonaire<sup>51</sup> ou la cirrhose<sup>52</sup>. Le fait que la FAP- $\alpha$  ne soit pas exprimée par les tissus sains fait de cette protéase une cible de choix pour l'imagerie des tumeurs (en particulier les tumeurs épithéliales) ainsi que pour celle des maladies inflammatoires précédemment citées.

## B. Les ligands de la FAP pour l'imagerie

### a. Anticorps

Le premier agent d'imagerie ciblant la FAP testé en clinique était un anticorps murin marqué à l'iode-131, mAbF19. Le bioconjugué a prouvé dans cette étude sa capacité à détecter tumeurs primaires et métastases, présentant cependant le désavantage d'être immunogène<sup>53</sup>. Pour pallier ce problème, le sibrotuzumab, une version humanisée de cet anticorps, a été développé, marqué à l'iode-131 et évalué sur 26 patients atteints de cancer colorectal ou de carcinome pulmonaire<sup>54</sup>. 32% des patients ont développé des anticorps contre le sibrotuzumab. L'anticorps était cependant capable de s'accumuler dans les régions FAP<sup>+</sup>.

Plus récemment, Pandya *et al.* ont évalué, en préclinique, une version de mAbF19 fonctionnalisée avec de la DFO pour la chélation de zirconium-89<sup>55</sup>. L'anticorps marqué a montré une biodistribution favorable 72 heures après injection, générant des images montrant une claire accumulation au sein de la tumeur (précise la nature de la lignée tumorale) malgré une accumulation élevée dans le foie (*Figure 102*).

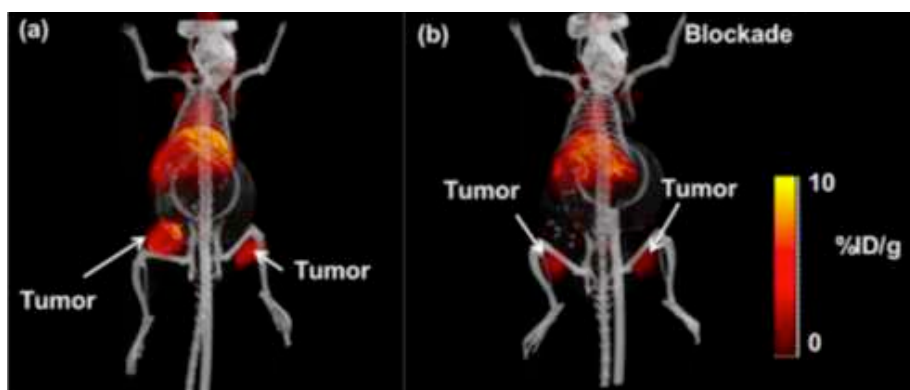


Figure 102 : a) Images TEP/CT obtenues 72 h après injection de  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-Bz-F19}$  dans des souris greffées avec des cellules FAP<sup>+</sup>-U87MG b) Images TEP/CT obtenues après injection de  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-Bz-F19}$  et d'un excès de mAbF19 natif pour bloquer les récepteurs. (tiré de la littérature<sup>55</sup>)

Un dernier anticorps ciblant la FAP, appelé B12, a été développé en 2020 par Hintz *et al.* puis radiomarké une nouvelle fois au zirconium-89.<sup>56</sup> De la même manière que pour  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-Bz-F19}$ , une forte accumulation dans le foie a été observée notamment 72 h après injection. Cependant, la clairance sanguine plus rapide de B12 par rapport à celle de F19 a permis de générer des images plus contrastées et de limiter l'accumulation dans les organes non ciblés radiosensibles comme la moelle osseuse.

### b. Peptides

La contribution de la chimie des peptides au ciblage de la FAP est plus anecdotique que celle des anticorps ou des petites molécules qui seront abordées dans le prochain paragraphe. Cependant, il existe quelques exemples de peptides radiomarkés utilisés pour l'imagerie de FAP- $\alpha$ . On peut notamment citer FAP-2286, un pseudo-heptapeptide cyclique fonctionnalisé avec un DOTA, développé par l'entreprise 3B Pharmaceuticals (*Figure 103*)<sup>57</sup>.

Les complexes métalliques de FAP-2286 (gallium, indium et lutétium) présentent une affinité subnanomolaire pour la protéine d'activation des fibroblastes ( $1,4 \pm 0,5$  nM,  $0,2 \pm 0,1$  nM et

0,4 ± 0,2 nM respectivement). Les études de biodistribution *ex vivo* ont montré que [<sup>68</sup>Ga]Ga-FAP-2286 et [<sup>111</sup>In]In-FAP-2286 possèdent tous deux des propriétés favorables en termes d'imagerie, avec une accumulation tumorale élevée (10,58 ± 0,75 %ID/g 1 h *p.i.* de [<sup>68</sup>Ga]Ga-FAP-2286 et 11,1 ± 4,3 %ID/g 1 h *p.i.* de [<sup>111</sup>In]In-FAP-2286) avec des accumulations dans le foie et les reins faibles à ce même temps d'acquisition (inférieurs à 4 %ID/g pour les reins, et à 1,5 %ID/g pour le foie). Le potentiel thérapeutique de [<sup>177</sup>Lu]Lu-FAP-2286 a également été évalué. À une heure *p.i.*, le radioconjugué affichait une accumulation de 21,1 ± 4,4 %ID/g dans la tumeur avec une accumulation négligeable dans les organes non ciblés, le maximum étant au niveau des reins (2,2 ± 0,2 %ID/g). 72 h *p.i.* le conjugué était toujours très présent au niveau de la tumeur (16,4 ± 3,6 %ID/g) avec une accumulation quasi nulle dans les organes non ciblés. Les résultats des études de biodistribution sont retranscrits dans le *Tableau 12*<sup>58</sup>.

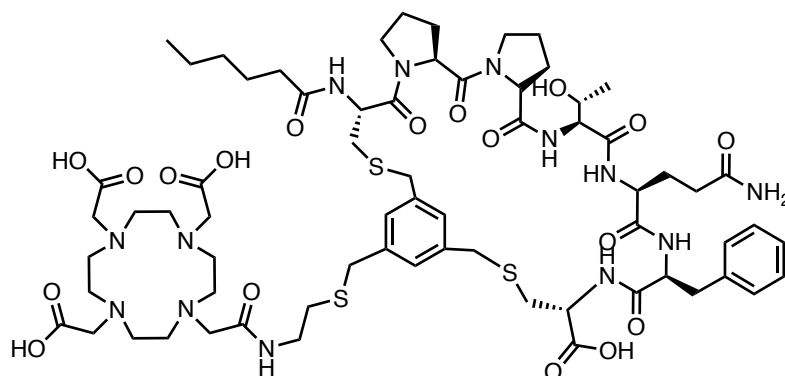


Figure 103 : Structure de FAP-2286

[ <sup>68</sup> Ga]Ga-FAP-2286	Tumeur	Sang	Reins	Foie
0,5 h <i>p.i.</i>	9,80 ± 0,74	1,74 ± 0,23	6,44 ± 0,82	2,36 ± 0,46
1 h <i>p.i.</i>	10,58 ± 0,75	0,69 ± 0,82	3,26 ± 0,57	1,44 ± 0,49
3 h <i>p.i.</i>	10,76 ± 0,74	0,09 ± 0,02	2,34 ± 0,08	0,26 ± 0,12

[ <sup>111</sup> In]In-FAP-2286	Tumeur	Sang	Reins	Foie
1 h <i>p.i.</i>	11,1 ± 4,3	0,4 ± 0,1	3,9 ± 1,0	0,3 ± 0,1
24 h <i>p.i.</i>	9,7 ± 5,3	0,0 ± 0,0	1,6 ± 0,2	0,1 ± 0,0
48 h <i>p.i.</i>	9,1 ± 5,0	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,2	0,1 ± 0,0

[ <sup>177</sup> Lu]Lu-FAP-2286	Tumeur	Sang	Reins	Foie
3 h <i>p.i.</i>	21,1 ± 4,4	0,1 ± 0,0	2,2 ± 0,2	0,2 ± 0,0
24 h <i>p.i.</i>	15,8 ± 2,5	0,1 ± 0,0	1,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0
72 h <i>p.i.</i>	16,4 ± 3,6	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,1 ± 0,0

Tableau 12 : Études de biodistribution effectuées sur les composés [<sup>68</sup>Ga]Ga-FAP-2286 (haut), [<sup>111</sup>In]In-FAP-2286 (milieu) et [<sup>177</sup>Lu]Lu-FAP-2286 (bas). Les accumulations sont données en %ID/g (tiré de la littérature<sup>58</sup>)



En raison de ces biodistributions extrêmement favorables, FAP-2286 est actuellement évalué en clinique en tant qu'agent d'imagerie et de thérapie pour les cancers<sup>59-61</sup> et la fibrose pulmonaire<sup>62</sup>.

### c. Petites molécules

Les petites molécules représentent la classe de ligand de FAP la plus étudiée. Parmi elles, les composés dérivés de la *N*-(4-quinolinoyl)-Gly-(2-cyanopyrrolidine) (ou FAPI, pour *FAP inhibitors*), introduits par l'équipe de Van der Veken en 2013, sont les plus prometteurs<sup>63</sup>. Leur succès est notamment dû au fait qu'en plus de posséder une affinité nanomolaire, ces dérivés présentent une forte sélectivité pour la FAP vis-à-vis des autres dipeptidylpeptidases et de la prolyl oligopeptidase, protéines qui sont apparentées à la FAP<sup>64</sup>. La FAP est une enzyme de type peptidase, ayant pour substrats des dipeptides contenant un résidu proline<sup>65</sup>. Le motif FAPI a donc pour rôle de mimer un substrat de cette enzyme. Des études antérieures avaient prouvé que le remplacement de la fonction acide carboxylique par un nitrile permettait une inhibition réversible de ce type d'enzymes avec une très forte affinité<sup>66</sup>. La présence du motif quinolinoyl joue également un rôle dans l'affinité de l'inhibiteur pour sa cible, au travers d'interactions cation- $\pi$  avec le groupement guanidine de l'Arg<sup>123</sup> de FAP- $\alpha$ <sup>63</sup>.

Le potentiel du motif FAPI en médecine nucléaire a rapidement donné lieu au développement de différents dérivés radiomarquables, qui ont été éprouvés à la fois chez la souris et chez l'homme comme le dérivé marqué à l'iode-111, FAPI-01, et celui marqué au gallium-68 et au lutétium-177, FAPI-02 (Figure 104)<sup>67</sup>.

Le composé FAPI-04 (Figure 104), développé en 2018 par Lindner *et al.*<sup>68</sup>, constitue à ce jour le radiotracer le plus étudié en clinique pour le ciblage de la protéine d'activation des fibroblastes. [<sup>68</sup>Ga]Ga-FAPI-04 a notamment été évalué comme agent d'imagerie des tumeurs bénignes fibreuses solitaires<sup>69</sup>, des sarcomes<sup>70</sup>, de carcinomes hépatiques<sup>71</sup> et d'autres pathologies diverses<sup>72-74</sup>. En raison de l'expression de la FAP dans une large variété de pathologies, FAPI-04 est régulièrement comparé au [<sup>18</sup>F]F-FDG et permet bien souvent de générer des images mieux contrastées<sup>75</sup> (Figure 105).

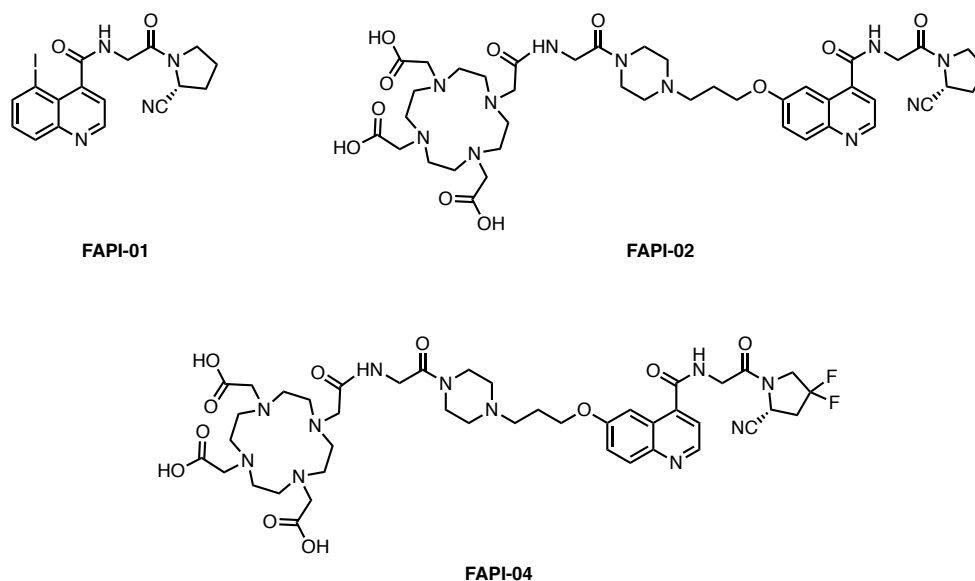
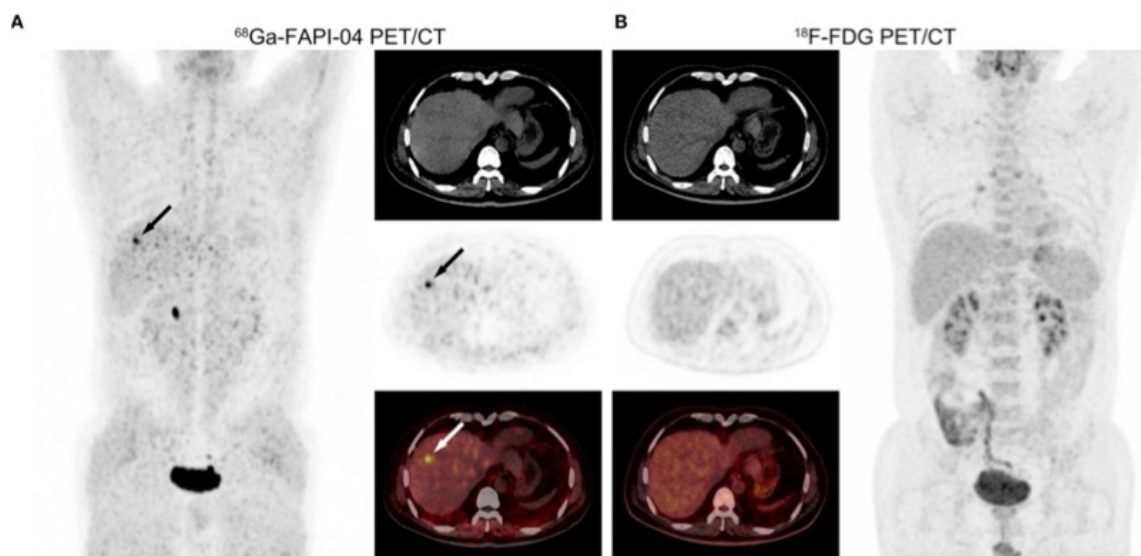


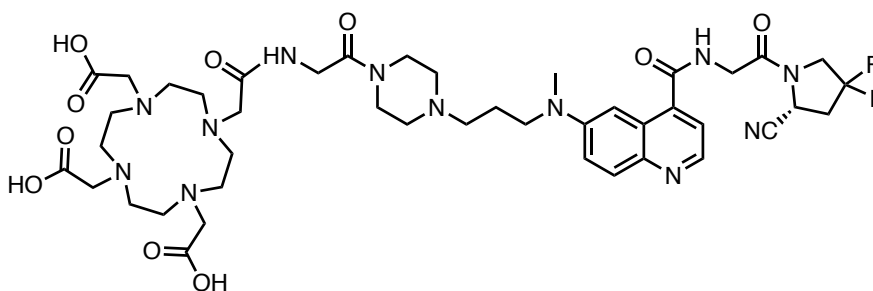
Figure 104 : Structure de FAPI-01, de FAPI-02 et de FAPI-04

De plus, comme le montre la *Figure 105*, l'accumulation de [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-FAPI-04 dans les tissus non ciblés est bien inférieure à celle de [ $^{18}\text{F}$ ]F-FDG. Ce dernier étant un mime du glucose, il est accumulé au sein de différents tissus à forte consommation de ce sucre (cerveau, intestins, pancréas...) contrairement au [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-FAPI-04 qui ne s'accumule que dans les zones où la protéine d'activation des fibroblastes est surexprimée<sup>76</sup>.



*Figure 105 : Images TEP/CT d'un patient de 53 ans atteint d'un carcinome hépatique obtenues après injection de [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-FAPI-04 (A) et de [ $^{18}\text{F}$ ]F-FDG (B). La lésion tumorale est indiquée par une flèche noire ou par une flèche blanche. Seul FAPI-04 permet l'identification de cette tumeur (image tirée de la littérature<sup>71</sup>)*

Dans l'idée de développer un traceur présentant une meilleure rétention tumorale, Loktev *et al.* ont développé FAPI-46, une variante de FAPI-04 qui diffère de ce dernier par la présence d'un atome d'azote méthylé remplaçant l'atome d'oxygène au niveau de l'espaceur (*Figure 106*).



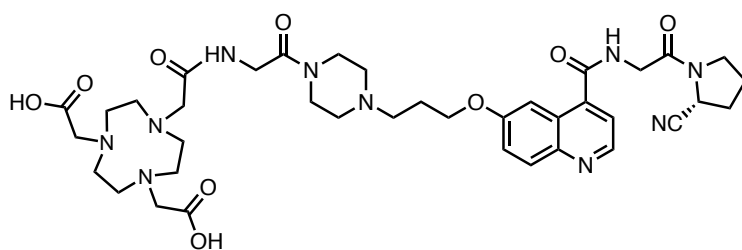
**FAPI-46**

*Figure 106 : Structure de FAPI-46 développé par Loktev *et al.*<sup>77</sup>*

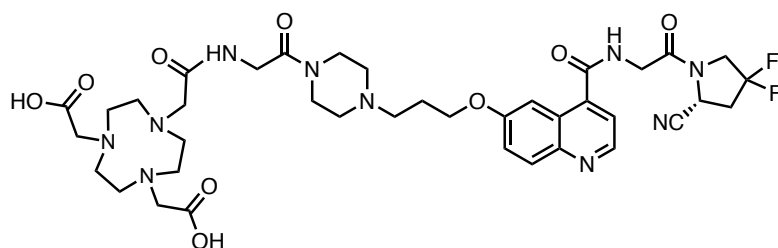
La rétention tumorale augmentée de FAPI-46 présente un important intérêt pour la radiothérapie. Différents essais cliniques prometteurs ont été effectués, notamment avec du lutétium-177<sup>78</sup> et de l'yttrium-90<sup>79</sup>. FAPI-46 a également été évalué en tant qu'agent d'imagerie marqué au gallium-68 où il affiche une biodistribution similaire à celle de [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-FAPI-04<sup>80</sup>.

D'autres traceurs ciblant la protéine d'activation des fibroblastes à l'aide du motif FAPI ont également été développés et fonctionnalisés avec différents types de chélateurs<sup>81</sup>. Parmi ceux-ci on peut citer l'exemple de FAPI-74 (*Figure 107*), analogue de FAPI-02 fonctionnalisé avec un

NOTA, évalué en clinique une fois marqué à l'aide du  $[^{18}\text{F}]\text{AlF}^{82,83}$ . De la même manière, FAPI-42 (Figure 107), un analogue de FAPI-04 fonctionnalisé avec un NOTA, a également montré des résultats encourageants en préclinique et en clinique une fois marqué au  $[^{18}\text{F}]\text{AlF}^{84}$ .



**FAPI-74**



**FAPI-42**

Figure 107 : Structure des composés FAPI-74 et FAPI-42.

### 3. Objectifs du projet

CXCR4 et FAP- $\alpha$  constituent deux cibles d'intérêt majeur en oncologie en raison de la large gamme de pathologies dans laquelle elles sont impliquées.

Dans le contexte de cette thèse, nous souhaitons étudier la combinaison d'un vecteur ciblant l'une de ces deux protéines avec le ligand d'un marqueur plus spécifique d'une pathologie particulière (comme la PSMA ou JMV594) au sein d'un traceur hétérobivalent.

Pour ce faire, nous avons choisi le motif ciblant de CPCR4-2 que nous avons jugé comme étant le plus performant pour le ciblage de CXCR4. Dans un premier temps, nous avons proposé une voie de synthèse alternative de ce peptide cyclique qui nous a permis de nous affranchir de l'étape délicate de *N*-méthylation sur phase solide. Dans un second temps, nous avons introduit ce motif au sein d'hétérobivalents ciblant GRPR et PSMA.

Afin de cibler FAP- $\alpha$ , nous avons choisi de nous appuyer sur les petites molécules inhibitrices de cette enzyme, et plus particulièrement sur le motif ciblant de FAPI-04. Afin d'en maîtriser la synthèse, nous avons dans un premier temps entrepris la synthèse du traceur FAPI-04.

## II. Synthèse de radiotraceurs ciblant CXCR4

Comme abordé dans la partie précédente, CXCR4 est surexprimé dans plus de 23 cancers différents, dont le cancer de la prostate<sup>2</sup>. Par conséquent, la synthèse de ligands hétérobivalents ciblant à la fois CXCR4, en tant que marqueur tumoral non spécifique, et un autre marqueur spécifique comme le PSMA ou le GRPR dans le cadre du cancer de la prostate est pertinente. Ce projet avait donc pour objectif la synthèse de deux ligands hétérobivalents : le premier ciblant CXCR4 et PSMA, le second ciblant CXCR4 et GRPR, ainsi que d'un ligand monovalent ciblant CXCR4 (*Figure 108*).

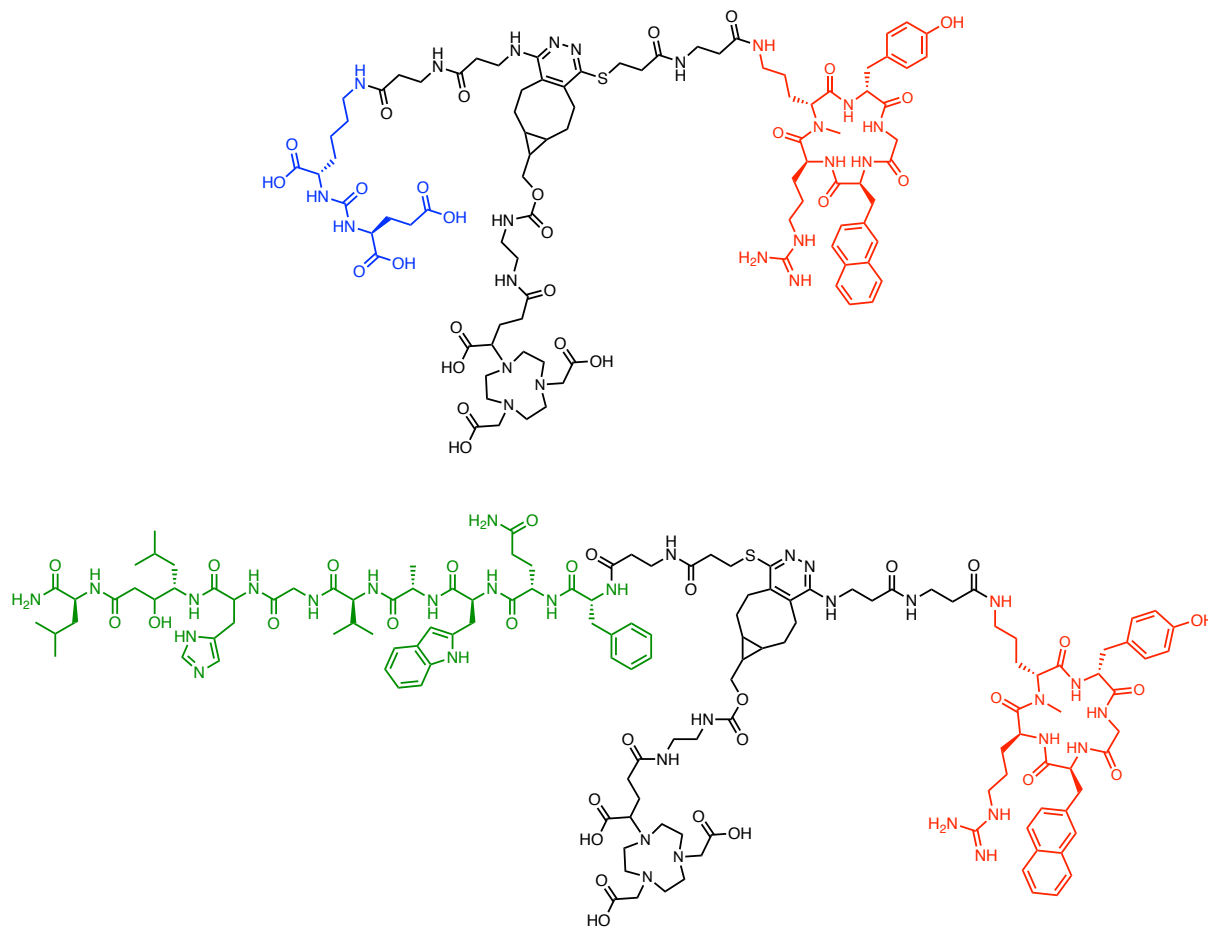


Figure 108 : Structure des deux composés cibles. En vert : JMVS94, en bleu : KuE et en rouge : [N-Me-D-Orn<sup>2</sup>]FC131

### 1. Synthèse de [N-Me-D-Orn<sup>2</sup>]FC131 protégé

La première étape pour synthétiser [N-Me-D-Orn<sup>2</sup>]FC131 protégé **34** est la synthèse sur résine 2-chlorotrytile du peptide linéaire protégé. Notre choix s'est porté sur la résine 2-chlorotrytile en raison de sa capacité à être labile en milieu très légèrement acide, permettant ainsi de produire des peptides dont les chaînes latérales restent protégées. La synthèse peptidique sur phase solide (SPPS) a été effectuée manuellement en utilisant HATU comme agent de couplage et la DIEA comme base, et en faisant réagir deux équivalents d'acide aminé pour un équivalent de peptide greffé (*Figure 109*).

L'étape la plus critique du procédé est la *N*-méthylation du résidu D-Orn(Dde) qui a été effectuée sur phase solide *via* l'approche de Fukuyama-Mitsunobu<sup>85</sup>. Ce procédé a été réalisé en 3 étapes : premièrement l'amine primaire, greffée sur la résine, est mise à réagir avec du chlorure de 4-nitrobenzylsulfonyl (chlorure de nosyle) en présence de 2,6-lutidine comme base. Après lavage de la résine, la sulfonamide résultante est méthylée dans les conditions de Mitsunobu en présence de méthanol. Enfin, le groupement nosyle est enlevé en traitant la résine avec une solution de thiophénol dans le DMF en présence de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU) (Figure 109). Le choix de l'approche de Fukuyama-Mitsunobu s'explique par la sélectivité de la réaction pour la formation du composé monoalkylé.

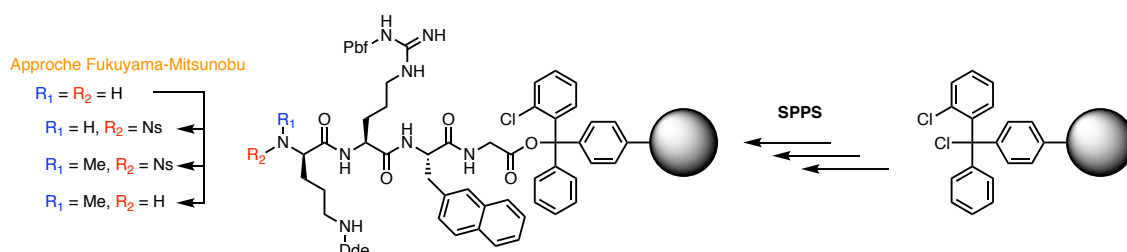


Figure 109 : Schéma réactionnel de la synthèse sur phase solide et de la *N*-méthylation selon l'approche Fukuyama-Mitsunobu

Après incorporation du dernier acide aminé (D-Tyr), le peptide linéaire a été relargué de la résine par traitement par une solution d'hexafluoroisopropanol (HFIP) dans le dichlorométhane (1:4) et cyclisé en utilisant une méthode proposée par Chatterjee *et al.* dans un article paru dans *Nature Protocols* en 2012<sup>86</sup>. Le brut réactionnel, une fois les solvants évaporés, a été dissous dans du DMF (0,1 mM) auquel ont été ajoutés l'agent de couplage (DPPA) et la base (NaHCO<sub>3</sub>) (Figure 110).

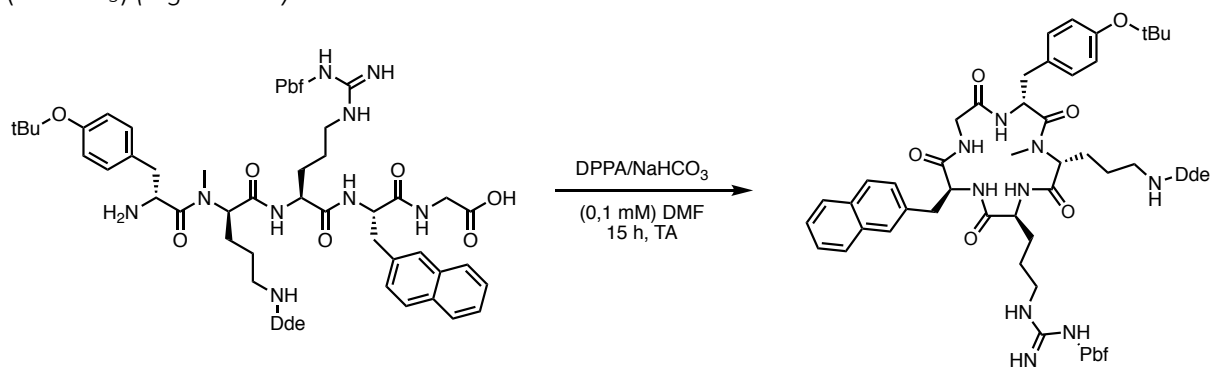


Figure 110 : Schéma réactionnel de l'étape de cyclisation

Après une nuit d'agitation à température ambiante, le composé cyclisé a été traité par une solution d'hydroxylamine et d'imidazole (4 M et 2,5 M dans le DMF) pendant 3 h pour donner le composé **34** avec un rendement global de 13 % après purification par HPLC semi-préparative (Figure 111).

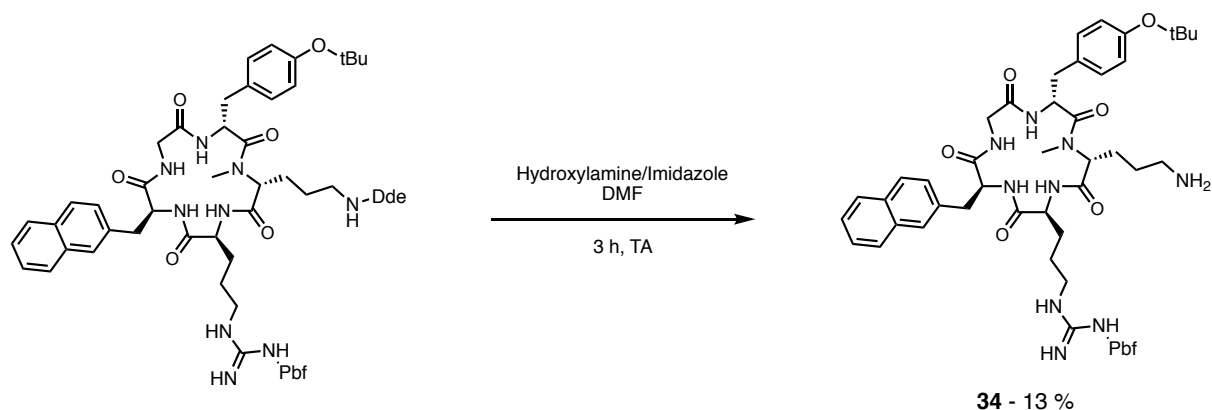


Figure 111 : Déprotection de l'amine primaire protégée par un Dde

Bien que nous ayons pu synthétiser le composé **34** avec succès, nous avons rencontré des problèmes de reproductibilité durant la *N*-méthylation du résidu D-Orn(Dde) et particulièrement lors de l'étape de nosylation. C'est pourquoi nous nous sommes donné pour objectif de réaliser la synthèse de *N*-Me-D-Orn(Dde) en phase homogène afin de l'incorporer directement sur la résine.

## 2. Voie de synthèse alternative *grâce au synthon* Fmoc-*N*(Me)-D-Orn(Dde)-OH et synthèse de Pentixafor

### A. Synthèse de l'acide aminé Fmoc-*N*(Me)-D-Orn(Dde)-OH

Comme décrit précédemment, en raison des difficultés de reproductibilité rencontrées lors de la synthèse du composé **34**, nous avons fait le choix de directement synthétiser Fmoc-*N*(Me)-D-Orn(Dde)-OH (**41**) en phase homogène en partant de la Boc-D-Orn-OH.

La première étape de synthèse consistait en l'incorporation du groupement *N*-(1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)éthyle) (Dde) par réaction de la Boc-D-Orn-OH avec le Dde-OH à reflux de l'éthanol pendant 4 h. Notre choix s'est porté sur le motif Dde en raison de sa spécificité pour les amines primaires ainsi que de son orthogonalité vis-à-vis de la déprotection des groupements Fmoc (milieu basique) et du relargage de la résine (milieu légèrement acide)<sup>87</sup>. À la suite de cette réaction, le composé **35** a pu être obtenu avec un rendement de 98 % (Figure 112).

Nous avons protégé l'acide carboxylique sous forme d'ester de benzyle, immédiatement suivi de la déprotection de l'amine primaire protégée par le groupement Boc (Figure 112). La protection de l'acide carboxylique est réalisée afin de faciliter les purifications en phase normale et éviter l'obtention d'un zwitterion après déprotection de l'amine  $\alpha$ .

Par la suite, l'amine primaire a été protégée avec un groupement *ortho*-nosyle pour donner la sulfonamide **38** avec un rendement de 95 %. Cette dernière a ensuite été alkylée au moyen d'une réaction de Mitsunobu en présence de méthanol menant au composé **39** avec un rendement de 71 %.

La coupure du groupement nosyle a été effectuée avec du thiophénol en présence de carbonate de césium.

L'installation du groupement Fmoc a été effectuée en présence de chlorure de 9-fluorenylméthoxycarbonyl (Fmoc-Cl) et de DIEA à température ambiante pendant 1 h. Le composé **41** résultant de cette réaction a pu être isolé avec un rendement de 88 %. Pour finir, l'acide aminé **42** a été obtenu à la suite d'une hydrogénation pallado-catalysée dans le THF avec un rendement de 78 % après purification.

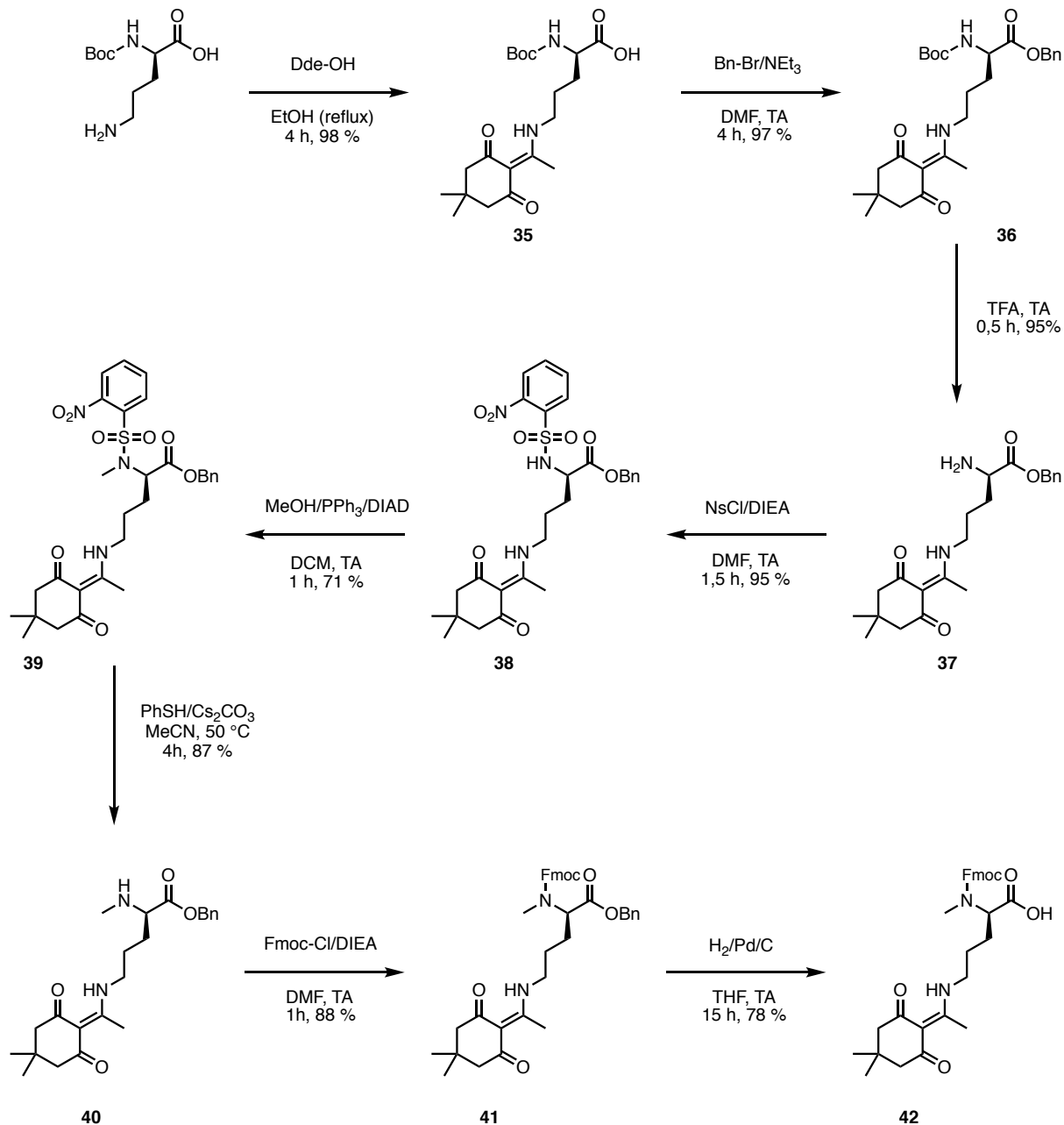


Figure 112 : Schéma réactionnel de la synthèse de la Fmoc-N(Me)-D-Orn(Dde)-OH **42**

Cette approche en phase homogène nous a permis d'obtenir l'acide aminé cible **42** avec un rendement global de 36 %. Lors de cette synthèse, nous avons produit 1,6 g de cet acide aminé qui pourra être directement engagé dans la synthèse de [N-Me-D-Orn<sup>2</sup>]FC131.

## B. Synthèse du composé **34** via le synthon Fmoc-*N*(Me)-D-Orn(Dde)-OH

Comme précédemment, le composé **34** a été synthétisé une nouvelle fois sur résine 2-chlorotrityle par SPPS manuelle. Afin d'économiser le composé **42**, dont la synthèse est coûteuse et fastidieuse, nous avons adapté le protocole de couplage en utilisant seulement 1,1 équivalent de ce composé et en augmentant le temps de réaction. La réaction de couplage a été suivie par HPLC-MS, après clivage d'une aliquote, qui nous a indiqué que la réaction était complète après 2 h. Après le couplage de la D-Tyr, le peptide a été clivé de la résine et le brut réactionnel traité de la même manière que précédemment (voir partie expérimentale).

Cette approche nous a permis d'obtenir le cyclopeptide protégé **34** avec un rendement de 15 % après purification par HPLC semi-préparative.

## 3. Synthèse de ligands hétérobivalents et monovalents ciblant CXCR4

### A. Synthèse de [*N*-Me-D-Orn-βAla-βAla-H<sup>2</sup>]FC131 et de [*N*-Me-D-Orn-βAla-βAla-SH<sup>2</sup>]FC131

La première étape de ce projet consistait à synthétiser les dérivés de FC131 fonctionnalisés avec une amine ([*N*-Me-D-Orn-βAla-βAla-H<sup>2</sup>]FC131, **43**) et avec un thiol ([*N*-Me-D-Orn-βAla-βAla-SH<sup>2</sup>]FC131, **44**) à partir du composé **34**.

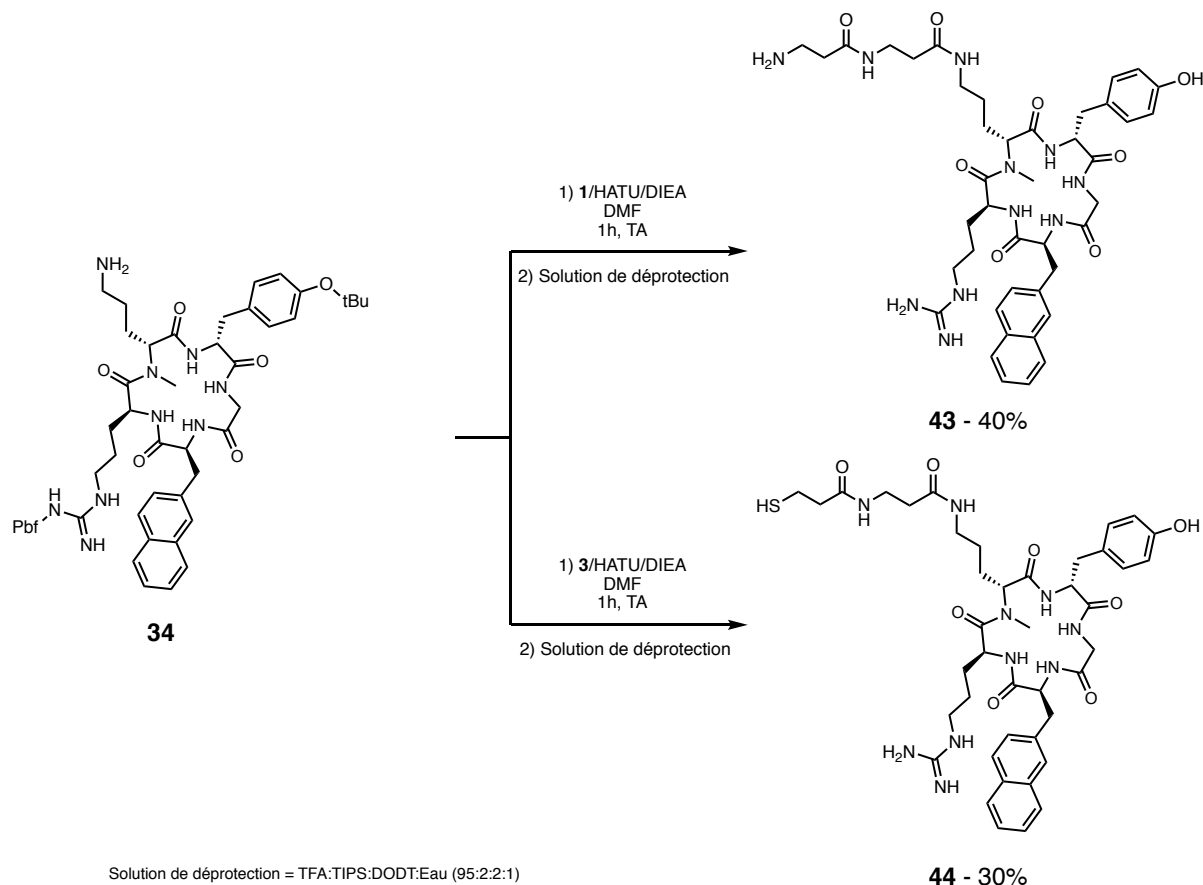


Figure 113 : Synthèse des composés **43** et **44**



Les synthèses des composés **43** et **44** ont été effectuées en deux étapes de manière analogue. La première étape consistait en un couplage peptidique avec HATU en présence de DIEA. La seconde consistait en un traitement de 1 h avec une solution composée de TFA (95 %), de 2,2'-(éthylènedioxy)diéthanethiol (2 %), de TIPS (2 %) et d'eau (1 %). La déprotection des groupes protecteurs a été réalisée en présence de *scavengers* dont le but est de réagir avec les produits de déprotection du peptide (pouvant être de nature carbocationique) et afin que ces derniers ne réagissent pas avec les chaînes latérales du peptide (*Figure 113*).

Les composés **43** et **44** ont ainsi pu être isolés avec des rendements respectifs de 40 et 30 % après purification par HPLC semi-préparative.

## B. Assemblage des ligands

L'assemblage des ligands hétérobivalents autour de la plateforme pyridazine a été réalisé étape par étape, ces travaux étant antérieurs au développement de la méthode *one-pot* décrite dans le chapitre 1. La tétrazine monosubstituée **45** a été obtenue en faisant réagir le composé **43** avec la 3,6-dichlorotétrazine avec un rendement de 54 % après isolement du produit. La réaction du composé **45** avec le composé **6** en présence de DIEA, suivie par la réaction de IEDDA avec le NODAGA-BCN a mené à au ligand hétérobivalent **46** ciblant GRPR et CXCR4 avec un rendement global de 22 % (*Figure 114*).

Le composé **47** est, pour sa part, issu de la réaction du composé dérivé de KuE **11** avec le dérivé thiolé **44** suivie de la réaction de IEDDA avec le NODAGA-BCN et enfin de la déprotection des esters *tert*-butyliques du motif KuE. Le composé hétérobivalent **47**, ciblant PSMA et CXCR4, a pu ainsi être obtenu avec un rendement global de 13 %.

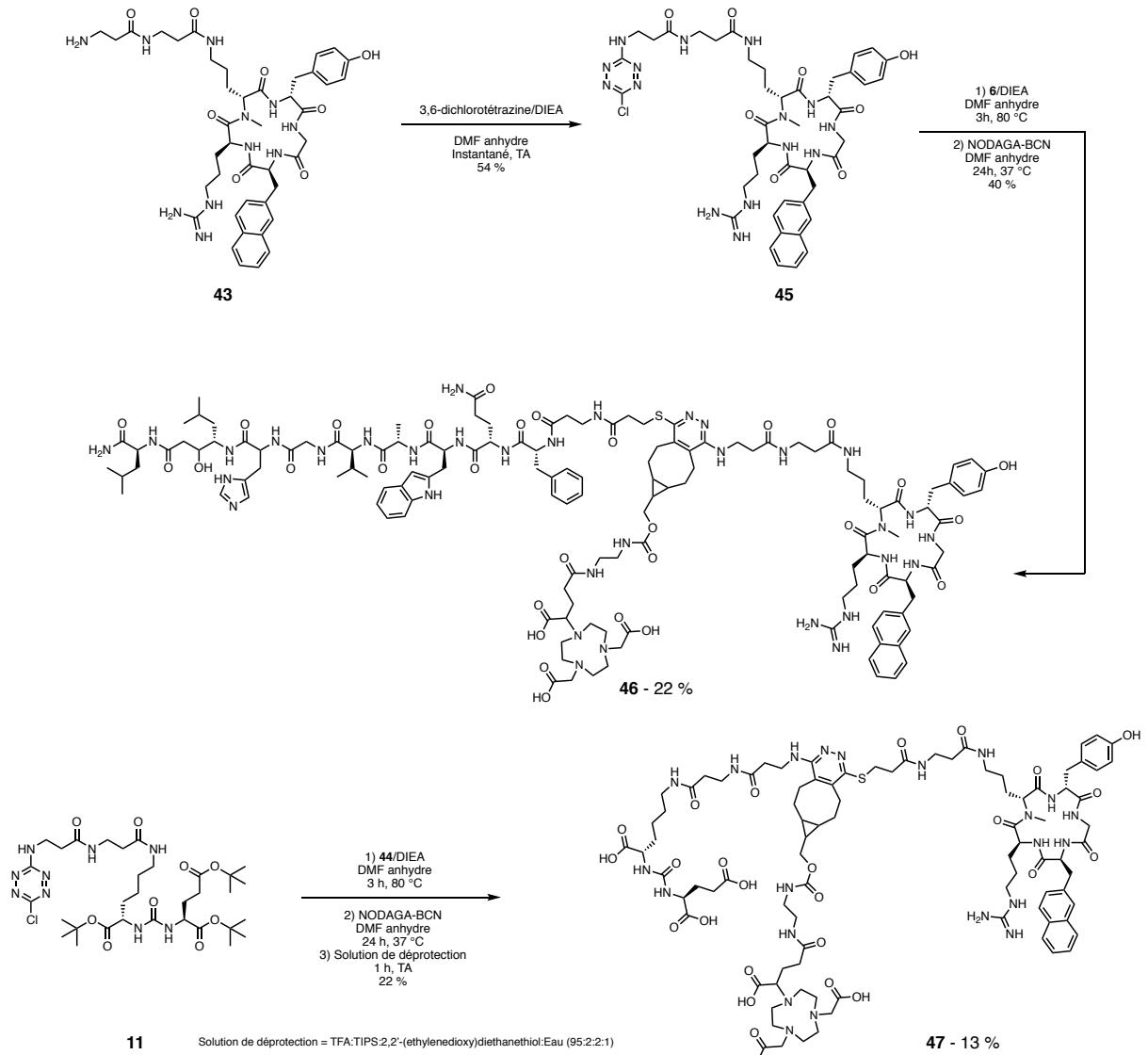


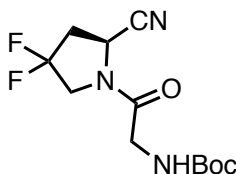
Figure 114 : Synthèse des hétérobivalents **46** et **47**

### III. Synthèse de FAPI-04

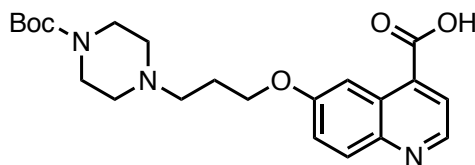
Pour cette dernière partie, nous nous étions fixé pour objectif la synthèse de FAPI-04 qui est l'inhibiteur de la protéine d'activation des fibroblastes le plus étudié à ce jour. Ce composé était à destination du centre Georges François Leclerc, à Dijon, et du CHU de Bordeaux dans le but d'effectuer des études sur cette cible thérapeutique émergente dans le cadre de différentes pathologies associées aux fibroblastes. FAPI est également un motif qui a suscité notre intérêt dans la synthèse de ligands hétérobivalents.

#### 1. Synthèse des *building blocks*

Le motif d'intérêt de FAPI-04 est composé de deux *building blocks* : (S)-(2-(2-cyano-4,4-difluoropyrrolidin-1-yl)-2-oxoéthyl)carbamate et l'acide 6-(3-(4-(*tert*-butoxycarbonyl)pipérazin-1-yl)propoxy)quinoline-4-carboxylique dont les structures sont décrites dans la Figure 115.



(S)-(2-(2-cyano-4,4-difluoropyrrolidin-1-yl)-2-oxoéthyl)carbamate



acide 6-(3-(4-(*tert*-butoxycarbonyl)pipérazin-1-yl)propoxy)quinoline-4-carboxylique

Figure 115 : Structure des deux *building blocks* pour la synthèse de FAPI

#### A. Synthèse du (S)-(2-(2-cyano-4,4-difluoropyrrolidin-1-yl)-2-oxoéthyl)carbamate (**50**)

La synthèse du composé **50** a été effectuée depuis la Boc-(S)-4,4-difluoroproline disponible commercialement. La première étape de la synthèse consiste en la formation de l'acétamide **48** par réaction de couplage du produit commercial avec l'ammoniaque en utilisant EDC/HOBt comme agents de couplage. Le composé **48** a été obtenu avec un rendement de 95 % après isolement du produit par filtration ( Figure 116).

Le composé **48** a ensuite été déshydraté avec le réactif de Burgess (méthyl N-(triéthylammoniumsulfonyl)carbamate) dans le dichlorométhane pour donner le nitrile **49** avec un rendement de 94 % (Figure 116).

Pour finir, la molécule cible **50** a été obtenue en deux étapes successives depuis **49** : déprotection de l'amine secondaire dans l'acide chlorhydrique aqueux (2 M) suivie du couplage de la Boc-Glycine en utilisant HBTU comme agent de couplage dans le DMF (Figure 116).

Contrairement à la procédure décrite dans la littérature<sup>64</sup>, où la réaction de déshydratation est effectuée après le couplage de la glycine, nous avons fait le choix de la réaliser avant le couplage avec la glycine. Cependant, l'adoption de cette stratégie a nécessité l'utilisation d'une méthode de déprotection des amines plus douce, les nitriles pouvant subir l'addition d'une molécule d'eau en présence d'acide trifluoroacétique<sup>88,89</sup>.

En outre, la synthèse que nous avons proposée diffère également de la littérature dans le choix du réactif de déshydratation. L'utilisation du réactif de Burgess à la place de l'anhydride trifluoroacétique en présence de pyridine nous a permis de travailler à température ambiante tout en améliorant le rendement de cette étape (94 % contre 70 %)<sup>64</sup>.

Cette stratégie s'est avérée fructueuse, le composé **50** ayant été synthétisé avec un rendement global de 67 % contre 31 % dans la littérature (Figure 116).

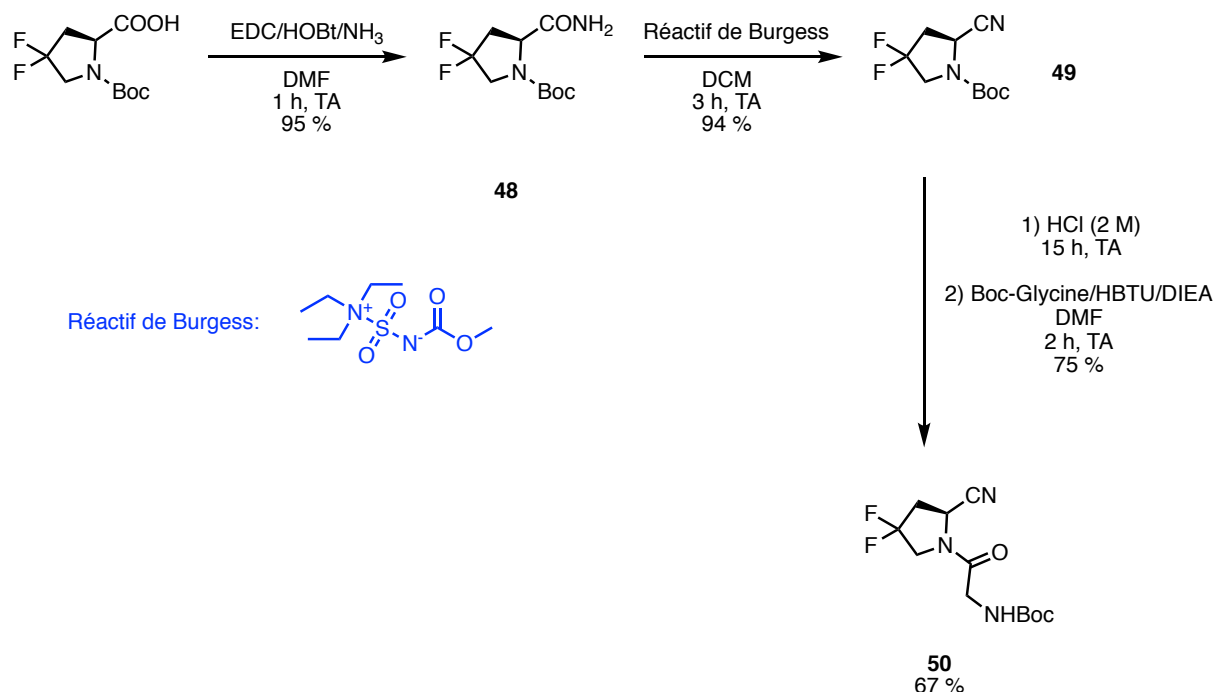


Figure 116 : Schéma réactionnel de la synthèse de **50** à partir de la Boc-(S)-4,4-difluoroproline commerciale.

## B. Synthèse de l'acide 6-(3-(4-(*tert*-butoxycarbonyl)pipérazin-1-yl)propoxy)quinoline-4-carboxylique (**54**)

La synthèse du composé **54** a été décrite dans la littérature par Lindner *et al.*<sup>68</sup> au départ de l'acide 6-méthoxyquinoline-4-carboxylique. Nous avons dans un premier temps reproduit cette synthèse. La première étape consiste en une déméthylation, au reflux d'acide bromhydrique concentré, pour donner l'acide 6-hydroxyquinoline-4-carboxylique **51** avec un rendement de 93 % (Figure 117).

L'hydroxyquinoline **51** a ensuite été mise à réagir avec du 1-bromo-3-chloropropane en présence de carbonate de césium. L'intermédiaire ainsi obtenu a ensuite été directement engagé dans une réaction de saponification par la soude menant au composé **52** avec un faible rendement de 15 % que nous expliquons par l'hydrolyse de la fonction chloré menant à l'alcool correspondant (Figure 117).

Pour finir, le produit de saponification **52** a été couplé à la Boc-pipérazine *via* une réaction de substitution nucléophile pour donner le composé cible **54** avec un rendement de 34 %. Cette méthode tirée de la littérature nous a donc permis d'obtenir le composé désiré avec un rendement global de 5 % (Figure 117).

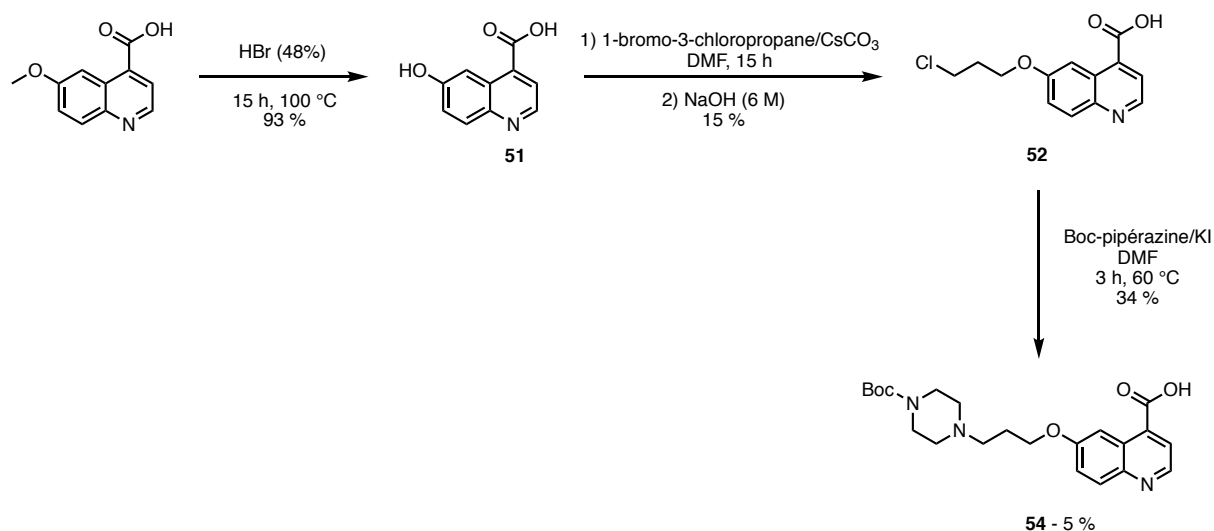


Figure 117 : Synthèse du composé **54**, méthode tirée de la littérature<sup>68</sup>

En raison du faible rendement obtenu lors de cette synthèse, nous nous sommes fixés pour objectif de trouver une autre voie de synthèse afin d'éviter l'étape limitante de saponification à l'origine de différents produits de dégradation indésirables. C'est pourquoi nous avons proposé une méthode alternative pour accéder au synthon **54** en inversant l'étape de saponification et l'étape de couplage à la pipérazine (Figure 118).

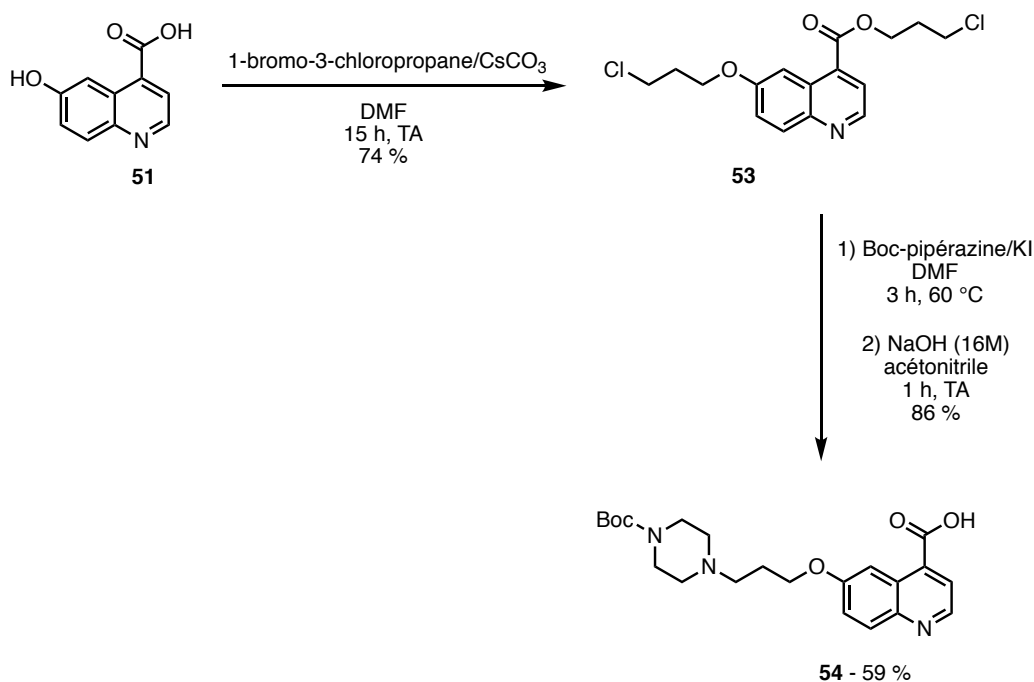


Figure 118 : Synthèse alternative du composé 54

L'inversion de ces deux étapes, bien que plus coûteuse en Boc-pipérazine, nous a permis d'obtenir un rendement de synthèse global, bien supérieur, de 59 %.

### C. Couplage et conjugaison au DOTA

Dans le but de déprotéger l'amine du composé 50, une solution d'acide *para*-toluène sulfonique (APTS, dans l'acétonitrile) a été ajoutée au goutte à goutte dans une solution du composé 50 dans l'acétonitrile, refroidie à 0 °C. La solution a été agitée pendant 24 h après un lent retour à température ambiante. Le nitrile aminé ainsi obtenu a été isolé et directement engagé dans la réaction de couplage avec le composé 54 en présence de HBTU et de DIEA (Figure 119).

Le motif ciblant de FAP 55 a ainsi pu être obtenu avec un rendement de 50 %. Ce dernier a ensuite été déprotégé par réaction avec l'APTS dans l'acétonitrile à 45 °C pendant 15 h. L'amine secondaire a ainsi pu être directement engagée dans la réaction de couplage avec le DOTA-NHS en présence de DIEA dans le DMF pendant 3 h à température ambiante. FAPI-04 (56) a été obtenu avec un rendement de 52 % après purification par HPLC semi-préparative en phase inverse (Figure 119).

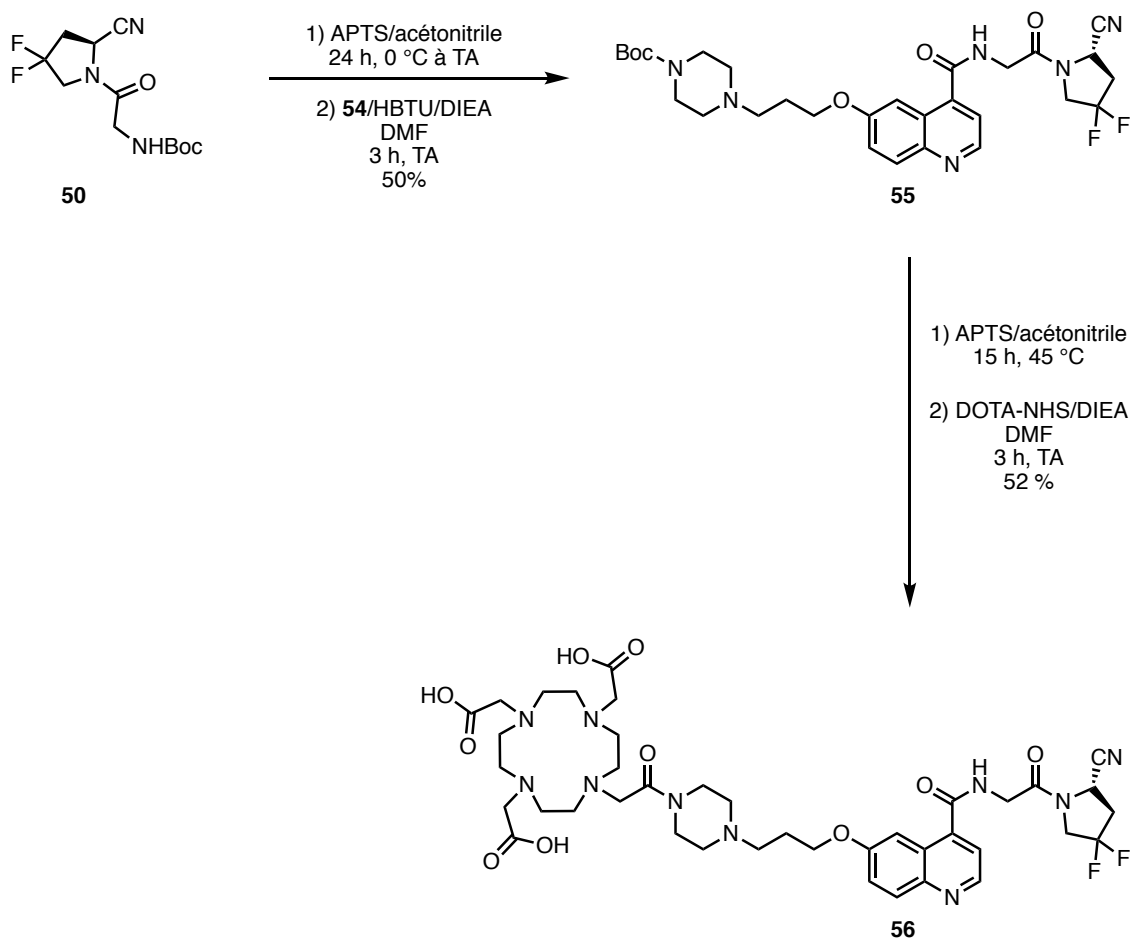


Figure 119 : Couplage des synthons **50** et **54** et couplage avec le DOTA-NHS menant au composé FAPI-04 (**56**)

## Conclusion

Dans ce second chapitre, nous nous sommes intéressés au ciblage de deux nouvelles protéines qui sont d'un intérêt majeur pour l'imagerie et la thérapie de différents types de cancers : CXCR4, un récepteur surfacique surexprimé dans plus de 23 cancers et impliqué dans la formation de métastases, et FAP, une protéine surexprimée dans le micro-environnement tumoral dont le ciblage surpasse celui des transporteurs de glucose (GLUT2) en termes d'imagerie dans une multitude de cas de cancers et de maladies inflammatoires comme la fibrose pulmonaire.

Dans le contexte des ligands hétérobivalents, nous pensons que l'association entre un ligand ciblant une pathologie précise (comme peuvent l'être JMV594 et KuE) et un ligand dont le champ d'application est plus large (comme CXCR4 surexprimé dans une grande variété de cancers) permettrait de générer des traceurs spécifiques d'une pathologie (comme le cancer de la prostate) ayant une affinité et une rétention tumorale augmentée. C'est pourquoi nous avons réalisé la synthèse de deux ligands hétérobivalents : l'un ciblant CXCR4 et GRPR (**46**), l'autre ciblant CXCR4 et PSMA (**47**). Ces ligands ont été synthétisés avec succès et avec de bons rendements avec la méthode développée dans le chapitre 1.

Dans un second temps, nous avons réalisé et optimisé la synthèse de FAPI-04 (**56**) ce qui nous a permis de générer cette molécule, qui est à ce jour le composé le plus étudié en clinique pour le ciblage de la protéine d'activation des fibroblastes, avec un rendement de 10 % sur 10 étapes. Ce composé est destiné à la plateforme d'imagerie du petit animal du centre Georges-François Leclerc, localisé à Dijon et spécialisé dans l'étude et le traitement des cancers.

Toujours dans le contexte des ligands hétérobivalents, et de la même manière que pour CXCR4, la FAP représente une cible intéressante de par la large variété de pathologies dans lesquelles elle est surexprimée. C'est pourquoi l'un de nos objectifs à court terme est de réaliser la synthèse d'une bibliothèque de ligands hétérobivalents ciblant cette protéine et d'autres, dont le ciblage est plus spécifique à une seule pathologie, en utilisant la méthode *one-pot* que nous avons développé. La synthèse de FAPI-04 est désormais maîtrisée et nous sommes en mesure de synthétiser des ligands hétérobivalents incorporant ce motif pour cibler la FAP- $\alpha$ .

Pour finir, nous avons pour objectif à plus long terme de réaliser la caractérisation biologique *in vitro* et *in vivo* des ligands hétérobivalents ainsi obtenus.



## Bibliographie

- (1) Chatterjee, S.; Behnam Azad, B.; Nimmagadda, S. The Intricate Role of CXCR4 in Cancer. *Adv. Cancer Res.* **2014**, *124*, 31–82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411638-2.00002-1>.
- (2) Lippitz, B. E. Cytokine Patterns in Patients with Cancer: A Systematic Review. *Lancet Oncol.* **2013**, *14* (6), e218–e228. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70582-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70582-X).
- (3) Liu, F.; Qi, L.; Liu, B.; Liu, J.; Zhang, H.; Che, D.; Cao, J.; Shen, J.; Geng, J.; Bi, Y.; Ye, L.; Pan, B.; Yu, Y. Fibroblast Activation Protein Overexpression and Clinical Implications in Solid Tumors: A Meta-Analysis. *Plos One* **2015**, *10* (3), e0116683. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116683>.
- (4) Berger, E. A.; Murphy, P. M.; Farber, J. M. CHEMOKINE RECEPTORS AS HIV-1 CORECEPTORS: Roles in Viral Entry, Tropism, and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **1999**, *17* (1), 657–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.657>.
- (5) Hughes, C. E.; Nibbs, R. J. B. A Guide to Chemokines and Their Receptors. *Febs J.* **2018**, *285* (16), 2944–2971. <https://doi.org/10.1111/febs.14466>.
- (6) Zou, Y.-R.; Kottmann, A. H.; Kuroda, M.; Taniuchi, I.; Littman, D. R. Function of the Chemokine Receptor CXCR4 in Haematopoiesis and in Cerebellar Development. *Nature* **1998**, *393* (6685), 595–599. <https://doi.org/10.1038/31269>.
- (7) Murphy, P. Chemokines and the Molecular Basis of Cancer Metastasis. *New Engl. J. Med.* **2001**, *345* (11), 833–835. <https://doi.org/10.1056/NEJM200109133451113>.
- (8) Burger, J. A.; Kipps, T. J. CXCR4: A Key Receptor in the Crosstalk between Tumor Cells and Their Microenvironment. *Blood* **2006**, *107* (5), 1761–1767. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3182>.
- (9) Zhao, H.; Guo, L.; Zhao, H.; Zhao, J.; Weng, H.; Zhao, B. CXCR4 Over-Expression and Survival in Cancer: A System Review and Meta-Analysis. *Oncotarget* **2015**, *6* (7), 5022–5040. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3217>.
- (10) Weiss, Ido. D.; Jacobson, O. Molecular Imaging of Chemokine Receptor CXCR4. *Theranostics* **2013**, *3* (1), 76–84. <https://doi.org/10.7150/thno.4835>.
- (11) Moser, B.; Loetscher, P. Lymphocyte Traffic Control by Chemokines. *Nat. Immunol.* **2001**, *2* (2), 123–128. <https://doi.org/10.1038/84219>.
- (12) Misra, P.; Lebeche, D.; Ly, H.; Schwarzkopf, M.; Diaz, G.; Hajjar, R. J.; Schechter, A. D.; Frangioni, J. V. Quantitation of CXCR4 Expression in Myocardial Infarction Using <sup>99m</sup>Tc-Labeled SDF-1 $\alpha$ . *J. Nucl. Med.* **2008**, *49* (6), 963–969. <https://doi.org/10.2967/jnumed.107.050054>.
- (13) Meincke, M.; Tiwari, S.; Hattermann, K.; Kalthoff, H.; Mentlein, R. Near-Infrared Molecular Imaging of Tumors via Chemokine Receptors CXCR4 and CXCR7. *Clin. Exp. Metastasis* **2011**, *28* (8), 713–720. <https://doi.org/10.1007/s10585-011-9403-y>.
- (14) Nimmagadda, S.; Pullambhatla, M.; Pomper, M. G. Immunoimaging of CXCR4 Expression in Brain Tumor Xenografts Using SPECT/CT. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50* (7), 1124–1130. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.061325>.
- (15) Abbott, N. J.; Rönnbäck, L.; Hansson, E. Astrocyte–Endothelial Interactions at the Blood–Brain Barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7* (1), 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>.
- (16) De Clercq, E.; Yamamoto, N.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Witvrouw, M.; De Vreese, K.; Debyser, Z.; Rosenwirth, B.; Peichl, P.; Datema, R. Highly Potent and Selective Inhibition of Human Immunodeficiency Virus by the Bicyclam Derivative JM3100. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38* (4), 668–674. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.4.668>.
- (17) Donzella, G. A.; Schols, D.; Lin, S. W.; Esté, J. A.; Nagashima, K. A.; Maddon, P. J.; Allaway, G. P.; Sakmar, T. P.; Henson, G.; DeClercq, E.; Moore, J. P. AMD3100, a Small Molecule Inhibitor

- of HIV-1 Entry via the CXCR4 Co-Receptor. *Nat. Med.* **1998**, *4* (1), 72–77. <https://doi.org/10.1038/nm0198-072>.
- (18) Nimmagadda, S.; Pullambhatla, M.; Stone, K.; Green, G.; Bhujwala, Z. M.; Pomper, M. G. Molecular Imaging of CXCR4 Receptor Expression in Human Cancer Xenografts with [64Cu]AMD3100 Positron Emission Tomography. *Cancer Res.* **2010**, *70* (10), 3935–3944. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4396>.
- (19) Poty, S.; Gourni, E.; Désogère, P.; Boschetti, F.; Goze, C.; Maecke, H. R.; Denat, F. AMD3100: A Versatile Platform for CXCR4 Targeting <sup>68</sup> Ga-Based Radiopharmaceuticals. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (3), 752–761. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00689>.
- (20) De Silva, R. A.; Peyre, K.; Pullambhatla, M.; Fox, J. J.; Pomper, M. G.; Nimmagadda, S. Imaging CXCR4 Expression in Human Cancer Xenografts: Evaluation of Monocyclam <sup>64</sup> Cu-AMD3465. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52* (6), 986–993. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.085613>.
- (21) Debnath, B.; Xu, S.; Grande, F.; Garofalo, A.; Neamati, N. Small Molecule Inhibitors of CXCR4. *Theranostics* **2013**, *3* (1), 47–75. <https://doi.org/10.7150/thno.5376>.
- (22) Ueda, S.; Kato, M.; Inuki, S.; Ohno, H.; Evans, B.; Wang, Z.; Peiper, S. C.; Izumi, K.; Kodama, E.; Matsuoka, M.; Nagasawa, H.; Oishi, S.; Fujii, N. Identification of Novel Non-Peptide CXCR4 Antagonists by Ligand-Based Design Approach. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *18* (14), 4124–4129. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.05.092>.
- (23) Moyle, G.; DeJesus, E.; Boffito, M.; Wong, R. S.; Gibney, C.; Badel, K.; MacFarland, R.; Calandra, G.; Bridger, G.; Becker, S.; X4 Antagonist Concept Trial Study Team. Proof of Activity with AMD11070, an Orally Bioavailable Inhibitor of CXCR4-Tropic HIV Type 1. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48* (6), 798–805. <https://doi.org/10.1086/597097>.
- (24) Wilkinson, R. A.; Pincus, S. H.; Shepard, J. B.; Walton, S. K.; Bergin, E. P.; Labib, M.; Teintze, M. Novel Compounds Containing Multiple Guanide Groups That Bind the HIV Coreceptor CXCR4. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55* (1), 255–263. <https://doi.org/10.1128/AAC.00709-10>.
- (25) Tamamura, H.; Xu, Y.; Hattori, T.; Zhang, X.; Arakaki, R.; Kanbara, K.; Omagari, A.; Otaka, A.; Ibuka, T.; Yamamoto, N.; Nakashima, H.; Fujii, N. A Low-Molecular-Weight Inhibitor against the Chemokine Receptor CXCR4: A Strong Anti-HIV Peptide T140. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *253* (3), 877–882. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9871>.
- (26) Tamamura, H.; Omagari, A.; Oishi, S.; Kanamoto, T.; Yamamoto, N.; Peiper, S. C.; Nakashima, H.; Otaka, A.; Fujii, N. Pharmacophore Identification of a Specific CXCR4 Inhibitor, T140, Leads to Development of Effective Anti-HIV Agents with Very High Selectivity Indexes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *5*.
- (27) Jacobson, O.; Weiss, I. D.; Kieseewetter, D. O.; Farber, J. M.; Chen, X. PET of Tumor CXCR4 Expression with 4- <sup>18</sup> F-T140. *J Nucl Med* **2010**, *51* (11), 1796–1804. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.079418>.
- (28) Hennrich, U.; Seyler, L.; Schäfer, M.; Bauder-Wüst, U.; Eisenhut, M.; Semmler, W.; Bäuerle, T. Synthesis and in Vitro Evaluation of <sup>68</sup>Ga-DOTA-4-FBn-TN14003, a Novel Tracer for the Imaging of CXCR4 Expression. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (4), 1502–1510. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.12.052>.
- (29) Hanaoka, H.; Mukai, T.; Tamamura, H.; Mori, T.; Ishino, S.; Ogawa, K.; Iida, Y.; Doi, R.; Fujii, N.; Saji, H. Development of a <sup>111</sup>In-Labeled Peptide Derivative Targeting a Chemokine Receptor, CXCR4, for Imaging Tumors. *Nucl. Med. Biol.* **2006**, *33* (4), 489–494. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2006.01.006>.
- (30) Han, Y.; Yin, D.; Zheng, M.; Zhou, W.; Lee, Z.; Zhan, L.; Ma, Y.; Wu, M.; Shi, L.; Wang, N.;

Lee, J.; Wang, C.; Lee, Z.; Wang, Y. Synthesis and Preliminary Evaluation of a Novel <sup>125</sup>I-Labeled T140 Analog for Quantitation of CXCR4 Expression. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2010**, *284* (2), 279–286. <https://doi.org/10.1007/s10967-010-0484-x>.

(31) Fujii, N.; Oishi, S.; Hiramatsu, K.; Araki, T.; Ueda, S.; Tamamura, H.; Otaka, A.; Kusano, S.; Terakubo, S.; Nakashima, H.; Broach, J. A.; Trent, J. O.; Wang, Z.; Peiper, S. C. Molecular-Size Reduction of a Potent CXCR4-Chemokine Antagonist Using Orthogonal Combination of Conformation- and Sequence-Based Libraries. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42* (28), 3251–3253. <https://doi.org/10.1002/anie.200351024>.

(32) Ueda, S.; Oishi, S.; Wang, Z.; Araki, T.; Tamamura, H.; Cluzeau, J.; Ohno, H.; Kusano, S.; Nakashima, H.; Trent, J. O.; Peiper, S. C.; Fujii, N. Structure–Activity Relationships of Cyclic Peptide-Based Chemokine Receptor CXCR4 Antagonists: Disclosing the Importance of Side-Chain and Backbone Functionalities. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (2), 192–198. <https://doi.org/10.1021/jm0607350>.

(33) Åberg, O.; Pisaneschi, F.; Smith, G.; Nguyen, Q.-D.; Stevens, E.; Aboagye, E. O. <sup>18</sup>F- Labelling of a Cyclic Pentapeptide Inhibitor of the Chemokine Receptor CXCR4. *Journal of Fluorine Chemistry* **2012**, *135*, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2011.11.003>.

(34) Demmer, O.; Frank, A. O.; Hagn, F.; Schottelius, M.; Marinelli, L.; Cosconati, S.; Brack-Werner, R.; Kremb, S.; Wester, H.-J.; Kessler, H. A Conformationally Frozen Peptoid Boosts CXCR4 Affinity and Anti-HIV Activity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (32), 8110–8113. <https://doi.org/10.1002/anie.201202090>.

(35) Demmer, O.; Gourni, E.; Schumacher, U.; Kessler, H.; Wester, H.-J. PET Imaging of CXCR4 Receptors in Cancer by a New Optimized Ligand. *ChemMedChem* **2011**, *6* (10), 1789–1791. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201100320>.

(36) Lapa, C.; Lückerrath, K.; Kleinlein, I.; Monoranu, C. M.; Linsenmann, T.; Kessler, A. F.; Rudelius, M.; Kropf, S.; Buck, A. K.; Ernestus, R.-I.; Wester, H.-J.; Löhr, M.; Herrmann, K. <sup>68</sup>Ga-Pentixafor-PET/CT for Imaging of Chemokine Receptor 4 Expression in Glioblastoma. *Theranostics* **2016**, *6* (3), 428–434. <https://doi.org/10.7150/thno.13986>.

(37) Weiberg, D.; Thackeray, J. T.; Daum, G.; Sohns, J. M.; Kropf, S.; Wester, H.-J.; Ross, T. L.; Bengel, F. M.; Derlin, T. Clinical Molecular Imaging of Chemokine Receptor CXCR4 Expression in Atherosclerotic Plaque Using <sup>68</sup>Ga-Pentixafor PET: Correlation with Cardiovascular Risk Factors and Calcified Plaque Burden. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (2), 266–272. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.196485>.

(38) Maurer, S.; Herhaus, P.; Lippenmeyer, R.; Hänscheid, H.; Kircher, M.; Schirbel, A.; Maurer, H. C.; Buck, A. K.; Wester, H.-J.; Einsele, H.; Grigoleit, G.-U.; Keller, U.; Lapa, C. Side Effects of CXC-Chemokine Receptor 4-Directed Endoradiotherapy with Pentixather Before Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J. Nucl. Med.* **2019**, *60* (10), 1399–1405. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.223420>.

(39) Quail, D. F.; Joyce, J. A. Microenvironmental Regulation of Tumor Progression and Metastasis. *Nat. Med.* **2013**, *19* (11), 1423–1437. <https://doi.org/10.1038/nm.3394>.

(40) Zhou, Z.; Lu, Z.-R. Molecular Imaging of the Tumor Microenvironment. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2017**, *113*, 24–48.

(41) Treps, L.; Gavard, J. L'angiogenèse tumorale: Quand l'arbre de vie tourne mal. *M. S-Med. Sci.* **2015**, *31* (11), 989–995. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153111013>.

(42) Avraamides et al. - 2008 - Integrins in Angiogenesis and Lymphangiogenesis.Pdf.

(43) Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E. Cell Attachment Activity of Fibronectin Can Be Duplicated by Small Synthetic Fragments of the Molecule. *Nature* **1984**, *309* (5963), 30–33. <https://doi.org/10.1038/309030a0>.

- (44) Liu, Z.; Yan, Y.; Liu, S.; Wang, F.; Chen, X.  $^{18}\text{F}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ , and  $^{68}\text{Ga}$  Labeled RGD-Bombesin Heterodimeric Peptides for PET Imaging of Breast Cancer. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20* (5), 1016–1025. <https://doi.org/10.1021/bc9000245>.
- (45) Peiris, P. M.; Toy, R.; Doolittle, E.; Pansky, J.; Abramowski, A.; Tam, M.; Vicente, P.; Tran, E.; Hayden, E.; Camann, A.; Mayer, A.; Erokwu, B. O.; Berman, Z.; Wilson, D.; Baskaran, H.; Flask, C. A.; Keri, R. A.; Karathanasis, E. Imaging Metastasis Using an Integrin-Targeting Chain-Shaped Nanoparticle. *ACS Nano* **2012**, *6* (10), 8783–8795. <https://doi.org/10.1021/nn303833p>.
- (46) Chen, H.; Niu, G.; Wu, H.; Chen, X. Clinical Application of Radiolabeled RGD Peptides for PET Imaging of Integrin  $\alpha_v\beta_3$ . *Theranostics* **2016**, *6* (1), 78–92. <https://doi.org/10.7150/thno.13242>.
- (47) Park, Y. D.; Park, J.-E.; Kim, H. S.; Choi, S.-H.; Park, J. E.; Jeon, J.; Park, S.-H. Development of a Squaraine-Based Molecular Probe for Dual-Modal *in Vivo* Fluorescence and Photoacoustic Imaging. *Bioconjugate Chem.* **2020**, *31* (11), 2607–2617. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00533>.
- (48) Santos, A. M.; Jung, J.; Aziz, N.; Kissil, J. L.; Puré, E. Targeting Fibroblast Activation Protein Inhibits Tumor Stromagenesis and Growth in Mice. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119* (12), 3613–3625. <https://doi.org/10.1172/JCI38988>.
- (49) Niedermeyer, J.; Kriz, M.; Hilberg, F.; Garin-Chesa, P.; Bamberger, U.; Lenter, M. C.; Park, J.; Viertel, B.; Püschner, H.; Mauz, M.; Rettig, W. J.; Schnapp, A. Targeted Disruption of Mouse Fibroblast Activation Protein. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20* (3), 1089–1094. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.3.1089-1094.2000>.
- (50) Mathew, S.; Scanian, M. J.; Mohan Raj, B. K.; Murty, V. V. V. S.; Garin-Chesa, P.; Old, L. J.; Rettig, W. J.; Chaganti, S. K. The Gene for Fibroblast Activation Protein (FAP), a Putative Cell Surface-Bound Serine Protease Expressed in Cancer Stroma and Wound Healing, Maps to Chromosome Band 2q23. *Genomics* **1994**, *25*, 335–337.
- (51) Acharya, P. S.; Zukas, A.; Chandan, V.; Katzenstein, A.-L. A.; Puré, E. Fibroblast Activation Protein: A Serine Protease Expressed at the Remodeling Interface in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Hum. Pathol.* **2006**, *37* (3), 352–360. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2005.11.020>.
- (52) Levy, M. T.; McCaughan, G. W.; Abbott, C. A.; Park, J. E.; Cunningham, A. M.; Müller, E.; Rettig, W. J.; Gorrell, M. D. Fibroblast Activation Protein: A Cell Surface Dipeptidyl Peptidase and Gelatinase Expressed by Stellate Cells at the Tissue Remodelling Interface in Human Cirrhosis: Fibroblast Activation Protein: A Cell Surface Dipeptidyl Peptidase and Gelatinase Expressed by Stellate Cells at the Tissue Remodelling Interface in H. *Hepatology* **1999**, *29* (6), 1768–1778. <https://doi.org/10.1002/hep.510290631>.
- (53) Welt, S.; Divgi, C. R.; Scott, A. M.; Garin-Chesa, P.; Finn, R. D.; Graham, M.; Carswell, E. A.; Cohen, A.; Larson, S. M.; Old, L. J. Antibody Targeting in Metastatic Colon Cancer: A Phase I Study of Monoclonal Antibody F19 against a Cell-Surface Protein of Reactive Tumor Stromal Fibroblasts. *J. Clin. Oncol.* **1994**, *12* (6), 1193–1203. <https://doi.org/10.1200/JCO.1994.12.6.1193>.
- (54) Scott, A. M.; Wiseman, G.; Adjei, A.; Lee, F.-T.; Hopkins, W.; Divgi, C. R.; Hanson, L. H.; Mitchell, P.; Gansen, D. N.; Larson, S. M.; Ingle, J. N.; Hoffman, E. W.; Tanswell, P.; Ritter, G.; Cohen, L. S.; Bette, P.; Arvay, L.; Amelsberg, A.; Vlock, D.; Rettig, W. J.; Old, L. J. A Phase I Dose-Escalation Study of Sibrotuzumab in Patients with Advanced or Metastatic Fibroblast Activation Protein-Positive Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 1639–1647.
- (55) Pandya, D. N.; Sinha, A.; Yuan, H.; Mutkus, L.; Stumpf, K.; Marini, F. C.; Wadas, T. J. Imaging of Fibroblast Activation Protein Alpha Expression in a Preclinical Mouse Model of Glioma Using Positron Emission Tomography. *Molecules* **2020**, *25* (16), 3672.

<https://doi.org/10.3390/molecules25163672>.

(56) Hintz, H. M.; Gallant, J. P.; Vander Griend, D. J.; Coleman, I. M.; Nelson, P. S.; LeBeau, A. M. Imaging Fibroblast Activation Protein Alpha Improves Diagnosis of Metastatic Prostate Cancer with Positron Emission Tomography. *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26* (18), 4882–4891. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-1358>.

(57) Osterkamp, F. Z. D.; Schneider, E.; Haase, C.; Paschke, M.; Höhne, A.; Ungewiss, J.; Smerling, C.; Reineke, U.; Bredenbeck, A. Compounds Comprising a Fibroblast Activation Protein Ligand and Use Thereof. *WO2021005131A1* **2021**. <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/071409440/publication/WO2021005131A1?q=WO2021005131A1>.

(58) Zboralski, D.; Hoehne, A.; Bredenbeck, A.; Schumann, A.; Nguyen, M.; Schneider, E.; Ungewiss, J.; Paschke, M.; Haase, C.; von Hacht, J. L.; Kwan, T.; Lin, K. K.; Lenore, J.; Harding, T. C.; Xiao, J.; Simmons, A. D.; Mohan, A.-M.; Beindorff, N.; Reineke, U.; Smerling, C.; Osterkamp, F. Preclinical Evaluation of FAP-2286 for Fibroblast Activation Protein Targeted Radionuclide Imaging and Therapy. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2022**. <https://doi.org/10.1007/s00259-022-05842-5>.

(59) Comparison of 68Ga-FAP-2286 and 18F-FDG PET/CT in Patients With Various Types of Cancer. *ClinicalTrials.gov* **2022**, *NCT05392205*.

(60) A Study of 177Lu-FAP-2286 in Advanced Solid Tumors (LuMIERE) (LuMIERE). *ClinicalTrials.gov* **2021**, *NCT04939610*.

(61) Imaging of Solid Tumors Using 68Ga-FAP-2286. *ClinicalTrials.gov* **2020**, *NCT04621435*.

(62) Imaging of Pathologic Fibrosis Using 68Ga-FAP-2286. *ClinicalTrials.gov* **2021**, *NCT05180162*.

(63) Jansen, K.; Heirbaut, L.; Cheng, J. D.; Joossens, J.; Ryabtsova, O.; Cos, P.; Maes, L.; Lambeir, A.-M.; De Meester, I.; Augustyns, K.; Van der Veken, P. Selective Inhibitors of Fibroblast Activation Protein (FAP) with a (4-Quinolinoyl)-Glycyl-2-Cyanopyrrolidine Scaffold. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4* (5), 491–496. <https://doi.org/10.1021/ml300410d>.

(64) Jansen, K.; Heirbaut, L.; Verkerk, R.; Cheng, J. D.; Joossens, J.; Cos, P.; Maes, L.; Lambeir, A.-M.; De Meester, I.; Augustyns, K.; Van der Veken, P. Extended Structure–Activity Relationship and Pharmacokinetic Investigation of (4-Quinolinoyl)Glycyl-2-Cyanopyrrolidine Inhibitors of Fibroblast Activation Protein (FAP). *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (7), 3053–3074. <https://doi.org/10.1021/jm500031w>.

(65) Van der Veken, P.; De Meester, I.; Dubois, V.; Soroka, A.; Van Goethem, S.; Maes, M.-B.; Brandt, I.; Lambeir, A.-M.; Chen, X.; Haemers, A.; Scharpé, S.; Augustyns, K. Inhibitors of Dipeptidyl Peptidase 8 and Dipeptidyl Peptidase 9. Part 1: Identification of Dipeptide Derived Leads. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (14), 4154–4158. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.05.080>.

(66) Villhauer, E. B.; Brinkman, J. A.; Naderi, G. B.; Burkey, B. F.; Dunning, B. E.; Prasad, K.; Mangold, B. L.; Russell, M. E.; Hughes, T. E. 1-[[[(3-Hydroxy-1-Adamantyl)Amino]Acetyl]-2-Cyano-(S)-Pyrrolidine: A Potent, Selective, and Orally Bioavailable Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor with Antihyperglycemic Properties. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (13), 2774–2789. <https://doi.org/10.1021/jm030091l>.

(67) Loktev, A.; Lindner, T.; Mier, W.; Debus, J.; Altmann, A.; Jäger, D.; Giesel, F.; Kratochwil, C.; Barthe, P.; Roumestand, C.; Haberkorn, U. A Tumor-Imaging Method Targeting Cancer-Associated Fibroblasts. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (9), 1423–1429. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.210435>.

(68) Lindner, T.; Loktev, A.; Altmann, A.; Giesel, F.; Kratochwil, C.; Debus, J.; Jäger, D.; Mier,



W.; Haberkorn, U. Development of Quinoline-Based Theranostic Ligands for the Targeting of Fibroblast Activation Protein. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (9), 1415–1422. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.210443>.

(69) Liu, H.; Liu, L.; Chen, L.; Zhao, Y.; Zhang, W.; Cai, L.; Chen, Y. [68Ga]Ga-DOTA-FAPI-04 PET/CT Imaging of Benign Pulmonary Solitary Fibrous Tumour. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2021**, *48* (6), 2053–2054. <https://doi.org/10.1007/s00259-021-05199-1>.

(70) Kessler, L.; Ferdinandus, J.; Hirmas, N.; Bauer, S.; Dirksen, U.; Zarrad, F.; Nader, M.; Chodyla, M.; Milosevic, A.; Umutlu, L.; Schuler, M.; Podleska, L. E.; Schildhaus, H.-U.; Fendler, W. P.; Hamacher, R. <sup>68</sup> Ga-FAPI as a Diagnostic Tool in Sarcoma: Data from the <sup>68</sup> Ga-FAPI PET Prospective Observational Trial. *J. Nucl. Med.* **2022**, *63* (1), 89–95. <https://doi.org/10.2967/jnumed.121.262096>.

(71) Wang, H.; Zhu, W.; Ren, S.; Kong, Y.; Huang, Q.; Zhao, J.; Guan, Y.; Jia, H.; Chen, J.; Lu, L.; Xie, F.; Qin, L. 68Ga-FAPI-04 Versus 18F-FDG PET/CT in the Detection of Hepatocellular Carcinoma. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 693640. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.693640>.

(72) 68Ga-FAPI-04 and 18F-FDG PET/CT in Patients With Epithelial Ovarian Cancer: Compared With Histological Findings. *ClinicalTrials.gov* **2020**, *NCT04504110*.

(73) 68Ga-FAPI PET/CT in Liver Fibrosis Patients (GFAPILF). *ClinicalTrials.gov* **2020**, *NCT04533828*.

(74) 68Ga-FAPI-04 PET/CT for the Detection of Oral Carcinoma. *ClinicalTrials.gov* **2021**, *NCT05003427*.

(75) Novruzov, E.; Dendl, K.; Ndlovu, H.; Choyke, P. L.; Dabir, M.; Beu, M.; Novruzov, F.; Mehdi, E.; Guliyev, F.; Koerber, S. A.; Lawal, I.; Niegisch, G.; Debus, J.; Haberkorn, U.; Sathekge, M.; Giesel, F. L. Head-to-Head Intra-Individual Comparison of [68Ga]-FAPI and [18F]-FDG PET/CT in Patients with Bladder Cancer. *Mol. Imaging Biol.* **2022**, *24* (4), 651–658. <https://doi.org/10.1007/s11307-022-01715-3>.

(76) Giesel, F. L.; Kratochwil, C.; Schlittenhardt, J.; Dendl, K.; Eiber, M.; Staudinger, F.; Kessler, L.; Fendler, W. P.; Lindner, T.; Koerber, S. A.; Cardinale, J.; Sennung, D.; Roehrich, M.; Debus, J.; Sathekge, M.; Haberkorn, U.; Calais, J.; Serfling, S.; Buck, A. L. Head-to-Head Intra-Individual Comparison of Biodistribution and Tumor Uptake of 68Ga-FAPI and 18F-FDG PET/CT in Cancer Patients. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2021**, *48* (13), 4377–4385. <https://doi.org/10.1007/s00259-021-05307-1>.

(77) Loktev, A.; Lindner, T.; Burger, E.-M.; Altmann, A.; Giesel, F.; Kratochwil, C.; Debus, J.; Marmé, F.; Jäger, D.; Mier, W.; Haberkorn, U. Development of Fibroblast Activation Protein–Targeted Radiotracers with Improved Tumor Retention. *J. Nucl. Med.* **2019**, *60* (10), 1421–1429. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.224469>.

(78) Assadi, M.; Rekabpour, S. J.; Jafari, E.; Divband, G.; Nikkholgh, B.; Amini, H.; Kamali, H.; Ebrahimi, S.; Shakibzad, N.; Jokar, N.; Nabipour, I.; Ahmadzadehfar, H. Feasibility and Therapeutic Potential of <sup>177</sup>Lu–Fibroblast Activation Protein Inhibitor–46 for Patients With Relapsed or Refractory Cancers: A Preliminary Study. *Clin. Nucl. Med.* **2021**, *46* (11), e523–e530. <https://doi.org/10.1097/RLU.00000000000003810>.

(79) Fendler, W. P.; Pabst, K. M.; Kessler, L.; Fragoso Costa, P.; Ferdinandus, J.; Weber, M.; Lippert, M.; Lueckerath, K.; Umutlu, L.; Kostbade, K.; Mavroei, I. A.; Schuler, M.; Ahrens, M.; Rischpler, C.; Bauer, S.; Herrmann, K.; Siveke, J. T.; Hamacher, R. Safety and Efficacy of <sup>90</sup>Y-FAPI-46 Radioligand Therapy in Patients with Advanced Sarcoma and Other Cancer Entities. *Clin. Cancer Res.* **2022**, *ccr.22.1432*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-1432>.

(80) Meyer, C.; Dahlbom, M.; Lindner, T.; Vauclin, S.; Mona, C.; Slavik, R.; Czernin, J.; Haberkorn, U.; Calais, J. Radiation Dosimetry and Biodistribution of <sup>68</sup> Ga-FAPI-46 PET Imaging

- in Cancer Patients. *J. Nucl. Med.* **2020**, *61* (8), 1171–1177. <https://doi.org/10.2967/jnumed.119.236786>.
- (81) Lindner, T.; Giesel, F. L.; Kratochwil, C.; Serfling, S. E. Radioligands Targeting Fibroblast Activation Protein (FAP). *Cancers* **2021**, *13* (22), 5744. <https://doi.org/10.3390/cancers13225744>.
- (82) Lindner, T.; Altmann, A.; Giesel, F.; Kratochwil, C.; Kleist, C.; Krämer, S.; Mier, W.; Cardinale, J.; Kauczor, H.-U.; Jäger, D.; Debus, J.; Haberkorn, U. 18F-Labeled Tracers Targeting Fibroblast Activation Protein. *EJNMMI radiopharm. chem.* **2021**, *6* (1), 26. <https://doi.org/10.1186/s41181-021-00144-x>.
- (83) Giesel, F. L.; Adeberg, S.; Syed, M.; Lindner, T.; Jiménez-Franco, L. D.; Mavriopoulou, E.; Staudinger, F.; Tonndorf-Martini, E.; Regnery, S.; Rieken, S.; El Shafie, R.; Röhrich, M.; Flechsig, P.; Kluge, A.; Altmann, A.; Debus, J.; Haberkorn, U.; Kratochwil, C. FAPI-74 PET/CT Using Either <sup>18</sup>F-AIF or Cold-Kit <sup>68</sup>Ga Labeling: Biodistribution, Radiation Dosimetry, and Tumor Delineation in Lung Cancer Patients. *J. Nucl. Med.* **2021**, *62* (2), 201–207. <https://doi.org/10.2967/jnumed.120.245084>.
- (84) Jiang, X.; Wang, X.; Shen, T.; Yao, Y.; Chen, M.; Li, Z.; Li, X.; Shen, J.; Kou, Y.; Chen, S.; Zhou, X.; Luo, Z.; Cheng, Z. FAPI-04 PET/CT Using [<sup>18</sup>F]AIF Labeling Strategy: Automatic Synthesis, Quality Control, and In Vivo Assessment in Patient. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 649148. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.649148>.
- (85) Hidai, Y.; Kan, T.; Fukuyama, T. Total Synthesis of Polyamine Toxin HO-416b Utilizing the 2-Nitrobenzenesulfonamide Protecting Group. *Tet. Lett.* **1999**, *40* (25), 4711–4714. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(99\)00851-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(99)00851-5).
- (86) Chatterjee, J.; Laufer, B.; Kessler, H. Synthesis of N-Methylated Cyclic Peptides. *Nat. Protoc.* **2012**, *7* (3), 432–444. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.450>.
- (87) Bycroft, B. W.; Chan, W. C.; Chhabra, S. R.; Hone, N. D. A Novel Lysine-Protecting Procedure for Continuous Flow Solid Phase Synthesis of Branched Peptides. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, No. 9, 778. <https://doi.org/10.1039/c39930000778>.
- (88) Vinokurov, V. A.; Gaevoi, E. G.; Polivin, Yu. N.; Karakhanov, R. A. Activation of Nitriles by Trifluoroacetic Acid in Exchange Reactions of Functional Groups. *React. Kinet. Catal. Lett.* **1989**, *40* (2), 313–317. <https://doi.org/10.1007/BF02073810>.
- (89) Moorthy, J. N.; Singhal, N. Facile and Highly Selective Conversion of Nitriles to Amides via Indirect Acid-Catalyzed Hydration Using TFA or AcOH–H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (5), 1926–1929. <https://doi.org/10.1021/jo048240a>.

**Caractérisation des  
interactions ligand-récepteur  
par imagerie de cellules  
vivantes**



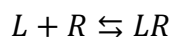
## Table des matières

<b>I. Introduction .....</b>	<b>181</b>
<b>1. Généralités .....</b>	<b>181</b>
<b>2. Méthode conventionnelle : utilisation de radioligands.....</b>	<b>182</b>
A. Estimation de la constante de dissociation par saturation du récepteur.....	182
B. Estimation de la constante de dissociation par compétition avec un ligand marqué .....	184
<b>3. Objectifs du projet.....</b>	<b>185</b>
<b>II. Synthèse des ligands fluorescents de référence .....</b>	<b>187</b>
<b>1. Synthèse de la cyanine-5 disulfonaté 57.....</b>	<b>189</b>
<b>2. Synthèse des composés de référence fluorescents.....</b>	<b>190</b>
A. Synthèse des dérivés fluorescents de JMV594.....	190
a. H-PEG <sub>4</sub> -JMV594 ( <b>58</b> ) .....	190
b. Couplage entre les composés <b>57</b> et <b>58</b> : synthèse de Cy5-PEG <sub>4</sub> -JMV594 ( <b>59</b> ).....	190
c. Couplage entre le composé <b>58</b> et la fluorescéine : synthèse de Fluorescéine-PEG <sub>4</sub> -JMV594 ( <b>60</b> )	191
B. Synthèse des dérivés fluorescents de KuE.....	193
a. KuE-PEG <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> ( <b>61</b> ) et KuE( <sup>t</sup> Bu) <sub>3</sub> -PEG <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> ( <b>62</b> ) .....	193
KuE-PEG <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> ( <b>61</b> ) .....	193
KuE( <sup>t</sup> Bu) <sub>3</sub> -PEG <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> ( <b>62</b> ) .....	193
b. Couplage entre le composé <b>62</b> et la fluorescéine : Synthèse de KuE-PEG <sub>4</sub> -fluorescéine ( <b>63</b> ) ....	193
c. Couplage entre les composés <b>61</b> et <b>57</b> : Synthèse de KuE-PEG <sub>4</sub> -Cy5 ( <b>64</b> ) .....	194
C. Synthèse de [N-Me-D-Orn <sup>2</sup> ]FC131-PEG <sub>4</sub> -Cy5 .....	195
d. Synthèse de [N-Me-D-Orn <sup>2</sup> ]FC131-PEG <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> ( <b>65</b> ) .....	195
e. Couplage entre les composés <b>57</b> et <b>65</b> : synthèse de [N-Me-D-Orn <sup>2</sup> ]FC131-PEG <sub>4</sub> -Cy5 ( <b>66</b> ).....	195
<b>III. Développement de la méthode de mesure.....</b>	<b>197</b>
<b>3. Essais cinétiques .....</b>	<b>197</b>
D. Généralités .....	197
E. Détermination de t <sub>1/2</sub> du composé <b>59</b> .....	197
<b>4. Détermination du K<sub>D</sub> du composé 59 pour GRPR .....</b>	<b>199</b>
F. Protocole .....	199
G. Résultats .....	201
<b>5. Détermination du K<sub>i</sub> de la bombésine par compétition contre le conjugué 59 .....</b>	<b>202</b>
H. Protocole .....	202
I. Résultats .....	203
<b>6. Détermination de l'affinité du composé 59 pour GRPR sur cellules PC3-pip .....</b>	<b>204</b>
<b>Conclusions et perspectives.....</b>	<b>206</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>208</b>

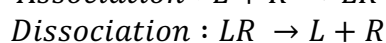
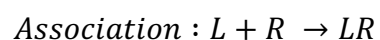
## I. Introduction

### 1. Généralités

L'interaction entre un ligand et son récepteur peut être assimilée à un équilibre bimoléculaire tel qu'indiqué dans l'équation de réaction ci-dessous<sup>1</sup>.



Cet équilibre peut être décomposé en deux équations de réactions différentes : la réaction d'association qui correspond à la liaison entre le ligand et son récepteur et la réaction de dissociation qui correspond à la séparation de ces deux éléments.



Ces deux réactions sont définies par deux constantes cinétiques : la constante cinétique d'association et la constante cinétique de dissociation.

$$\text{cinétique d'association} = k_+[L][R]$$

$$\text{cinétique de dissociation} = k_-[LR]$$

La vitesse d'association dépend de la constante cinétique d'association  $k_+$  (encore appelée  $k_{on}$ ), en raison du caractère bimoléculaire de l'association. Il s'agit d'une constante d'ordre 2 dont l'unité s'exprime en  $M^{-1}.s^{-1}$ .  $[L]$  et  $[R]$  sont quant à eux les concentrations en ligand et en récepteur libre à un moment  $t$ .

En revanche, la réaction de dissociation ne dépend que de la concentration,  $[LR]$ , en complexe ligand-récepteur. Par conséquent, la constante cinétique de dissociation  $k_-$  (encore appelée  $k_{off}$ ) est dite d'ordre 1 et est exprimée en  $s^{-1}$ . Le temps de résidence, évoqué dans le chapitre 1 et suspecté comme étant le paramètre responsable de la supériorité de certains ligands hétérobivalents par rapport aux ligands monovalents, est l'inverse de  $k_-$  et est exprimé en  $s$ .

Par définition, l'équilibre thermodynamique est atteint lorsque le système est stable et donc lorsque la cinétique d'association est égale à la cinétique de dissociation.

$$k_-[LR]_{\acute{e}q} = k_+[L]_{\acute{e}q}[R]_{\acute{e}q}$$

La constante d'équilibre  $K_A$  (ou constante d'association), exprimée en  $M^{-1}$ , quantifie l'affinité d'un ligand pour son récepteur et est définie par le rapport ci-dessous. Plus la constante d'association est élevée, plus la concentration du complexe ligand-récepteur à l'équilibre est supérieure au produit des concentrations en ligands et récepteurs libres à l'équilibre et donc plus le ligand est affiné de son récepteur.

$$K_A = \frac{k_+}{k_-} = \frac{[LR]_{\acute{e}q}}{[L]_{\acute{e}q}[R]_{\acute{e}q}}$$

Par convenance, il est d'usage d'exprimer les affinités en utilisant la constante de dissociation  $K_D$  (exprimée en M) qui est l'inverse de la constante d'association.

$$K_D = \frac{1}{K_A} = \frac{k_-}{k_+} = \frac{[L]_{\text{éq}}[R]_{\text{éq}}}{[LR]_{\text{éq}}}$$

À l'inverse de la constante d'association, plus la constante de dissociation diminue, plus l'affinité du ligand pour son récepteur augmente.

Afin d'évaluer l'affinité d'un ligand pour son récepteur expérimentalement, il faut donc déterminer les concentrations en ligand libre, récepteur libre et complexe ligand-récepteur à l'équilibre thermodynamique<sup>1</sup>.

## 2. Méthode conventionnelle : utilisation de radioligands

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, les méthodes les plus largement utilisées pour déterminer la constante de dissociation d'un ligand pour son récepteur nécessitent, le plus souvent, l'utilisation de ligands marqués avec un radionucléide<sup>2-6</sup>. Les deux techniques les plus répandues, que nous développerons dans cette introduction, sont : la détermination de la constante de dissociation par saturation et, de manière indirecte, par compétition<sup>7</sup>.

### A. Estimation de la constante de dissociation par saturation du récepteur

L'objet d'une expérience de saturation est de soumettre une quantité fixe de récepteur à un gradient de concentration de son ligand radiomarqué pendant un temps d'incubation suffisant pour atteindre l'équilibre thermodynamique<sup>8</sup>. À mesure que la concentration en radioligand augmente, la fraction de récepteurs liés à ce dernier de manière spécifique,  $f_l$ , augmente également jusqu'à atteindre un maximum appelé  $B_{max}$  qui correspond au taux d'occupation maximal des récepteurs par un radioligand donné. On peut donc définir la fraction  $f_l$  par l'équation ci-dessous.

$$f_l = \frac{[LR]_{\text{éq}}}{B_{max}} = \frac{[LR]_{\text{éq}}}{[R]_{\text{éq}} + [LR]_{\text{éq}}}$$

Or, à l'aide la formule du  $K_D$  que nous avons introduite dans le paragraphe précédent, nous pouvons définir  $[R]_{\text{éq}}$  en fonction de  $K_D$  :

$$[R]_{\text{éq}} = \frac{K_D [LR]_{\text{éq}}}{[L]_{\text{éq}}}$$

Si nous combinons maintenant les deux équations précédentes, on obtient  $f_l$  en fonction de  $K_D$ .

$$f_l = \frac{1}{\frac{K_D}{[L]_{\acute{e}q}} + 1}$$

De cette équation, on remarque que lorsque  $f_l = 0,5$  c'est-à-dire que  $[LR]_{\acute{e}q} = \frac{B_{max}}{2}$  alors  $K_D = [L]_{\acute{e}q}$ . La mesure du  $K_D$  revient donc à déterminer la concentration  $[L]_{\acute{e}q}$  pour laquelle la moitié des récepteurs sont occupés par le ligand.

Expérimentalement, après incubation d'un nombre fixe de cellules exprimant le récepteur d'intérêt avec un gradient de concentration en radioligand à étudier, le surnageant contenant le ligand marqué non lié est séparé des cellules. Dans des conditions où l'internalisation des récepteurs est limitée, la radioactivité restante (proportionnelle au nombre de moles de ligands liés au récepteur) est ensuite mesurée à l'aide d'un compteur  $\gamma$  (Figure 120).

☪ = récepteur d'intérêt

☢ = radioligand

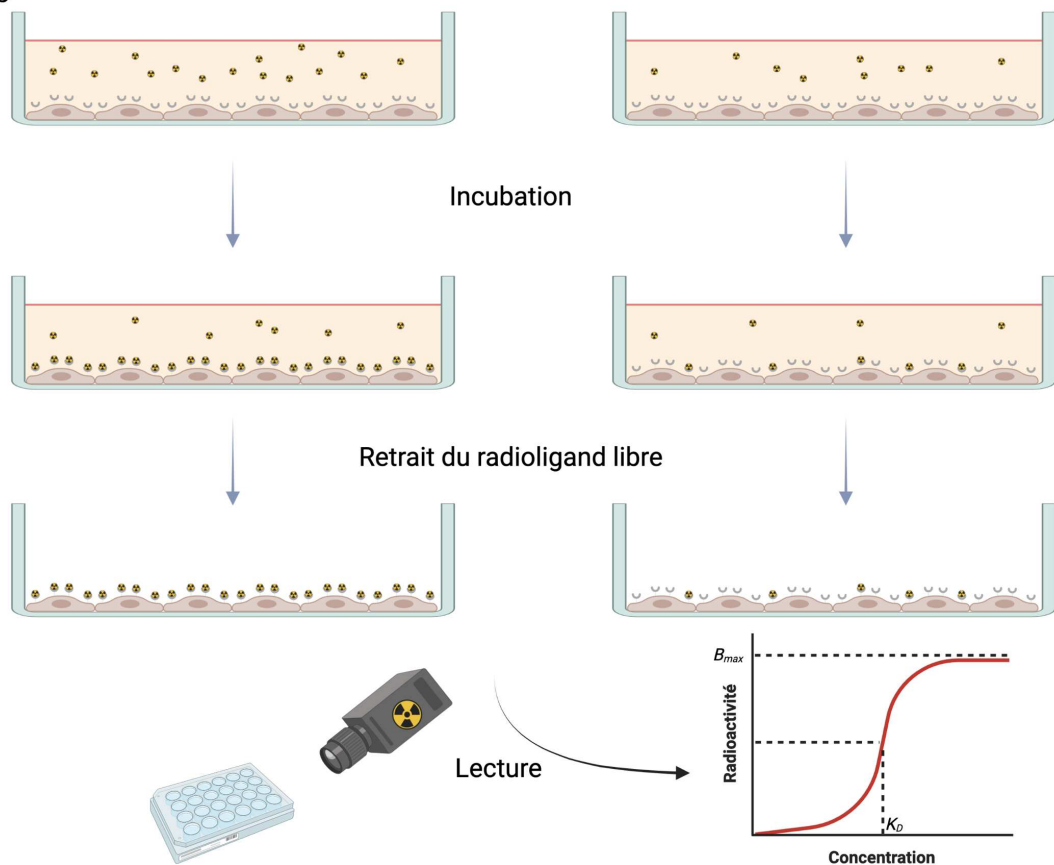


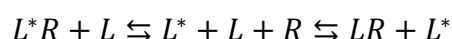
Figure 120 : Schéma représentatif d'une expérience de détermination d'affinité ( $K_D$ ) d'un radioligand pour son récepteur. À gauche, exemple d'une concentration en ligand saturant le récepteur. À droite, exemple d'une concentration ne saturant pas le récepteur.

Cependant, l'incubation d'un radioligand avec des cellules surexprimant un récepteur d'intérêt génère également une proportion non négligeable de signal non spécifique. Pour pallier ce problème, il est nécessaire de réaliser des expériences supplémentaires dites de blocage (blocking) qui consistent à co-incuber le radioligand d'intérêt avec un large excès de ligand non marqué de sorte qu'aucun ligand marqué ne se lie au récepteur d'intérêt. Ainsi, tout le signal observé lors de ces expériences est dit non spécifique. Il est nécessaire de retrancher ce signal

non spécifique aux résultats obtenus précédemment afin d'obtenir une courbe ne prenant en compte que le signal spécifique<sup>9</sup>.

## B. Estimation de la constante de dissociation par compétition avec un ligand marqué

Lorsque l'on souhaite déterminer un  $K_D$  en utilisant la méthode par compétition, un gradient de concentration en ligand  $L$  dont on souhaite obtenir la constante de dissociation est incubé avec un nombre fixe de récepteurs et une concentration fixe en ligand marqué  $L^*$ . Lors de cette expérience, il faut tenir compte des deux équilibres suivants :



Cheng et Prusoff ont proposé en 1973 une équation connue aujourd'hui comme l'équation de Cheng-Prusoff (ci-dessous) mettant en relation la constante de dissociation  $K_i$  du ligand  $L$  non marqué, la constante de dissociation  $K_D$  du ligand marqué  $L^*$  avec la concentration  $IC_{50}$  en ligand  $L$  pour laquelle 50 % du signal généré par  $LR^*$  est inhibé<sup>10</sup>.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L^*]}{K_D}}$$

Ainsi, on remarque que lorsque l'on se place dans les conditions  $[L^*] = K_D$ , alors on obtient la relation suivante :

$$K_i = \frac{IC_{50}}{2}$$

Enfin, lorsque  $[L^*] \ll K_D$  on peut approximer  $K_i = IC_{50}$ .

Expérimentalement, cette méthode est largement utilisée pour déterminer l'affinité de ligands non marqués ou dont les ligands froids sont plus facilement accessibles que les marqués (typiquement les molécules radiofluorées)<sup>11,12</sup>. La méthode de détermination de la constante de dissociation d'un ligand non marqué en utilisant la méthode par compétition avec un ligand radiomarqué est illustrée dans la *Figure 121*.

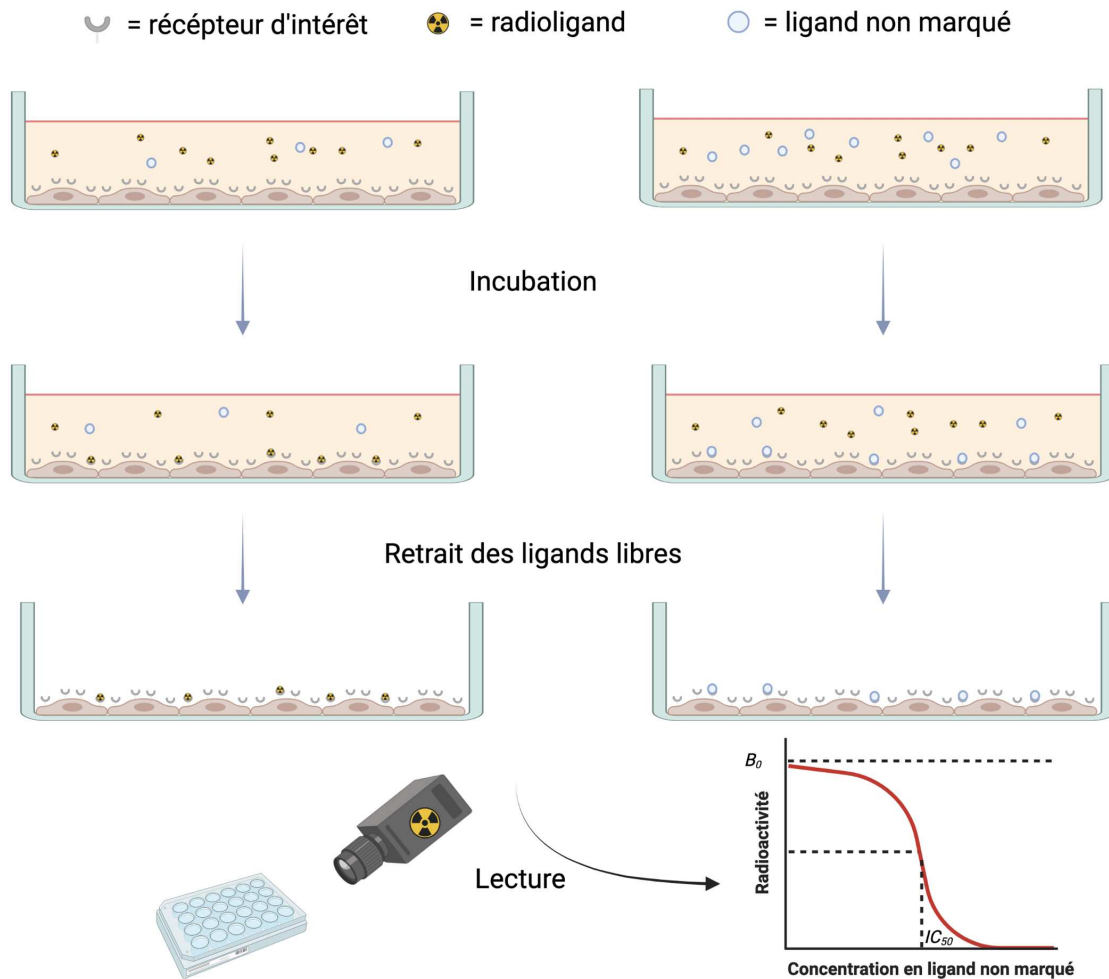


Figure 121 : Schéma représentatif de la détermination de l'affinité d'un ligand non marqué par la méthode de compétition avec un ligand radiomarqué. À gauche, exemple d'une concentration de ligand non marqué faible ne déplaçant pas le radioconjugué. À droite, exemple d'une concentration plus élevée en ligand non marqué déplaçant la totalité du ligand marqué.

### 3. Objectifs du projet

En raison de la forte sensibilité des appareils de mesure, les méthodes de détermination de constantes de dissociation à l'aide de ligands radiomarqués jouissent d'une très grande précision et demeurent à ce jour les plus utilisées pour la déterminer l'affinité d'agents d'imagerie pour leur cible.

En revanche, travailler avec des composés radioactifs présente des limitations majeures. La première, et la plus importante de ces limitations, est la radiotoxicité de ces composés, nécessitant l'emploi de postes de travail sécurisés. La seconde est la demi-vie de certains radioéléments, les demi-vies courtes imposant au personnel manipulant des limites temporelles dans la réalisation des essais, et les demi-vies longues imposant un stockage sécurisé des radioéléments avant et après utilisation en attendant leur décroissance. Il faut ajouter à ces facteurs, la mise en place d'une logistique complexe entre le site de production du radioélément et le laboratoire qui effectue les essais, car la plupart des radioéléments utilisés en radiopharmacie sont faits à la demande.

Dans ce chapitre, nous proposons une méthode alternative à l'utilisation de composés radioactifs pour la détermination de l'affinité de différents types de ligands. Notre approche s'inspire des essais de compétition précédemment décrits en utilisant un ligand marqué avec un fluorophore, nous affranchissant ainsi des problèmes de sécurité et de demi-vie que peuvent engendrer les ligands radiomarqués.

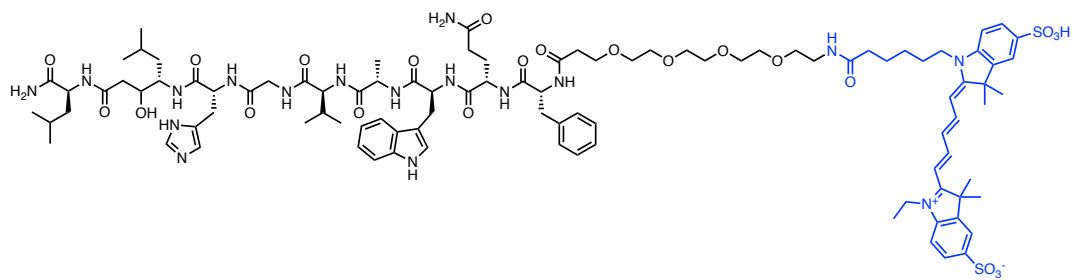
Ce chapitre aborde dans un premier temps la synthèse et la caractérisation de ligands de référence fluorescents ciblant GRPR, PSMA et CXCR4. Dans un second temps sera abordé le développement de la méthode, exemplifiée par la détermination de la constante de dissociation d'un ligand fluorescent ciblant GRPR et de la bombésine par compétition avec ce dernier.

Pour développer notre méthode, nous nous sommes appuyés sur un appareillage non conventionnel, l'Incucyte, un microscope permettant l'acquisition d'images sur cellules vivantes, équipé de DEL et de caméra permettant l'excitation et la lecture de signal fluorescent dans le vert et dans le rouge. L'utilisation de cet appareil afin de déterminer des constantes d'affinité n'a jamais été rapportée dans la littérature et possède l'avantage d'être disponible dans l'institut.

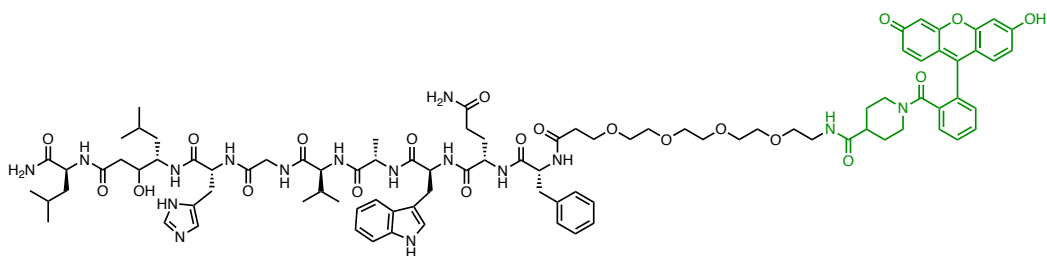
## II. Synthèse des ligands fluorescents de référence

Le premier point de ce projet a consisté à synthétiser une série de ligands fluorescents ciblant CXCR4, PSMA et GRPR. En raison des caractéristiques techniques de l'Incucyte, nous avons choisi d'utiliser comme fluorophores une cyanine-5 disulfonatée ( $\lambda_{\text{abs}} = 649 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$ ) et un dérivé de fluorescéine ( $\lambda_{\text{abs}} = 494 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 521 \text{ nm}$ ). Cette partie traite donc de la synthèse des cinq molécules cibles représentées dans la *Figure 122*.

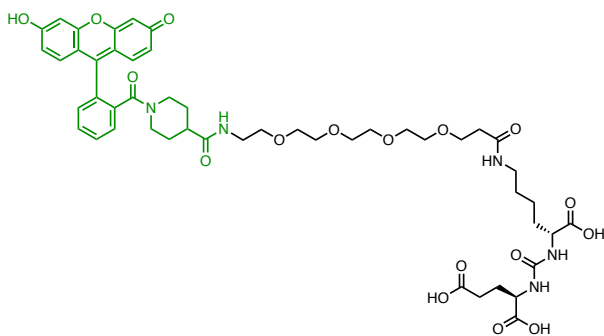




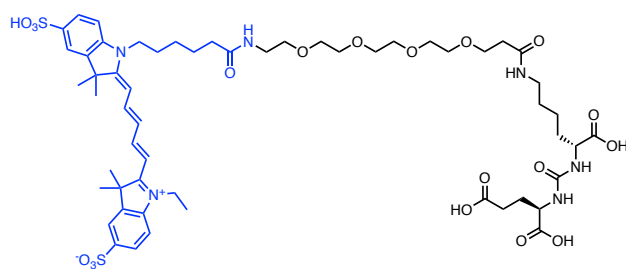
59



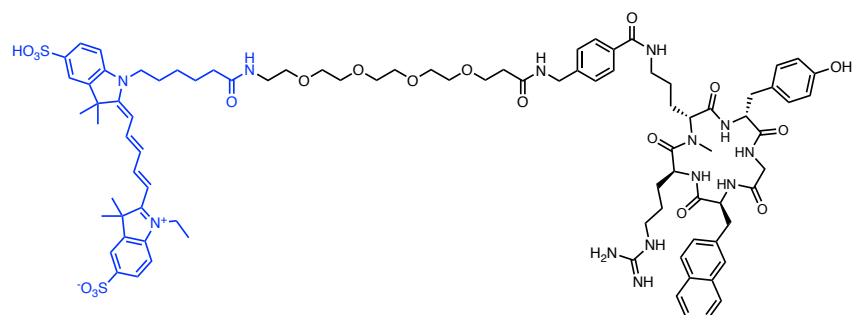
60



63



64



66

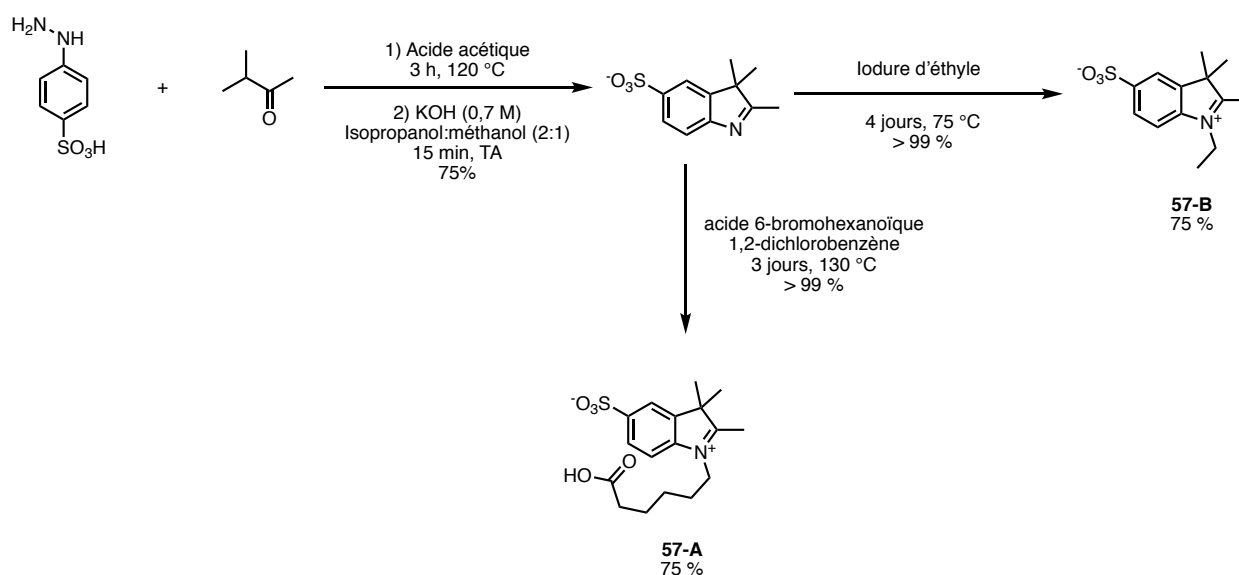
Figure 122 : Structure des composés 59, 60, 63, 64 et 66. Les fluorophores sont représentés en couleur, en bleu : le motif Cy-5 et en vert : le motif fluorescéine

## 1. Synthèse de la cyanine-5 disulfonaté **57**

La synthèse du composé **57** a été effectuée selon le protocole de Mujumdar *et al.* publié en 1993 dans *Bioconjugate Chemistry*<sup>13</sup>. Dans un premier temps, le 2,3,3-triméthylindoleninium-5-sulfonate a été généré à l'issue d'une réaction de synthèse d'indole de Fischer<sup>14</sup> avec un rendement de 75 % (Figure 123).

Le composé **57-A** a été synthétisé par quaternisation de l'amine de l'indole en présence d'acide 6-bromohexanoïque au reflux du 1,2-dichlorobenzène. L'indole fonctionnalisé **57-A** a été isolé avec un rendement quantitatif (Figure 123).

Le composé **57-B** à quant à lui été produit par réaction entre le 2,3,3-triméthylindoleninium-5-sulfonate et l'iodure d'éthyle, au reflux, avec un rendement quantitatif également (Figure 123).



Le composé **57** a été synthétisé en deux étapes. Dans un premier temps, l'indole **57-B** a subi une réaction de condensation avec le malonaldéhyde dianilide à reflux de l'acide acétique et de l'anhydride acétique. L'hémicyanine ainsi formée est ensuite directement engagée dans une seconde réaction de condensation avec le composé **57-A** au reflux de l'acide acétique pour donner la cyanine **57** avec un rendement de 12 % après purification par chromatographie en phase inverse (Figure 124).

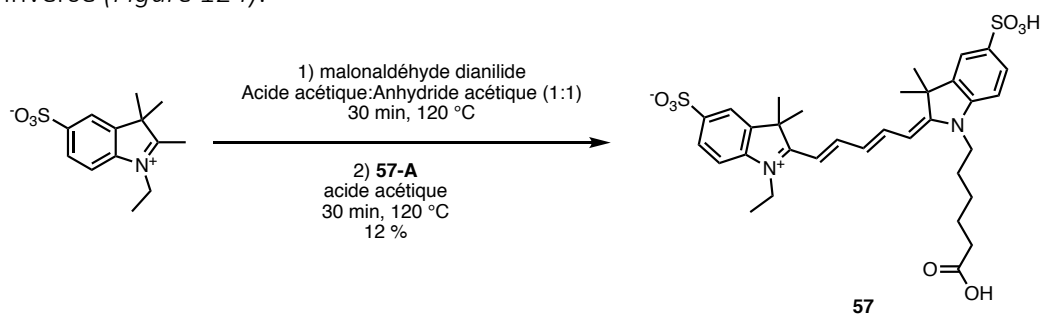


Figure 124 : Schéma de synthèse du composé **57**

## 2. Synthèse des composés de référence fluorescents

### A. Synthèse des dérivés fluorescents de JMV594

#### a. H-PEG<sub>4</sub>-JMV594 (**58**)

Afin d'éloigner le peptide du fluorophore, nous avons choisi d'utiliser un espaceur PEG<sub>4</sub>, suffisamment long pour éviter une éventuelle gêne stérique du fluorophore sur l'interaction ligand-récepteur et suffisamment polaire pour garantir une bonne solubilité en milieu aqueux. Ce type d'espaceur a déjà été utilisé pour séparer un chélateur de la séquence de JMV594 sans que le conjugué perde son affinité pour le GRPR<sup>15</sup>.

Le résidu Boc-NH-PEG<sub>4</sub>-COOH a été directement couplé sur une résine préalablement greffée avec la séquence d'acides aminés de JMV594. Le couplage a été effectué manuellement en présence de HATU et de DIEA. Après purification par HPLC semi-préparative en phase inverse, le peptide fonctionnalisé **58** a été obtenu avec un rendement de 17 % (Figure 125).

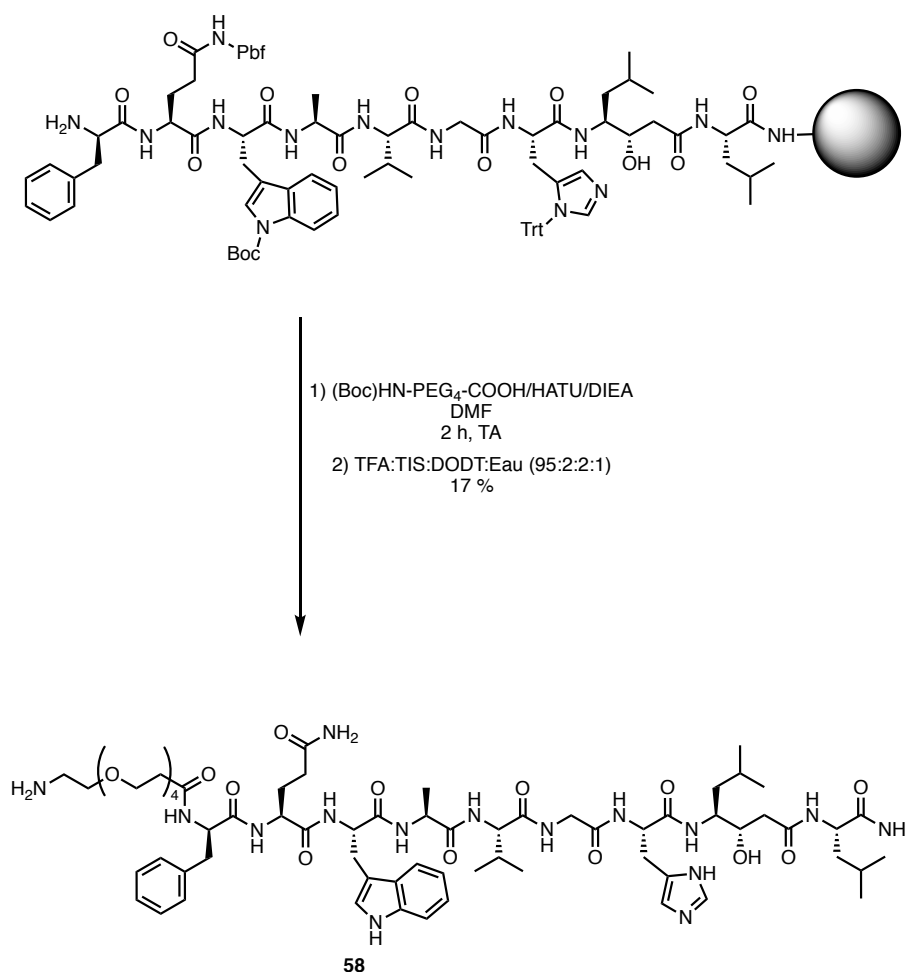


Figure 125 : Synthèse du composé **58**

#### b. Couplage entre les composés **57** et **58** : synthèse de Cy5-PEG<sub>4</sub>-JMV594 (**59**)

La synthèse a été effectuée par couplage peptidique entre la cyanine **57** et le composé **58** en présence de HATU et de DIEA pour donner le marqueur fluorescent **59** avec un rendement de 69 % après purification par HPLC semi-préparative (Figure 126).

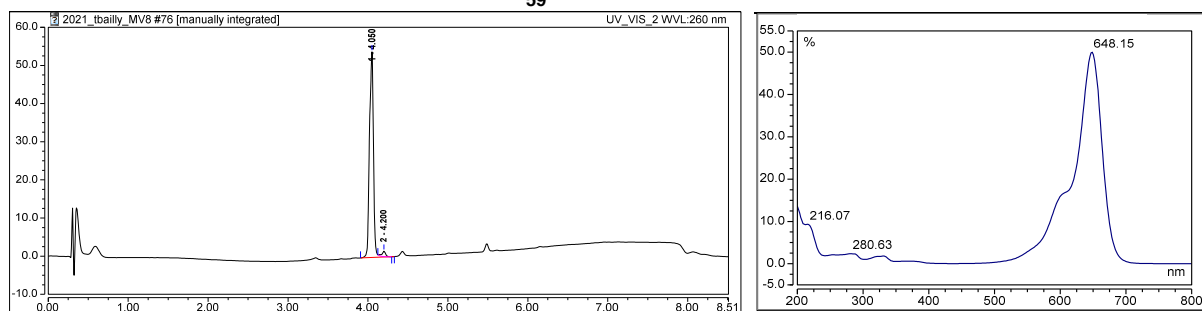
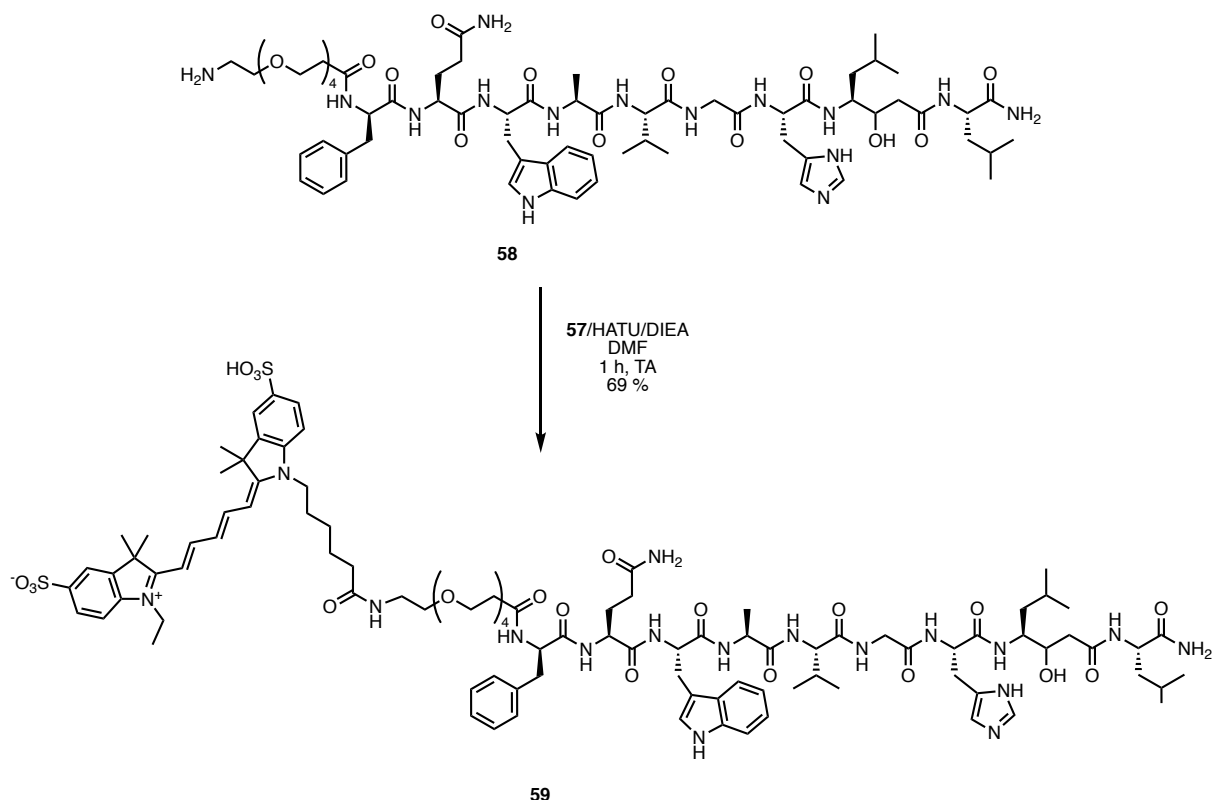


Figure 126 : Synthèse de **59** à partir de **57** et **58** (haut), chromatogramme HPLC (bas gauche) et spectre d'absorption UV-visible (bas droite) du composé **59**

### c. Couplage entre le composé **58** et la fluorescéine : synthèse de Fluorescéine-PEG<sub>4</sub>-JMV594 (**60**)

Le dérivé de fluorescéine que nous avons choisi est la fluorescéine-acide isonipécotique (*Figure 127*). Il s'agit d'une fluorescéine dont l'acide carboxylique a été couplé à de l'acide isonipécotique, autrement appelé acide 4-pipéridinecarboxylique. Lorsque l'on travaille avec des fluorophores de la famille des xanthènes (fluorescéines, rhodamines...), il est crucial que la fonction acide carboxylique liée au cœur aromatique soit dérivatisée sous forme d'amide disubstitué afin d'éviter la formation d'un spirolactame. Ce phénomène de cyclisation intramoléculaire pH-dépendant (qui est en fait un équilibre entre la forme amide et lactame) a pour conséquence l'extinction d'une partie de la fluorescence<sup>16</sup>.

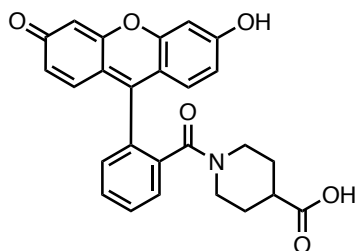


Figure 127 : Structure de la fluorescéine dérivatisée avec un acide isonipéotique

En raison de sa nucléophilie, la fonction phénol du cœur xanthène nous oblige à effectuer un couplage dans des conditions non alcalines. La fonction acide carboxylique du fluorophore a donc été activée en présence d'un excès de *N*-hydroxysuccinimide et de DIC en solution dans le DMF. Dans un second temps, le composé **58**, en solution dans l'eau et l'acétonitrile (50 :50), a été ajouté au goutte à goutte, et le mélange agité pendant 10 h. Après purification du brut réactionnel par HPLC semi-préparative, le composé **60** a été obtenu avec un rendement de 51 % (Figure 128).

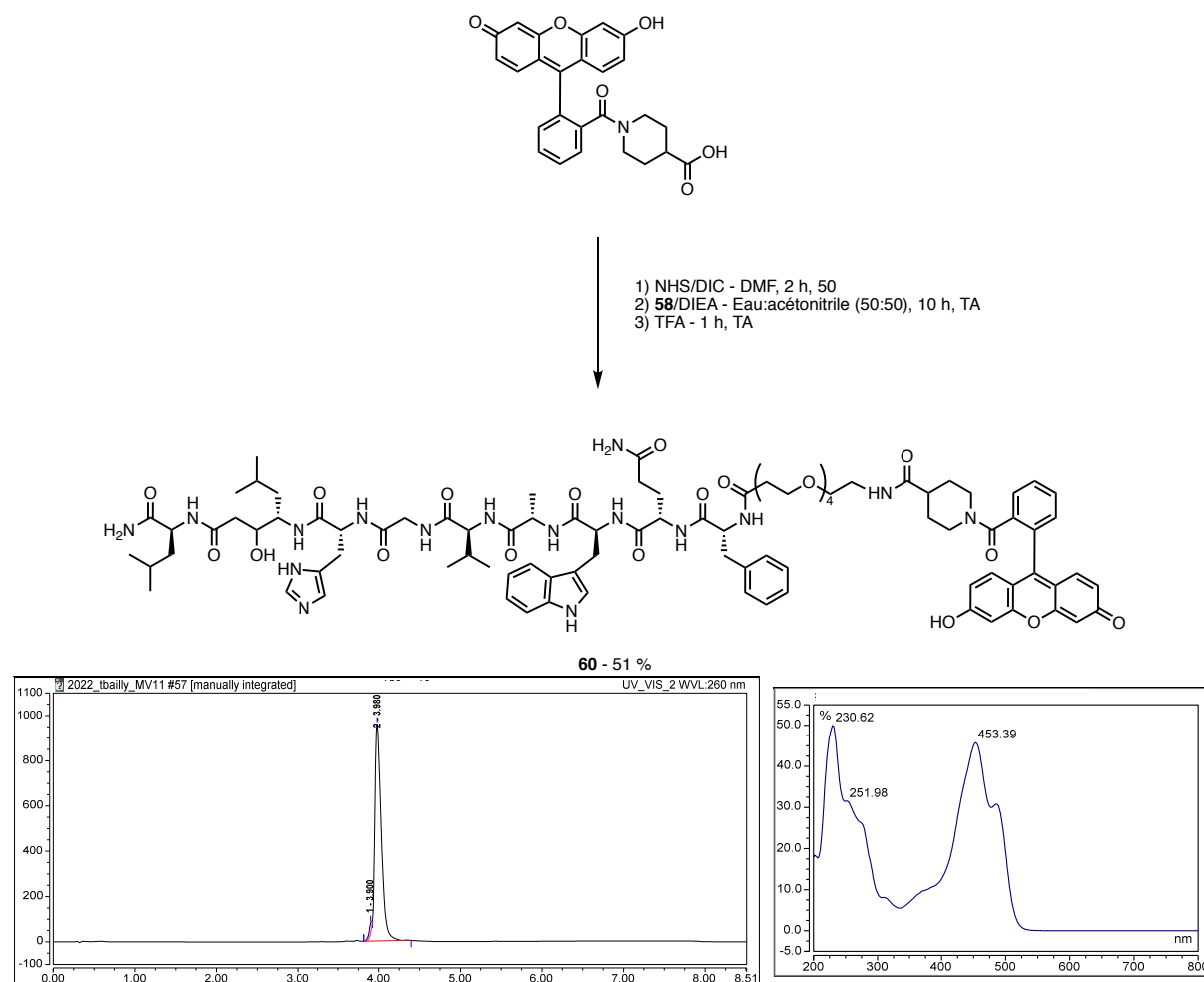


Figure 128 : Schéma réactionnel de la synthèse du composé **60** à partir de la fluorescéine acide isonipéotique et de **58** (haut), chromatogramme HPLC de **60** (bas gauche) et spectre d'absorption UV-visible de **60** (bas droite)

## B. Synthèse des dérivés fluorescents de KuE

### a. KuE-PEG<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (**61**) et KuE(*t*Bu)<sub>3</sub>-PEG<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (**62**)

#### *KuE*-PEG<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (**61**)

Le composé **61** a été synthétisé en trois étapes à partir de la molécule KuE *per-tert*-butylée. Dans un premier temps, l'amine primaire en ε de la lysine a été couplée à l'acide carboxylique de l'espaceur en présence de HATU et de DIEA. Après purification par HPLC semi-préparative, les esters de *tert*-butyle ont été clivés par du TFA. Après purification par HPLC semi-préparative, le composé **61** a été obtenu avec un rendement de 45 % (Figure 129).

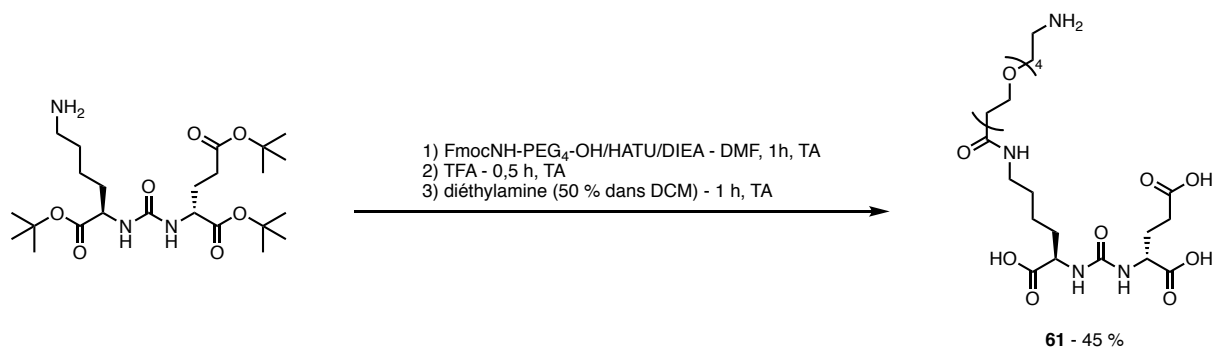


Figure 129 : Schéma de synthèse du composé **61**

#### *KuE*(*t*Bu)<sub>3</sub>-PEG<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (**62**)

La molécule *per-tert*-butylée **62** a quant à elle été synthétisée en deux étapes à partir de KuE(*t*Bu)<sub>3</sub>. La première étape de couplage a été effectuée de la même manière que pour le composé **61**. Après purification par HPLC semi-préparative, le composé **62** a été obtenu en utilisant la même méthode de coupure du groupement Fmoc. Un rendement de 75 % a été obtenu pour la synthèse du composé **62** (Figure 130).

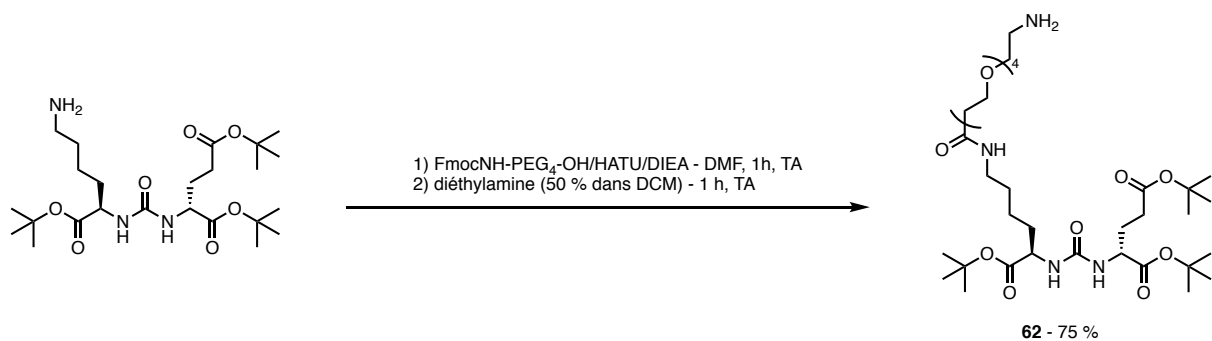


Figure 130 : Schéma de synthèse du composé **62**

### b. Couplage entre le composé **62** et la fluorescéine : Synthèse de KuE-PEG<sub>4</sub>-fluorescéine (**63**)

La synthèse du composé **63** a été effectuée de manière analogue à celle du composé **60** à partir du conjugué fluorescéine-acide isonipécotique et de la molécule **62**. En raison de la présence des esters *tert*-butyliques, une étape supplémentaire de déprotection des fonctions acide carboxylique a été ajoutée. Le ligand de référence **63** a été obtenu avec un rendement global de 14 % (Figure 131).

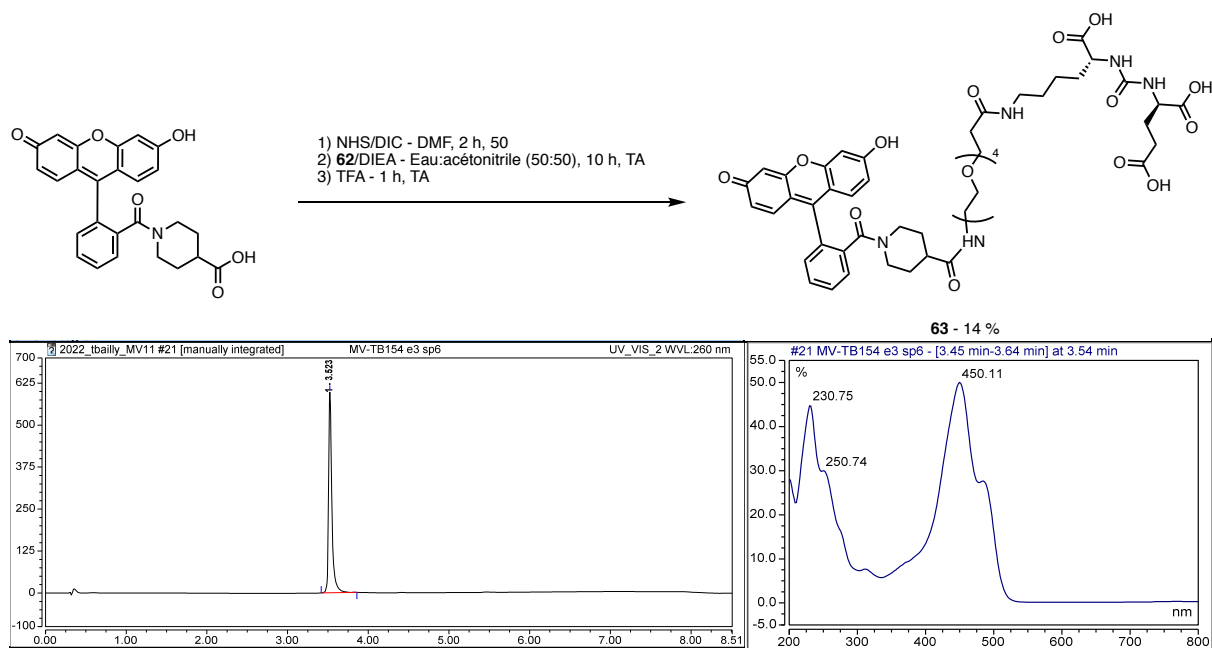


Figure 131 : Schéma de synthèse du composé **63**, chromatogramme HPLC de **63** (bas gauche) et spectre d'absorption UV-visible de **63** (bas droite)

### c. Couplage entre les composés **61** et **57** : Synthèse de KuE-PEG<sub>4</sub>-Cy5 (**64**)

En raison de l'instabilité du composé **57** en présence d'acide trifluoroacétique, il a été nécessaire d'effectuer la synthèse de **64** à partir du dérivé déprotégé **61**. Cependant, du fait de la présence de trois fonctions acide carboxylique au sein de **61**, nous avons dû utiliser une technique de couplage plus douce : la génération de l'ester de *N*-hydroxysuccinimide de **57** suivie du couplage avec le composé **61** en milieu basique. Cette stratégie a été efficace, puisqu'elle nous a permis d'obtenir le composé **64** avec un rendement de 38 %.

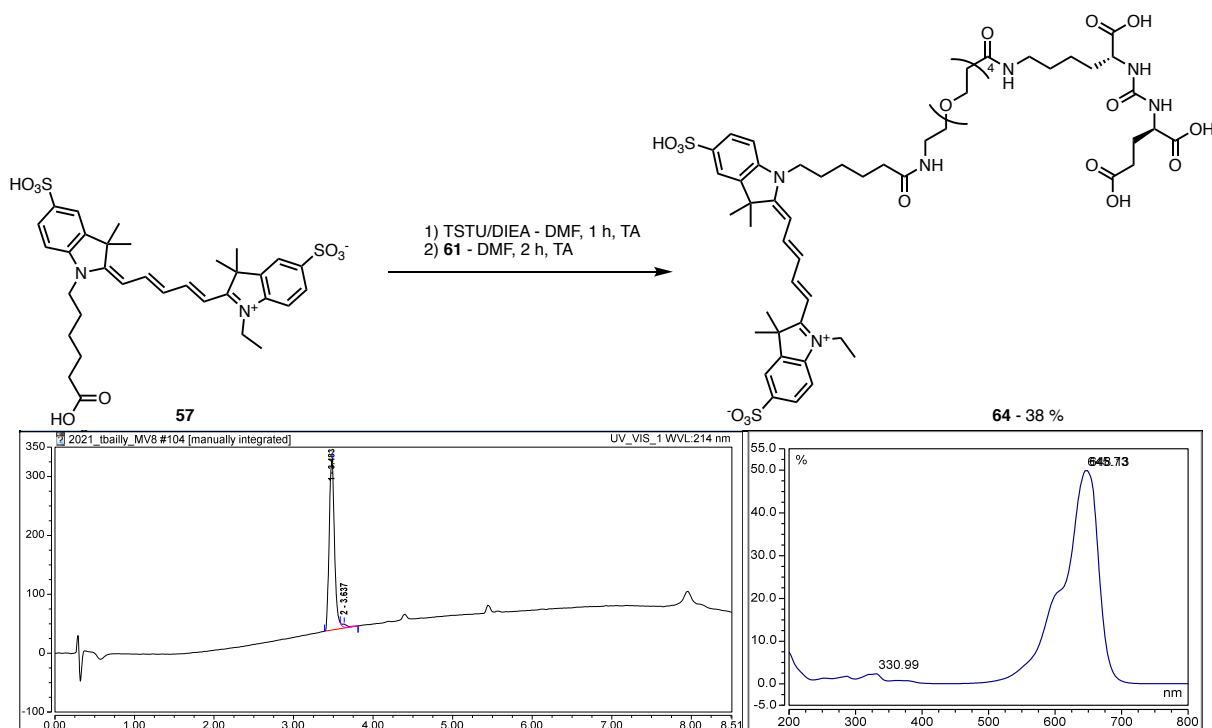


Figure 132 : Schéma de synthèse du composé **64**, chromatogramme HPLC de **64** (bas gauche) et spectre d'absorption UV-visible de **64** (bas droite)

### C. Synthèse de [N-Me-D-Orn<sup>2</sup>]FC131-PEG<sub>4</sub>-Cy5

#### a. Synthèse de [N-Me-D-Orn<sup>2</sup>]FC131-PEG<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (**65**)

La synthèse du composé **65** a été réalisée en 4 étapes à partir du composé **34** dont la synthèse a été décrite dans le chapitre précédent. La première étape consistait à installer un espaceur *para*-aminométhylbenzoyle, dont la présence a un effet bénéfique sur l'affinité du ligand avec CXCR4<sup>17</sup>, par réaction de couplage entre **34** et l'acide 4-(Fmoc-aminométhyl) benzoïque en présence de HATU et de DIEA. Dans un second temps, après déprotection de l'amine primaire de l'espaceur précédemment installé, l'espaceur hydrophile Boc-PEG<sub>4</sub>-COOH a été conjugué au peptide dans les mêmes conditions. L'étape finale de déprotection des chaînes latérales du peptide et de l'amine primaire terminale a été réalisée par traitement par du TFA contenant du TIS (2 %) et de l'eau (2 %).

Après isolation par précipitation dans l'éther diéthylique (4 °C), le composé **65** a été obtenu avec un rendement global de 51 % et a été engagé dans l'étape de conjugaison avec le fluorophore sans purification supplémentaire (Figure 133).

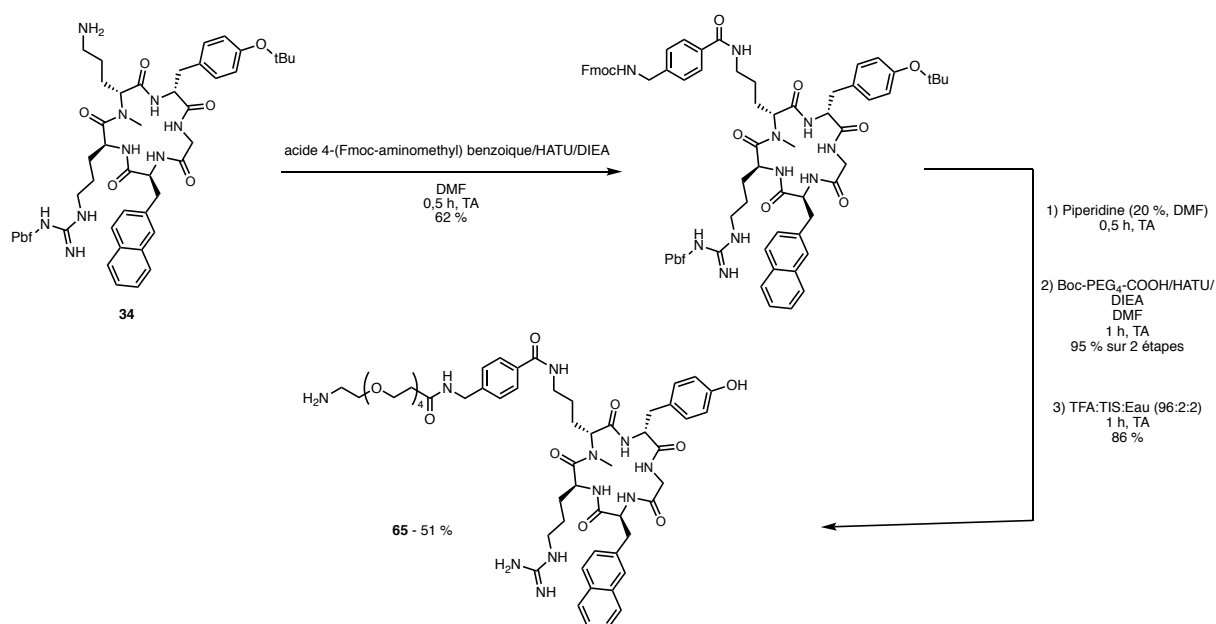


Figure 133 : Schéma de synthèse de la molécule **65** à partir du peptide cyclique protégé **34**

#### b. Couplage entre les composés **57** et **65** : synthèse de [N-Me-D-Orn<sup>2</sup>]FC131-PEG<sub>4</sub>-Cy5 (**66**)

La synthèse du ligand de référence **66** a été réalisée de la même manière que le marqueur **64**, l'emploi d'HATU et DIEA étant évité en raison du caractère nucléophile des fonctions phénolate et guanidine. Comme précédemment, la solution retenue a consisté à pré-activer la cyanine **57** *via* la formation d'un ester de *N*-hydroxysuccinimide, ce qui nous a permis d'isoler le composé **66** avec un rendement de 34 % après purification par HPLC semi-préparative (Figure 134).



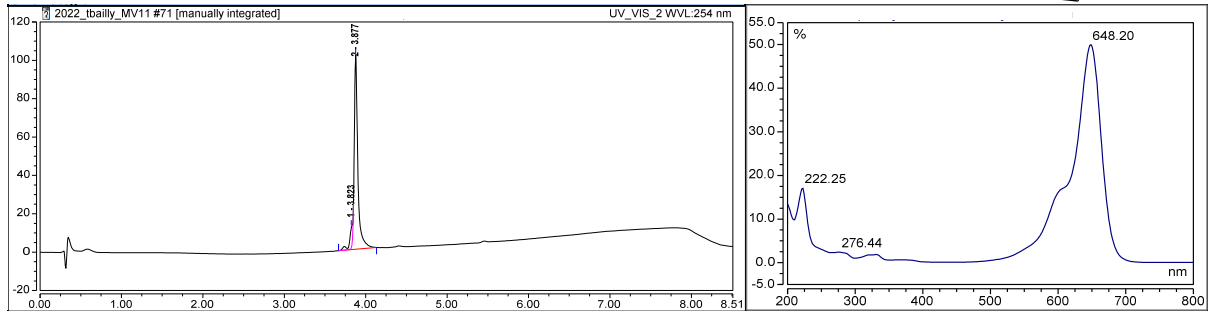
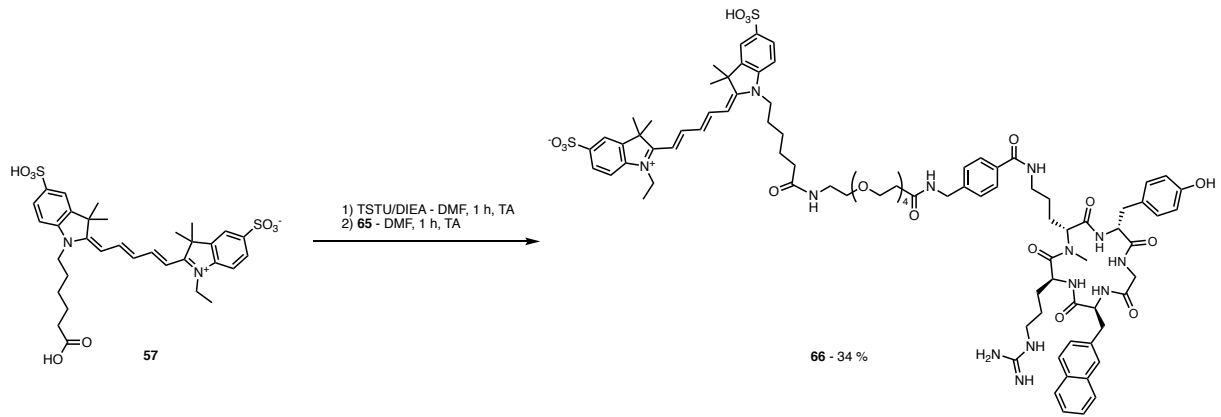


Figure 134 : Schéma de synthèse du composé **66**, chromatogramme HPLC de **66** (bas gauche) et spectre d'absorption UV-visible de **66** (bas droite)

### III. Développement de la méthode de mesure

Afin de développer notre nouvelle méthode de détermination de l'affinité d'un ligand pour son récepteur, en utilisant des ligands de référence fluorescents, nous avons choisi de travailler avec la lignée cellulaire PC3 qui surexprime GRPR. Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser le composé fluorescent de référence **59**, Cy5-PEG<sub>4</sub>-JMV594. Ce travail s'est décomposé en trois étapes : premièrement, nous nous sommes donné pour objectif de déterminer le temps d'incubation nécessaire pour atteindre l'équilibre thermodynamique. Dans un second temps, nous avons déterminé l'affinité du ligand de référence **59** pour GRPR. Enfin, afin de valider la méthode, nous avons effectué un essai de compétition pour évaluer l'affinité de la bombésine pour GRPR en utilisant **59** comme ligand marqué.

#### 1. Essais cinétiques

##### A. Généralités

Les équations introduites dans la première partie de ce chapitre ne peuvent être utilisées que si le système étudié se trouve à l'équilibre. Le temps pour arriver à l'équilibre dépend fortement de la concentration en ligand marqué : plus celle-ci est faible, plus le temps pour arriver à l'équilibre est élevé<sup>18</sup>.

Tenter de déterminer la constante de dissociation d'un ligand pour son récepteur lorsque le système n'est pas à l'équilibre mène à une surestimation de cette dernière<sup>18</sup>. C'est pourquoi il est crucial de déterminer le temps d'incubation pour lequel le système a atteint l'équilibre thermodynamique. Pour ce faire, il est nécessaire d'introduire le temps de demi-vie d'équilibre  $t_{1/2}$  défini comme le temps nécessaire au système pour que 50 % de l'équilibre soit atteint. Après une durée de  $5 \times t_{1/2}$ , le système a atteint 97 % de l'équilibre et on considère alors que les équations décrites précédemment sont valables<sup>19</sup>.

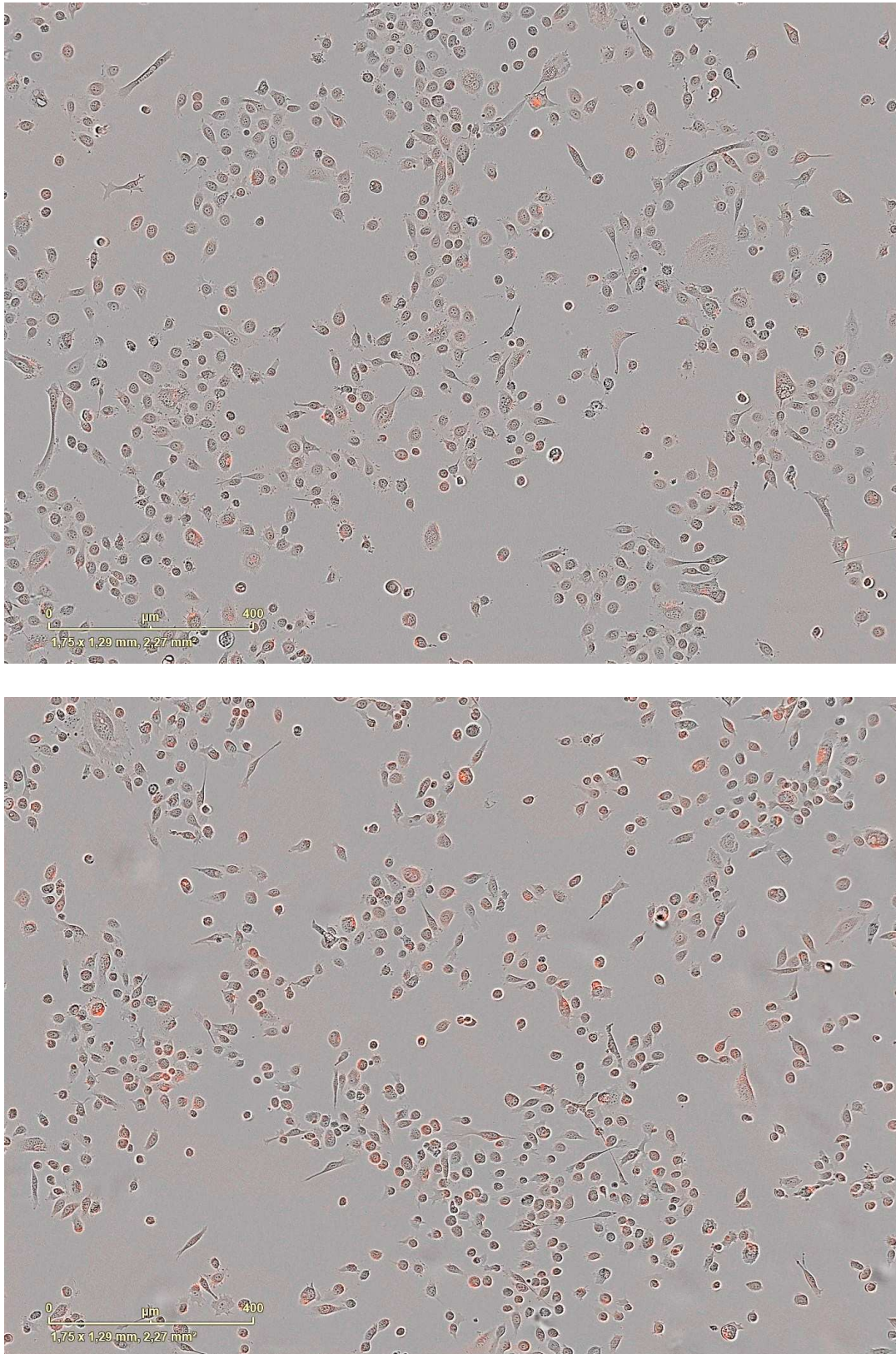
##### B. Détermination de $t_{1/2}$ du composé **59**

Expérimentalement, pour déterminer le temps de demi-vie d'équilibre, il est nécessaire de se placer à une concentration en ligand marqué inférieure ou égale à la plus faible concentration utilisée pour la détermination de la constante de dissociation. Ensuite, la quantité de ligand lié au récepteur doit être mesurée à différents temps d'incubation et la valeur de  $t_{1/2}$  déterminée graphiquement.

Dans notre cas, nous nous sommes placés à une concentration en ligand **59** de 0,32 nM. Comme nous l'expliquerons dans la partie suivante, cette concentration est inférieure à la plus petite concentration de la gamme de concentrations testées (0,50 nM).

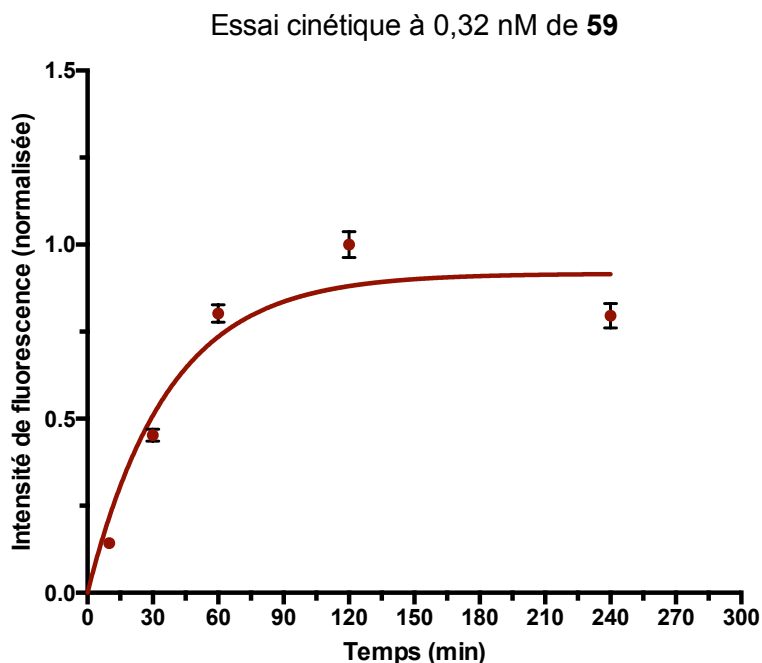
Deux jours précédant l'expérience, des plaques 24 puits ont étéensemencées avec des cellules PC3 (50 000/puits). Le jour de l'expérience, les cellules ont été incubées avec une solution de **59** (0,32 nM) dans le RPMI (milieu nutritif pour les cellules) pendant différents temps d'incubation : 10, 30, 60, 120 et 240 minutes. Après incubation, le milieu a été retiré par aspiration et les puits lavés avec du PBS (3 × 0,5 mL). La fluorescence résiduelle a ensuite été quantifiée au moyen de l'Incucyte (voir partie expérimentale).

Les images ainsi obtenues ont ensuite été traitées, l'intensité de fluorescence quantifiée puis normalisée par rapport à l'aire occupée par les cellules (*Figure 136*).



*Figure 135* : Cellules PC3 traitées avec **59** (0,32 nM) pendant 30 minutes (haut) et pendant 120 minutes (bas), observées au microscope Incucyte avec un objectif X10. La fluorescence de **59** apparaît en rouge.

Les données collectées nous ont permis de déterminer un temps de demi-vie d'équilibre  $t_{1/2}$  de 30 minutes. Ainsi, afin de se trouver dans un état d'équilibre, les mesures de constantes de dissociation devront être effectuées après 2 h 30 d'incubation (*Figure 136*).



*Figure 136 : Essais cinétiques effectués sur cellules PC3 en présence de **59** (0,32 nM) dans le RPMI. En ordonnée, l'intensité de fluorescence normalisée par l'aire occupée par les cellules et par l'intensité maximale mesurée après 120 minutes d'incubation. En abscisse, le temps d'incubation.*

### 3. Détermination du $K_D$ du composé **59** pour GRPR

Après avoir déterminé le temps d'incubation suffisant pour atteindre l'équilibre, nous avons entrepris de mesurer la constante de dissociation du composé **59** pour le GRPR sur cellules de lignée PC3 en quantifiant grâce à l'Incucyte la fluorescence émanant du ligand **59** lié à son récepteur.

#### A. Protocole

Dans un premier temps, les cellules PC3 ont étéensemencées (50 000 cellules/puits) dans des plaques 24 puits 2 jours avant l'expérience. Cette quantité de cellules nous permet d'avoir un nombre de cellules idéal pour effectuer nos mesures, c'est-à-dire qu'elles sont suffisamment nombreuses sans pour autant atteindre une occupation des puits (confluence) trop importante. En effet, afin de normaliser la fluorescence obtenue par rapport au nombre de cellules, il est important que celles-ci soient parsemées de façon à ce que leurs limites soient faciles à distinguer par l'algorithme de traitement des images.

Le jour de l'expérience, les cellules sont incubées pendant 2 h 30 à 37 °C avec le gradient de concentration de ligand **59** dans le RPMI suivant : 0,5, 1, 5, 25, 50 et 100 nM. Après l'incubation, le surnageant contenant le ligand **59** libre dans le RPMI est retiré par aspiration et chaque puits



est lavé avec du PBS enrichi en chlorure de magnésium et en chlorure de calcium (10 mg/L, 3 × 500 µL). L'utilisation de ce type de PBS permet aux cellules de rester adhérentes au plastique du puits. En effet, les expériences que nous avons réalisées en utilisant du PBS sans ajout de calcium et de magnésium ont mené au décrochage des cellules, rendant les résultats ininterprétables (*Figure 137*). Il est également primordial lors des lavages de veiller à ne pas déposer le PBS directement sur les cellules, mais d'incliner la plaque et de le laisser s'écouler doucement dans le puits.

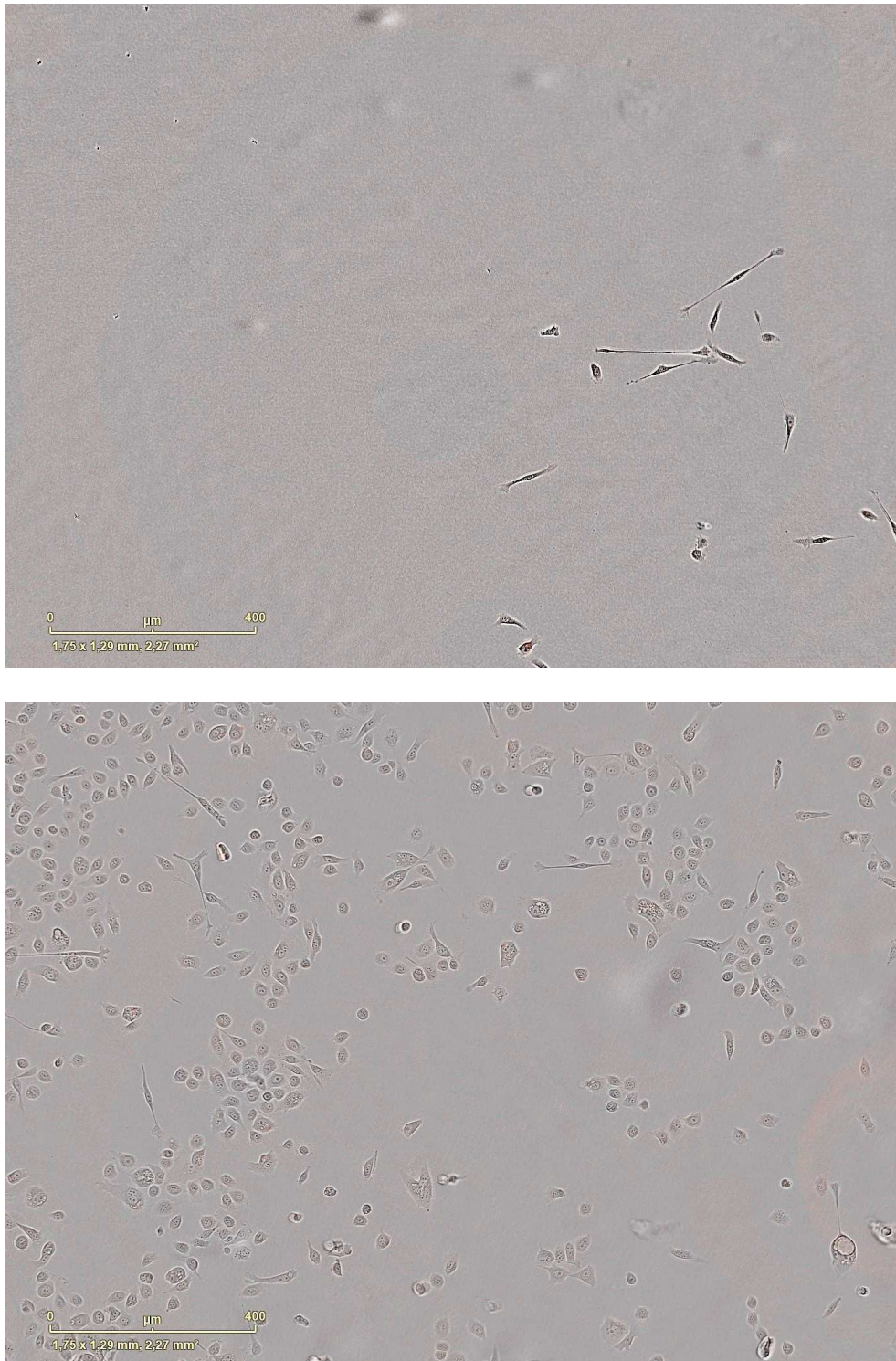


Figure 137 : Images acquises au microscope (Incucyte) d'un puits après lavage avec du PBS sans ajout de calcium et de magnésium (haut) et images obtenues après lavage avec du PBS enrichi en ces deux éléments (bas)

Une fois le dernier lavage effectué, les cellules sont de nouveau mises en contact avec du PBS et la lecture peut être effectuée à l'aide de l'Incucyte.

## B. Résultats

Cette expérience a été réalisée trois fois, sur un total de 3 puits par concentration en ligand **59**. Les résultats obtenus sont répertoriés dans le *Tableau 13*.

Concentration en ligand <b>59</b> (nM)	Intensité de fluorescence/Aire occupée par les cellules (RCU $\times$ $\mu\text{m}^2$ )	Ecart-type (RCU $\times$ $\mu\text{m}^2$ )
0,5	0,0006	0,0023
1	0,0021	0,0022
5	0,0118	0,0020
25	0,0111	0,0047
50	0,0105	0,0065
100	0,0122	0,0040

*Tableau 13 : Récapitulatif des données obtenues sur 3 expériences de détermination de la constante de dissociation de **59** par rapport à GRPR sur cellules PC3*

En analysant ces données, on remarque qu'un plateau est atteint à partir d'une concentration de 5 nM en ligand **59**, se situant aux alentours de 0,011 RCU/ $\mu\text{m}^2$ . Lorsque l'on s'intéresse aux écarts-types obtenus, on remarque que ces derniers sont du même ordre de grandeur, indépendamment de la concentration. Ces écarts-types sont importants en comparaison aux écarts-types obtenus lors de l'expérience cinétique. Nous soupçonnons que la distribution non homogène des cellules dans certains puits est responsable de ces écarts-types. Elle pourrait être due au décrochage de cellules pendant les lavages. En effet, certaines images affichent une quantité peu importante de cellules, donnant des valeurs peu représentatives et provoquant l'augmentation des barres d'erreurs.

Néanmoins, le plus important lors de la détermination expérimentale d'une constante de dissociation est la nette identification du  $B_{max} = 0,0124$  RCU  $\times$   $\mu\text{m}^2$  et d'un plateau. Nous avons donc pu déterminer un  $K_D = 2,23 \pm 1,36$  nM (*Figure 138*).

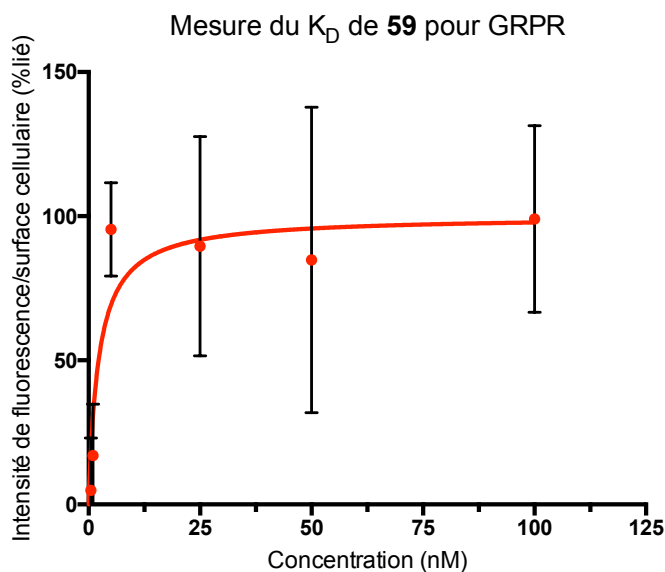


Figure 138 : Intensité de fluorescence/surface occupée par les cellules (normalisée par  $B_{max} = 0,0124 \text{ RCU}/\mu\text{m}^2$ ) en fonction de la concentration en **59** sur cellules PC3

#### 4. Détermination du $K_i$ de la bombésine par compétition contre le conjugué **59**

Dans le but de valider notre nouvelle méthode, nous avons ensuite entrepris de mesurer la constante de dissociation de la bombésine (BBN(1-14)) pour GRPR qui, dans la littérature, est donnée entre 0,17 et 3,4 nM<sup>20-22</sup>.

##### A. Protocole

De la même manière que précédemment, une plaque 24 puits a étéensemencée avec 50 000 cellules par puits deux jours avant l'expérience.

Le jour de l'expérience, les cellules ont été incubées pendant 2 h 30 avec un gradient de concentration en bombésine de 0,5 à 100 nM en présence d'une concentration fixe en ligand **59** de 10 nM. Lorsque l'on regarde l'équation de Cheng-Prusoff, on remarque qu'il est préférable d'utiliser une concentration fixe en ligand marqué qui soit bien inférieure à la constante de dissociation de façon à considérer que  $IC_{50} = K_i$ . Cependant, en raison de la faible sensibilité de l'Incucyte comparée à un compteur  $\gamma$ , nous avons décidé de nous placer à une concentration de 10 nM.

Après l'incubation, le surnageant contenant le ligand **59** libre dans le RPMI est retiré par aspiration et chaque puits est lavé avec du PBS enrichi en chlorure de magnésium et en chlorure de calcium (10 mg/L,  $3 \times 500 \mu\text{L}$ ). Après lavage, les puits ont à nouveau été remplis avec 500  $\mu\text{L}$  de PBS et la fluorescence résiduelle quantifiée grâce à l'Incucyte, générant une série d'images dont des exemples sont donnés dans la *Figure 139*.



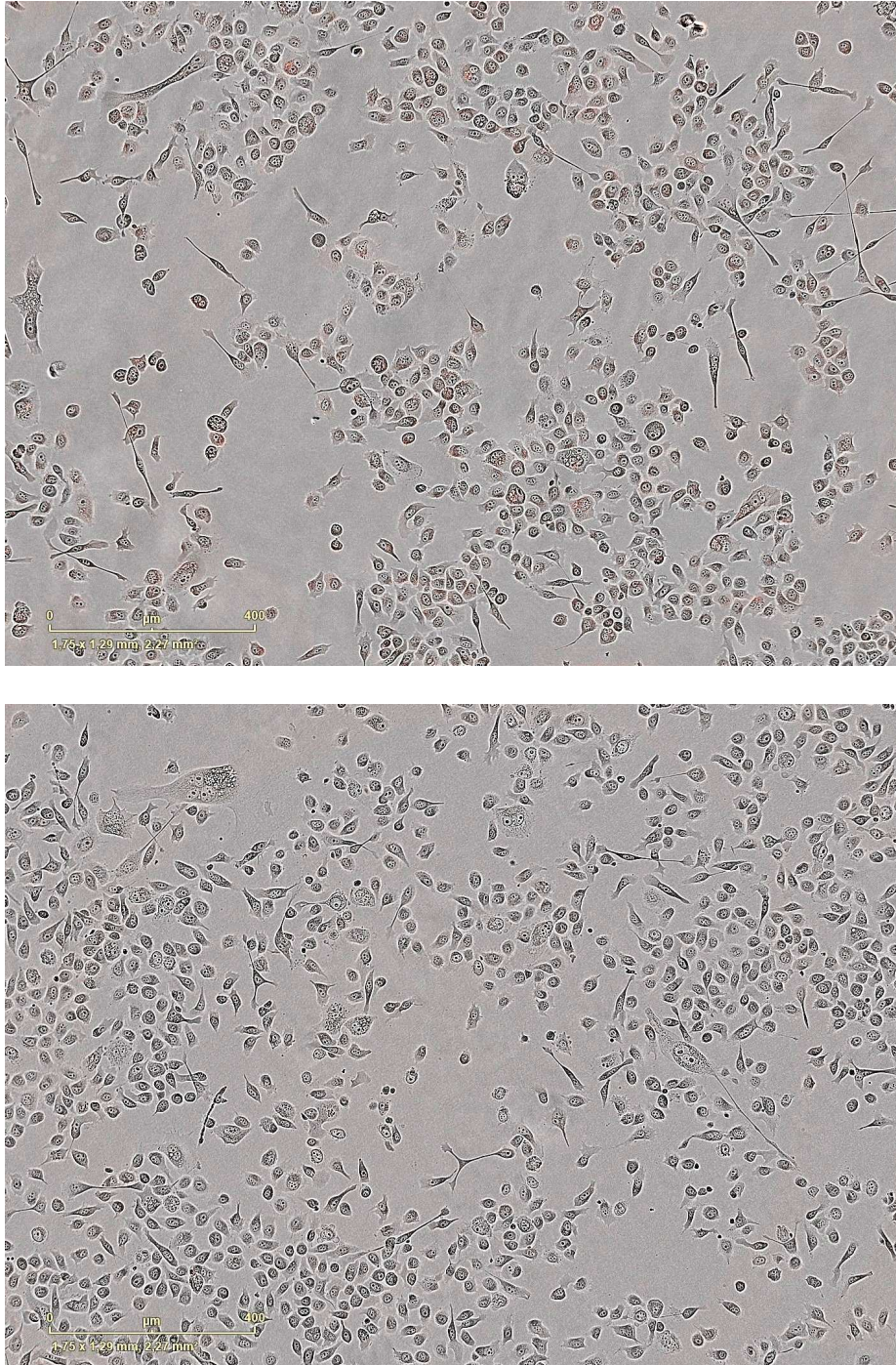


Figure 139 : Image acquise au microscope (Incucyte) après 2 h 30 d'incubation : de bombésine (0,5 nM) en présence de **59** (10 nM) (haut), et après 2 h 30 d'incubation de bombésine (100 nM) en présence de **59** (10 nM) (bas). On remarque qu'avec une faible concentration en bombésine, on observe la présence de signal fluorescent dû à **59**. Au contraire, aucun signal fluorescent n'est observé lorsque l'incubation des cellules est réalisée avec une concentration élevée en bombésine.

## B. Résultats

Les données issues du traitement de ces images ont permis la création de la *Figure 140* présentant l'intensité de fluorescence mesurée en fonction de la concentration en ligand **59**. Comme pour l'expérience précédente, les valeurs obtenues ont été normalisées par l'aire occupée par les cellules, puis par la valeur du plateau supérieur  $B_0$  correspondant à la valeur de fluorescence maximale à 10 nM de **59** lorsqu'aucun compétiteur n'est mis en jeu.



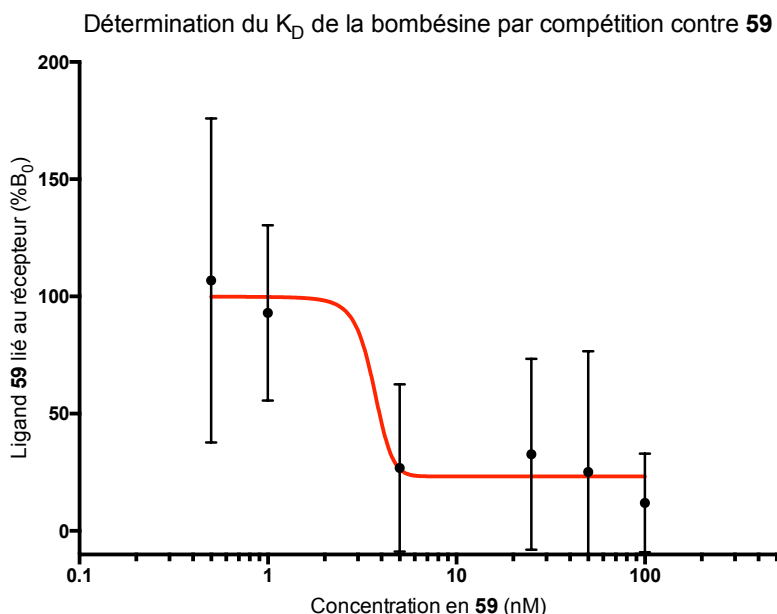


Figure 140 : Intensité de fluorescence (% $B_0$ ), normalisée par l'aire occupée par les cellules en fonction de la concentration en **59** (courbe obtenue à l'aide d'une régression non linéaire, 100% correspondant à  $B_0$ )

Comme lors de la dernière expérience, on observe des écarts-types importants pour chaque valeur, que nous attribuons, de la même manière que précédemment, à la distribution inhomogène des cellules dans les puits à l'issue des lavages. Cependant, les valeurs obtenues nous permettent d'observer clairement deux plateaux. Le plateau supérieur correspondant à  $B_0$  et le plateau inférieur correspondant au signal non spécifique. Nous avons obtenu une  $IC_{50}$  de  $2,90 \pm 1,66$  nM ce qui correspond selon l'équation de Cheng-Prusoff à une constante d'inhibition  $K_i$  de  $0,65 \pm 0,37$  nM.

Le résultat que nous avons obtenu est cohérent avec les valeurs décrites dans la littérature (entre 0,17 et 3,4 nM). Par conséquent, ces premiers résultats suggèrent la validité de la méthode que nous avons développée pour la mesure des constantes de d'inhibition d'un ligand non marqué, par compétition avec un ligand fluorescent.

Cependant, il est important de nuancer ces résultats. En effet, les valeurs que nous avons obtenues (que ce soit pour la détermination par saturation ou par compétition) étaient accompagnées d'erreurs importantes. Malgré ces erreurs, les résultats obtenus sont cohérents avec les données de la littérature et semblent indiquer que nous pourrions utiliser cette méthode pour cribler des bibliothèques de composés rapidement et à moindre coût. C'est pourquoi cette méthode mérite d'être davantage éprouvée.

## 5. Détermination de l'affinité du composé **59** pour GRPR sur cellules PC3-pip

Afin de vérifier la répétabilité de notre protocole, et ce malgré les importants écarts-types qui accompagnaient la mesure précédente, nous avons répété l'expérience de détermination de la constante de dissociation du composé **59** en utilisant cette fois-ci une autre lignée cellulaire, PC3-pip.

Nous avons choisi d'utiliser cette lignée cellulaire, car elle exprime également PSMA, et pourra donc être utilisée par la suite pour étudier les interactions entre nos traceurs hétérovalents et GRPR et PSMA.

L'affinité du composé **59** pour GRPR a ainsi été déterminée sur les cellules de la lignée PC3-pip en utilisant le protocole décrit dans la partie III-2 de ce chapitre. En raison de la multiplication plus rapide de ces cellules, les expériences ont été effectuées un jour après incubation avec 50 000 cellules par puits.

Le traitement des images obtenues à la suite de cette expérience nous a permis d'obtenir un  $K_D = 4,08 \pm 1,82$  nM (Figure 141). Cette valeur, si l'on considère sa marge d'erreur, correspond à celle obtenue précédemment sur cellules PC3.

En revanche, l'intensité maximale de fluorescence calculée à la suite de cette expérience ( $B_{max} = 0,000789$  RCU  $\times \mu\text{m}^2$ ) est 15 fois inférieure à celle obtenue sur cellules PC3, ce qui signifie que les cellules PC3-pip possèdent une densité de récepteurs 15 fois inférieure à celle des PC3.

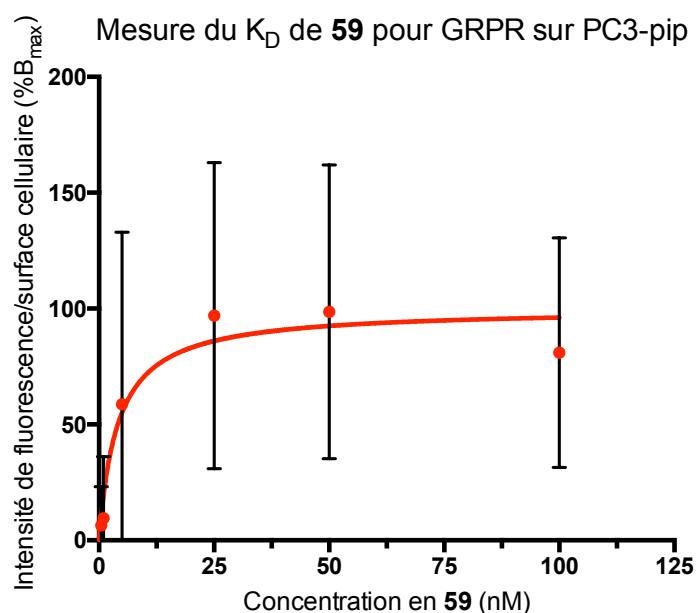


Figure 141 : Intensité de fluorescence/Surface occupée par les cellules (normalisée par  $B_{max} = 0,000789$  RCU/ $\mu\text{m}^2$ ) en fonction de la concentration en **59** sur cellules PC3-pip

De la même manière que précédemment, les valeurs obtenues sont accompagnées d'importantes barres d'erreur. Cependant, les constantes de dissociation obtenues sont du même ordre de grandeur, suggérant la reproductibilité de notre méthode.

## Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons dans un premier temps présenté la synthèse de cinq différentes sondes fluorescentes originales et spécifiques de 3 protéines : CXCR4, PSMA et GRPR. Le composé **59**, a été utilisé avec succès pour développer une méthode de caractérisation novatrice nous permettant de nous affranchir de la radioactivité pour l'évaluation préliminaire de nos composés.

Dans un premier temps, la constante de dissociation du composé **59** vis-à-vis de GRPR a été évaluée sur deux lignées cellulaires GRPR<sup>+</sup> différentes : PC3 et PC3-pip. Ces deux expériences ont tout d'abord permis d'attester de la reproductibilité de notre approche. Ensuite, elles ont montré que les cellules PC3 ont une densité membranaire de récepteur GRPR 15 fois supérieure à celle des PC3-pip.

Dans un second temps, nous avons développé une méthode de détermination de la constante de dissociation de ligands non radioactifs par compétition avec un ligand fluorescent. Cette nouvelle méthode a été exemplifiée avec la détermination du  $K_i$  de la bombésine. Cet essai fut un succès puisque nous avons obtenu une constante de dissociation apparente correspondant à ce qui est décrit dans la littérature.

Toutes les valeurs présentées dans ce chapitre doivent cependant être nuancées. En effet, les résultats que nous avons obtenus étaient tous accompagnés d'écart-types importants ce *qui in fine* résulte en une imprécision importante (*Figure 138, Figure 140, Figure 141*). Nous attribuons ces variations à une distribution inhomogène des cellules dans les puits, due au décrochage de certaines cellules en raison des lavages successifs. Ainsi, la méthode que nous proposons aujourd'hui nécessite encore un travail d'optimisation afin de limiter ce phénomène au maximum. De plus, en raison de la sensibilité des caméras disponibles sur le marché, les mesures de fluorescence sont par nature moins précises que les mesures de radioactivité. Ainsi nous envisageons, avant tout, cette technique comme un outil pour sélectionner rapidement un ou une série de ligands prometteurs, qui devront ensuite être caractérisés plus précisément en utilisant des ligands radiomarqués.

Dans le cadre de la caractérisation des ligands hétérobivalents présentés dans le chapitre 1, nous planifions d'effectuer trois séries d'expériences (avec les composés **13**, **31** et **32**) qui auront deux objectifs. Le premier sera de déterminer le nombre optimal de résidus  $\beta$  Alanine nécessaire entre les vecteurs pour obtenir une affinité maximale pour les biomarqueurs ciblés. Le second objectif sera d'estimer l'apport des interactions bivalentes sur l'affinité de chacun des récepteurs. Pour ce faire, nous avons d'ores et déjà planifié une série d'expériences consistant à évaluer l'affinité de nos ligands bivalents pour chacun des récepteurs ciblés, dans un premier temps sans ajout de compétiteur, et dans un second en ajoutant un large excès en ligand non marqué ciblant l'autre récepteur de manière à bloquer toute interaction entre notre ligand hétérobivalent et la deuxième cible.

Ainsi les différences d'affinité obtenues entre deux expériences nous permettront de quantifier l'apport de l'interaction bivalente sur l'affinité des ligands hétérobivalents.

En suivant cet objectif, nous avons déjà réalisé avec succès le marquage au gallium naturel du composé **13** à partir de nitrate de gallium. L'affinité de  $^{nat}\text{Ga-13}$  pour GRPR et PSMA sera prochainement évaluée en suivant les protocoles décrits dans le paragraphe précédent.

## Bibliographie

- (1) Pollard, T. D. A Guide to Simple and Informative Binding Assays. *Mol. Biol. Cell* **2010**, *21* (23), 4061–4067. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-08-0683>.
- (2) Mansi, R.; Wang, X.; Forrer, F.; Waser, B.; Cescato, R.; Graham, K.; Borkowski, S.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R. Development of a Potent DOTA-Conjugated Bombesin Antagonist for Targeting GRPr-Positive Tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2011**, *38* (1), 97–107. <https://doi.org/10.1007/s00259-010-1596-9>.
- (3) Benešová, M.; Schäfer, M.; Bauder-Wüst, U.; Afshar-Oromieh, A.; Kratochwil, C.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Kopka, K.; Eder, M. Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer. *J Nucl Med* **2015**, *56* (6), 914–920. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.147413>.
- (4) Liolios, C.; Schäfer, M.; Haberkorn, U.; Eder, M.; Kopka, K. Novel Bispecific PSMA/GRPr Targeting Radioligands with Optimized Pharmacokinetics for Improved PET Imaging of Prostate Cancer. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (3), 737–751. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00687>.
- (5) Demmer, O.; Frank, A. O.; Hagn, F.; Schottelius, M.; Marinelli, L.; Cosconati, S.; Brack-Werner, R.; Kremb, S.; Wester, H.-J.; Kessler, H. A Conformationally Frozen Peptoid Boosts CXCR4 Affinity and Anti-HIV Activity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (32), 8110–8113. <https://doi.org/10.1002/anie.201202090>.
- (6) Zboralski, D.; Hoehne, A.; Bredenbeck, A.; Schumann, A.; Nguyen, M.; Schneider, E.; Ungewiss, J.; Paschke, M.; Haase, C.; von Hacht, J. L.; Kwan, T.; Lin, K. K.; Lenore, J.; Harding, T. C.; Xiao, J.; Simmons, A. D.; Mohan, A.-M.; Beindorff, N.; Reineke, U.; Smerling, C.; Osterkamp, F. Preclinical Evaluation of FAP-2286 for Fibroblast Activation Protein Targeted Radionuclide Imaging and Therapy. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2022**. <https://doi.org/10.1007/s00259-022-05842-5>.
- (7) de Jong, L. A. A.; Uges, D. R. A.; Franke, J. P.; Bischoff, R. Receptor–Ligand Binding Assays: Technologies and Applications. *J. Chromatogr. B* **2005**, *829* (1–2), 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.10.002>.
- (8) Flanagan, C. A. GPCR-Radioligand Binding Assays. In *Methods in Cell Biology*; Elsevier, 2016; Vol. 132, pp 191–215. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.11.004>.
- (9) Bylund, B.; Toews, L. Radioligand Binding Methods: Practical Guide and Tips. *Am. J. Physiol-lung C.* **1993**, *265* (5), L421–L429.
- (10) Cheng, Y.-C.; Prusoff, W. H. Relationship Between The Inhibition Constant And The Concentration Of Inhibitor Which Causes 50 Per Cent Inhibition Of An Enzymatic Reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108.
- (11) Heimbrook, D. C.; Saari, W. S.; Balishin, N. L.; Fisher, T. W.; Friedman, A.; Kiefer, D. M.; Rotberg, N. S.; Wallen, J. W.; Oliff, A. Gastrin Releasing Peptide Antagonists with Improved Potency and Stability. *J. Med. Chem.* **1991**, *34* (7), 2102–2107. <https://doi.org/10.1021/jm00111a027>.
- (12) Fujii, N.; Oishi, S.; Hiramatsu, K.; Araki, T.; Ueda, S.; Tamamura, H.; Otaka, A.; Kusano, S.; Terakubo, S.; Nakashima, H.; Broach, J. A.; Trent, J. O.; Wang, Z.; Peiper, S. C. Molecular-Size Reduction of a Potent CXCR4-Chemokine Antagonist Using Orthogonal Combination of Conformation- and Sequence-Based Libraries. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42* (28), 3251–3253. <https://doi.org/10.1002/anie.200351024>.
- (13) 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>.

(14) Fischer, E.; Jourdan, F. Ueber die Hydrazine der Brenztraubensäure. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1883**, *16* (2), 2241–2245. <https://doi.org/10.1002/cber.188301602141>.

(15) Valverde, I. E.; Huxol, E.; Mindt, T. L. Radiolabeled Antagonistic Bombesin Peptidomimetics for Tumor Targeting: Radiopeptidomimetics. *J. Label Compd. Radiopharm* **2014**, *57* (4), 275–278. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3162>.

(16) Hoenke, S.; Serbian, I.; Deigner, H.-P.; Csuk, R. Mitocanic Di- and Triterpenoid Rhodamine B Conjugates. *Molecules* **2020**, *25* (22), 5443. <https://doi.org/10.3390/molecules25225443>.

(17) Poschenrieder, A.; Schottelius, M.; Schwaiger, M.; Kessler, H.; Wester, H.-J. The Influence of Different Metal-Chelate Conjugates of Pentixafor on the CXCR4 Affinity. *EJNMMI Res.* **2016**, *6* (1), 36. <https://doi.org/10.1186/s13550-016-0193-8>.

(18) Jarmoskaite, I.; AlSadhan, I.; Vaidyanathan, P. P.; Herschlag, D. How to Measure and Evaluate Binding Affinities. *eLife* **2020**, *9*, e57264. <https://doi.org/10.7554/eLife.57264>.

(19) Hulme, E. C.; Trevethick, M. A. Ligand Binding Assays at Equilibrium: Validation and Interpretation: Equilibrium Binding Assays. *Brit. J. Pharmacol.* **2010**, *161* (6), 1219–1237. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00604.x>.

(20) Uehara, H.; González, N.; Sancho, V.; Mantey, S. A.; Nuche-Berenguer, B.; Pradhan, T.; Coy, D. H.; Jensen, R. T. Pharmacology and Selectivity of Various Natural and Synthetic Bombesin Related Peptide Agonists for Human and Rat Bombesin Receptors Differs. *Peptides* **2011**, *32* (8), 1685–1699. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.06.017>.

(21) Llinares, M.; Devin, C.; Chaloin, O.; Azay, J.; Noel-Artis, A. M.; Bernad, N.; Fehrentz, J. A.; Martinez, J. Syntheses and Biological Activities of Potent Bombesin Receptor Antagonists: Bombesin Receptor Antagonists. *The Journal of Peptide Research* **1999**, *53* (3), 275–283. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.1999.00028.x>.

(22) Gourni, E.; Mansi, R.; Jamous, M.; Waser, B.; Smerling, C.; Burian, A.; Buchegger, F.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R. N-Terminal Modifications Improve the Receptor Affinity and Pharmacokinetics of Radiolabeled Peptidic Gastrin-Releasing Peptide Receptor Antagonists: Examples of <sup>68</sup>Ga- and <sup>64</sup>Cu-Labeled Peptides for PET Imaging. *J Nucl Med* **2014**, *55* (10), 1719–1725. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.141242>.

(23) Gourni, E.; Demmer, O.; Schottelius, M.; D'Alessandria, C.; Schulz, S.; Dijkgraaf, I.; Schumacher, U.; Schwaiger, M.; Kessler, H.; Wester, H.-J. PET of CXCR4 Expression by a <sup>68</sup>Ga-Labeled Highly Specific Targeted Contrast Agent. *J Nucl Med* **2011**, *52* (11), 1803–1810. <https://doi.org/10.2967/jnumed.111.098798>.



**Développement d'un nouvel  
agent chélatant  
macrocyclique du zirconium-  
89 pour l'immunoTEP**



## Table des matières

<b>I. Introduction .....</b>	<b>213</b>
1. Anticorps et imagerie TEP .....	213
2. Propriétés physiques du zirconium-89 .....	213
3. État de l'art des agents chélatants du zirconium-89 .....	214
4. Objectif du projet .....	217
<b>II. Synthèse et évaluation d'un chélateur modèle .....</b>	<b>219</b>
1. Synthèse du chélateur modèle.....	219
2. Évaluation préliminaire du radio marquage de Cy-HOPO (73) au zirconium-89 .....	220
<b>III. Synthèse de deux dérivés bifonctionnels de Cy-HOPO.....</b>	<b>221</b>
1. Synthèse de para-aminobenzyl-Cy-HOPO (76).....	221
2. Formation d'un dérivé bifonctionnel par addition d'un groupement dissymétrique : synthèse de 82.....	222
<b>IV. Bioconjugaison à un anticorps.....</b>	<b>224</b>
1. Bioconjugaison « site-spécifique » par cycloaddition sur une fonction azoture .....	224
A. Contexte .....	224
B. Fonctionnalisation des composés 76 et 82 avec une fonction BCN .....	225
2. Bioconjugaison statistique via une fonction isothiocyanate .....	226
A. Contexte .....	226
B. Fonctionnalisation de 76 avec une fonction isothiocyanate .....	226
3. Bioconjugaison <i>via</i> une fonction alkoxyquaramide .....	227
A. Contexte .....	227
B. Fonctionnalisation de 76 avec une fonction éthoxyquaramide .....	228
4. Conjugaison au trastuzumab et test de stabilité dans le sérum humain .....	228
A. Conjugaison au trastuzumab.....	228
B. Test de stabilité du complexe [89Zr]Zr-84-trastuzumab à la transchélation et dans le sérum humain 229	
<b>Conclusions et perspectives.....</b>	<b>230</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>231</b>

## I. Introduction

### 1. Anticorps et imagerie TEP

Comme expliqué dans l'introduction de cette thèse, les anticorps, en raison de leur taille importante (environ 150 kDa), ont des temps de circulation très longs en comparaison avec d'autres traceurs radioactifs comme le [ $^{18}\text{F}$ ]F-FDG ou le [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-TOC<sup>1</sup>. N'étant pas excrétés par voie rénale, ils restent localisés principalement dans le système vasculaire, et, de là, ils diffusent vers le récepteur ciblé. En raison de leur taille, cette diffusion est également lente et par conséquent, la concentration maximale d'anticorps à la surface des tissus exprimant l'antigène n'est atteinte que plusieurs jours après l'injection de l'anticorps.

Cette pharmacocinétique particulière dresse un cahier des charges difficile pour les radiopharmaciens qui ont à radiomarquer des anticorps. En effet, d'une part, il faut trouver des radioisotopes à longue demi-vie qui obéissent aux pré-requis de la radiopharmacie (facilement synthétisables, chaîne de décroissance courte, isotopes-fils directs non-radioactifs ou inoffensifs, nombre de modes de désintégration le plus petit possible). D'autre part, il est nécessaire de trouver un chélateur capable de former un complexe avec le radiométal qui soit stable *in vivo* pendant plusieurs jours ou semaines, et qui puisse se former à 37 °C (sous peine de dénaturer la protéine à des températures plus élevées). Certains complexes comme l'indium-111-DTPA remplissent ce cahier des charges pour l'imagerie TEMP<sup>2</sup>.

Toutefois, depuis le début des années 2010, les équipes de Jason Lewis et Guus Van Dongen ont proposé l'utilisation de zirconium-89 en combinaison avec les anticorps et ont su imposer ce radiométal comme l'isotope de choix pour l'imagerie TEP des tumeurs avec des anticorps (immunoTEP)<sup>3,4</sup>.

### 2. Propriétés physiques du zirconium-89

Le zirconium est un métal de transition. Il se situe sur la cinquième période du tableau périodique et son numéro atomique est 40. L'isotope zirconium-89, est d'un intérêt tout particulier pour l'imagerie TEP. En effet, ce dernier se désintègre en  $^{89\text{m}}\text{Y}$  en émettant un positron et en absorbant un électron. Le  $^{89\text{m}}\text{Y}$  se désintègre à son tour en  $^{89}\text{Y}$ , qui est stable, en émettant un photon gamma d'énergie 909 keV (Figure 142)<sup>3,5</sup>.

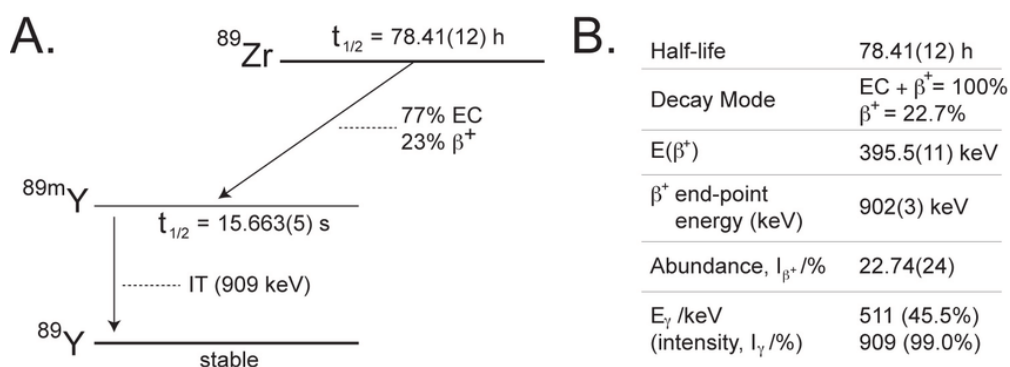


Figure 142 : Schéma simplifié de la désintégration du zirconium-89 (A) ainsi que quelques caractéristiques importantes de sa désintégration (B) (tiré de la littérature<sup>3</sup>)

Comme décrit précédemment c'est l'émission d'un positron qui permet, après annihilation avec un électron et production de deux photons gamma, de réaliser de l'imagerie moléculaire. Le zirconium-89 est particulièrement intéressant en raison de sa demi-vie de 78,4 h. Celle-ci est en adéquation avec la durée de circulation des anticorps dans l'organisme et fait de cet isotope le candidat idéal pour le marquage des biomolécules ayant un poids moléculaire élevé pour l'immunoTEP<sup>5</sup>. De plus, les positrons émis par le zirconium-89 ont une énergie cinétique relativement faible de 395 keV, ce qui signifie qu'ils voyagent sur de courtes distances (en moyenne 1,27 mm<sup>6</sup>) avant de rencontrer un électron et d'être annihilés. Cela a pour conséquence de conférer une haute résolution aux images TEP<sup>7</sup>.

Une autre propriété intéressante du zirconium-89 est sa rémanence intracellulaire après internalisation du traceur. Le radiométal complexé se retrouve piégé dans le lysosome après dégradation catabolique de l'anticorps internalisé<sup>8</sup>. Cela conduit à une meilleure rétention du radioisotope, et donc du signal dans la cellule, contrairement à des radioéléments non rémanents, comme l'iode-124, qui n'est pas retenus dans les cellules après la digestion de l'anticorps, et est rapidement excrétés sous forme d'iodotyrosine<sup>8</sup>.

### 3. État de l'art des agents chélatants du zirconium-89

Le  $Zr^{4+}$  étant tout comme le  $Fe^{3+}$  un cation dur, il est démontré qu'ils ont une affinité similaire pour les mêmes ligands<sup>9</sup>. La déferrioxamine (également connue sur le nom de desferrioxamine B, desferoxamine B, Desferal, MPO-B, DFOB, DFB ou DFO) est la molécule la plus utilisée pour la chélation du  $Zr^{4+}$ . La DFO est une molécule affine de cations trivalents ( $Fe^{3+}$ ,  $Al^{3+}$ ). Elle a été découverte sous sa forme de complexe de fer (III), la ferrioxamine B dans le cadre d'une collaboration entre la société Ciba et l'École Polytechnique Fédérale de Zurich lors de travaux sur les ferrimycines, des antibiotiques à base de fer. La ferrioxamine B est un sidérophore, un transporteur de fer produit par les bactéries du genre *actynomyces* et l'espèce *streptomyces pilosus*. Lorsque le fer est retiré de la ferrioxamine B par voie chimique, on obtient la desferrioxamine B. En raison de la stabilité des complexes qu'elle forme avec l'aluminium et le fer, ainsi que sa spécificité pour ces derniers, la DFO est utilisée comme médicament pour soigner de multiples maladies liées à ces métaux comme l'anémie microcytaire ou la thalassémie majeure<sup>10</sup>. Le potentiel de la desferrioxamine B comme agent chélatant a depuis été utilisé pour l'imagerie nucléaire. Elle est aujourd'hui le standard en matière de chélateurs du  $^{89}Zr$  pour l'immunoTEP<sup>3,11</sup>. Par conséquent, il existe une pléthore de versions bifonctionnelles de cette dernière<sup>5</sup>.

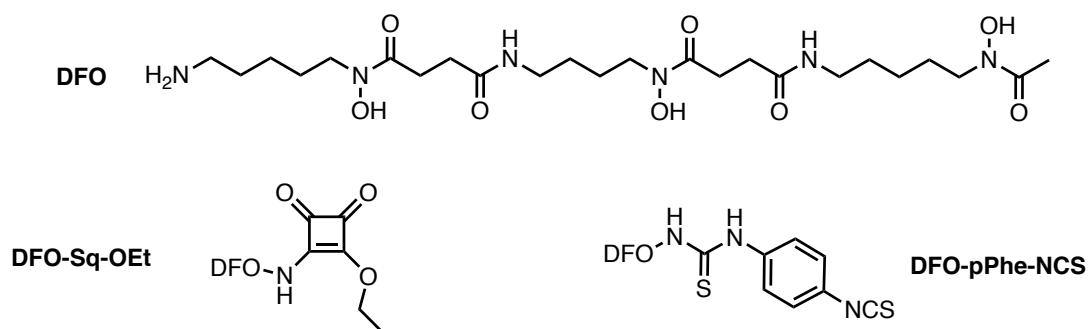


Figure 143 : Structure de la DFO ainsi que de deux versions bifonctionnelles de celle-ci : DFO-pPhe-NCS et DFO-Sq-OEt

Cependant, en dépit de son excellente affinité, il s'avère que la DFO n'est pas le ligand idéal pour le  $Zr^{4+}$ . En effet, des études de biodistribution *ex vivo* ont montré que, lorsqu'un complexe de DFO conjugué au trastuzumab (anticorps modèle anti-HER2) et marqué au zirconium-89 est administré à des souris, une fixation non spécifique est observée dans les os<sup>12,13</sup>. La fixation de radioactivité peut aller jusqu'à 10 %ID/g à 6 jours post-injection<sup>14</sup>. Le fait que cette radioactivité s'accumule uniquement dans les os suggère qu'il s'agit d'un relargage du cation  $^{89}Zr^{4+}$ . Une fois libre, le cation radioactif se lie à l'hydroxyapatite des os chargée négativement, ce qui peut résulter en une irradiation de la moelle osseuse, très radiosensible, et une diminution du contraste des images. Cette instabilité *in vivo* est à l'origine d'une recherche très active de nouveaux chélateurs du  $^{89}Zr$ , formant des complexes plus stables. Il est à noter cependant que l'accumulation du  $^{89}Zr$  dans les os est moins importante chez l'Homme que chez la souris<sup>15</sup>.

Cette stabilité insuffisante est essentiellement attribuée à l'hexadenticité de la DFO. En effet, le Zr(IV), un métal oxophile, est octavalent, et dans les complexes de DFO-Zr, sa sphère de coordination est complétée par de l'eau ou autres ligands faibles (Figure 144)<sup>16</sup>.

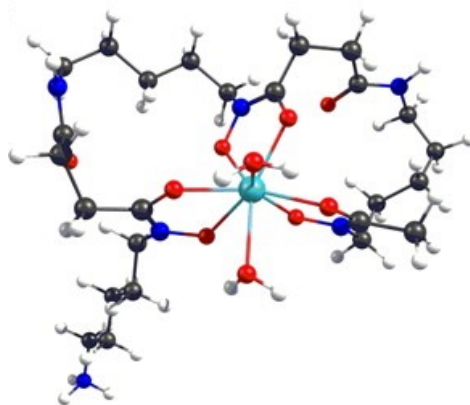


Figure 144 : Structure DFT optimisée du complexe  $[^{89}Zr(HDFO)\text{-cis}\text{-}(H_2O)_2]^{2+}$  proposée par Holland et al.<sup>16</sup>

En conséquence, un ligand octadentate substitué par des atomes donneurs durs, de préférence oxygénés, serait plus efficace pour la chélation du cation  $Zr(IV)$ <sup>17</sup>. Le groupe de Thomas L. Mindt a proposé une version entendue de la DFO, qu'ils ont nommé DFO\* et le complexe  $[^{89}Zr]Zr\text{-DFO}^*$  a montré une stabilité bien supérieure au  $[^{89}Zr]Zr\text{-DFO}$  *in vitro*<sup>18</sup>. Une fois conjugué à un anticorps modèle, le trastuzumab, les performances de la DFO\* se sont avérées supérieures à celles de la DFO. Une étude comparative menée par l'équipe de Van Dongen et Vugts a montré que, 72 h *post-injection*, de la radioactivité pouvait être observée dans les os lors de l'utilisation de DFO-trastuzumab alors que celle-ci n'est pas observée lors de l'utilisation de DFO\* (Figure 145)<sup>19</sup>.

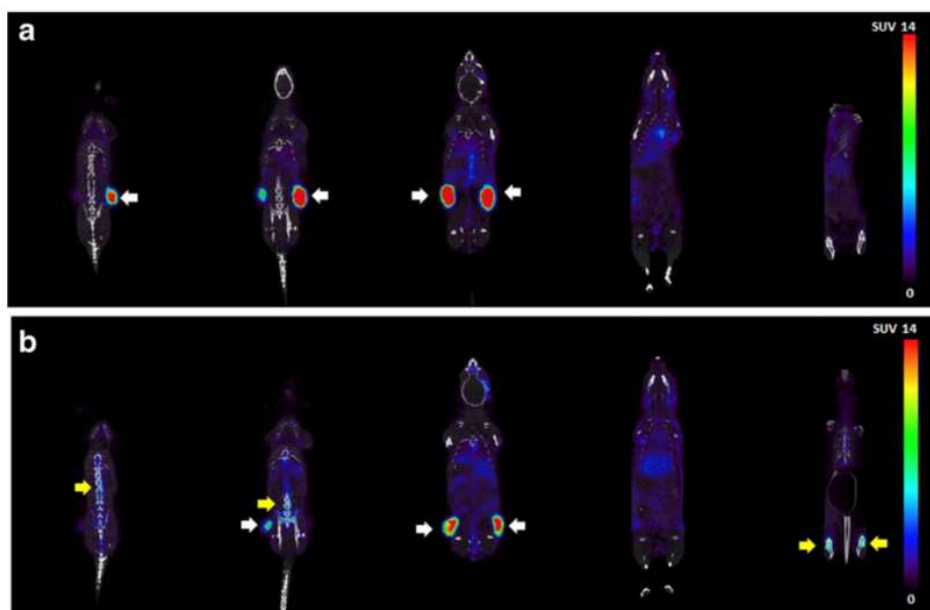
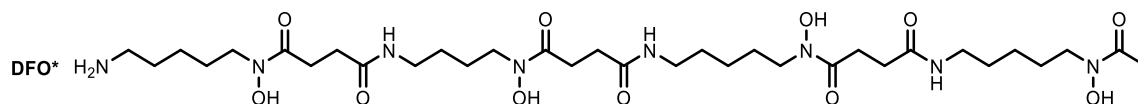


Figure 145 : Structure de la DFO\* (haut) et images TEP/CT de souris portant des tumeurs N87. Les images ont été enregistrées 72 h après injection de 100  $\mu\text{g}$  (2 MBq) de  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}^*\text{-trastuzumab}$  (a), ou de  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-trastuzumab}$  (b) Les tumeurs sont indiquées par les flèches blanches, la rétention dans les os par les flèches jaunes (tiré de la littérature<sup>19</sup>).

En 2015, Jason S. Lewis et son équipe ont publié des travaux sur un nouvel agent chélatant octavalent bifonctionnel pour l'immunoTEP au zirconium-89. Cette molécule, qu'ils ont nommée HOPO, n'est pas basée sur des structures de type polyhydroxamate linéaire mais sur l'utilisation d'autres mimes de sidérophores naturels telles que les N-hydroxypyridinones proposés par Gorden *et al.* en 2003 pour la chélation du plutonium<sup>20</sup>. Ce nouvel agent chélatant est composé de quatre groupements 1,2-hydroxypyridinone attachés à un squelette spermine (Figure 146)<sup>21</sup>. Le conjugué  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-HOPO-trastuzumab}$  a montré une rétention du radiométal dans les os plus faible que celle observée avec la DFO dans les modèles murins, suggérant une meilleure stabilité du complexe  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-HOPO}$  comparée au complexe  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}$ . Une structure cristallographique de ce complexe a également été obtenue et a démontré que le HOPO complète entièrement la sphère de coordination du Zr(IV) (Figure 146)<sup>21</sup>.

De manière plus surprenante, en 2016, Pandya et al. ont montré que les polyazamacrocycles pouvaient être de bons chélateurs du Zr(IV). Ils ont, avec succès, réussi à complexer le Zr(IV) avec du DOTA, et ont même obtenu une structure cristallographique de ce dernier (Figure 146)<sup>22</sup>. Dans ce complexe, les atomes d'azote du macrocycle ainsi que les atomes d'oxygène des carboxylates complètent totalement la sphère de coordination du Zr(IV). Des études *in vivo* et *in vitro* ont été menées sur le  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DOTA}$  et ont démontré la supériorité du DOTA comparativement à tous les autres chélates, en termes de stabilité du complexe formé avec le Zr(IV). On attribue cette stabilité supérieure à l'effet macrocyclique. En effet, la préorganisation des bras chélatants du macrocycle confère un gain entropique lors de la formation du complexe, rendant ce dernier plus stable qu'avec des analogues linéaires (EDTA, DTPA)<sup>23</sup>. Cependant, la formation du complexe nécessite de chauffer à 90°C et l'utilisation d'une source

de zirconium non commerciale, le  $[^{89}\text{Zr}]\text{ZrCl}_4^{22}$ . Ceci limite considérablement le domaine d'application de ce complexe en imagerie, les anticorps ne supportant pas des températures si élevées. Cependant, une stratégie consistant à conjuguer l'anticorps modifié avec le radiocomplexe préformé permet d'envisager le radiomarquage d'anticorps par cette approche<sup>24</sup>.

L'ensemble de ces travaux ont permis de réfuter la thèse communément admise selon laquelle les tétraazamacrocycles et le zirconium-89 ne seraient jamais utilisés en imagerie TEP vectorisée par un anticorps. Elle démontre également que la pré-organisation apportée par le macrocycle permet d'obtenir un bon ligand de zirconium malgré la présence de fonctions chimiques telles que les amines et les carboxylates qui ne sont, en principe, pas idéales pour ce métal<sup>25</sup>.

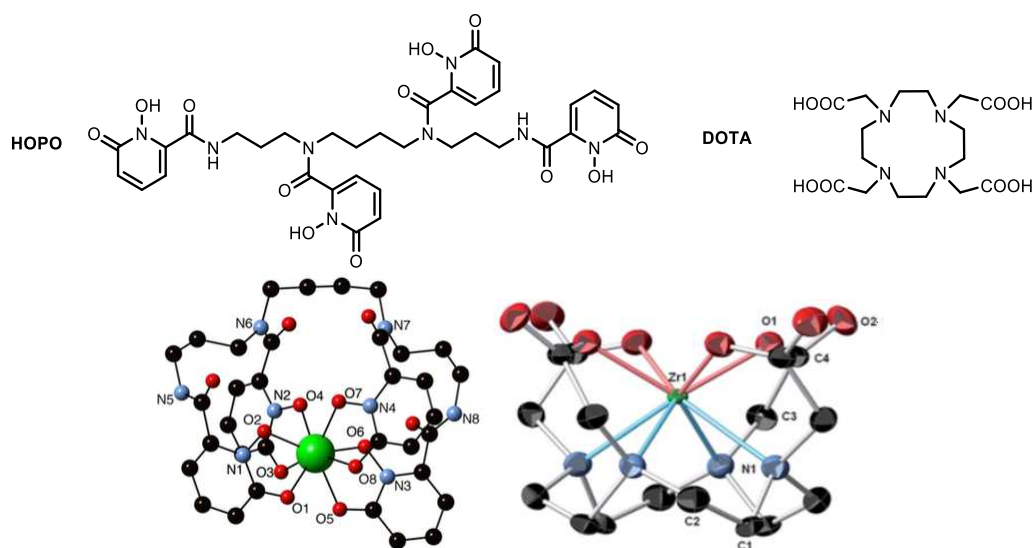


Figure 146 : Structure du ligand HOPO décrit par Lewis et al. (en haut à gauche), du DOTA (en haut à droite) ainsi que les structures cristallographiques des complexes Zr-HOPO (en bas à gauche) et du Zr-DOTA (en bas à droite)<sup>21,22</sup>

#### 4. Objectif du projet

L'objectif de ces travaux a été de développer un agent chélatant macrocyclique bifonctionnel, bioconjuguable, permettant la complexation du zirconium-89 dans des conditions douces (37 °C) et générant un complexe stable en milieu biologique en combinant l'effet macrocyclique à l'affinité des cations zirconium(IV) pour la structure *N*-hydroxypyridin-2-one (Figure 147).

Parallèlement à nos travaux, le groupe de Ga-Lai Law a publié des travaux décrivant cette molécule cible, qu'ils ont utilisée pour la préparation de complexes d'euprium<sup>26</sup>. Ce nouveau ligand, qu'ils ont nommé « Cy-HOPO » a démontré des propriétés intéressantes d'exaltation des propriétés de luminescence de l'euprium(III) en portant son rendement quantique global à 30,2 % avec un écart d'efficacité de sensibilisation de 64,6 % par rapport à un analogue du Cy-HOPO linéaire. Ces propriétés sont attribuées à la rigidité de l'édifice apportée par le macrocycle, ce qui conforte nos hypothèses.

Dans un premier temps, sera présentée la synthèse de Cy-HOPO, le ligand modèle non-bifonctionnel qui sera ensuite évalué en tant qu'agent chélatant du zirconium-89 : radiomarquage, stabilité et compétition avec d'autres agents chélatant.

Enfin, nous présenteront la synthèse de plusieurs dérivés bifonctionnel de Cy-HOPO, ainsi que l'évaluation de l'un deux : Bioconjugaison au trastuzumab, radiomarquage et stabilité dans le sérum humain.

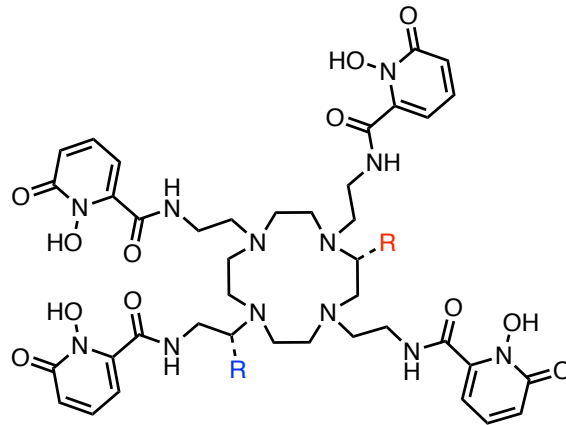


Figure 147 : Structure du Cy-HOPO bifonctionnel où R représente une fonction de greffage potentielle à un anticorps.

## II. Synthèse et évaluation d'un chélateur modèle

### 1. Synthèse du chélateur modèle

Afin de valider notre hypothèse, nous avons entrepris la synthèse de la molécule modèle Cy-HOPO, non-bifonctionnelle, à partir du cyclène. Nous avons tout d'abord réalisé la synthèse du chlorure d'acyle 1-hydroxypyridin-2-one **68** à partir de l'acide 6-hydroxypicolinique commercial. La première étape correspond à l'oxydation de l'acide 6-hydroxypicolinique par l'acide peracétique, préalablement préparé à partir d'un mélange d'anhydride acétique et de peroxyde d'hydrogène. Une fois isolé, le composé a été protégé par benzylation pour donner le composé **67** avec un rendement global de 45%. Pour finir, ce dernier a été activé sous forme de chlorure d'acyle par réaction avec le chlorure d'oxalyle, donnant **68** avec un rendement de 31% (Figure 148)<sup>27</sup>.

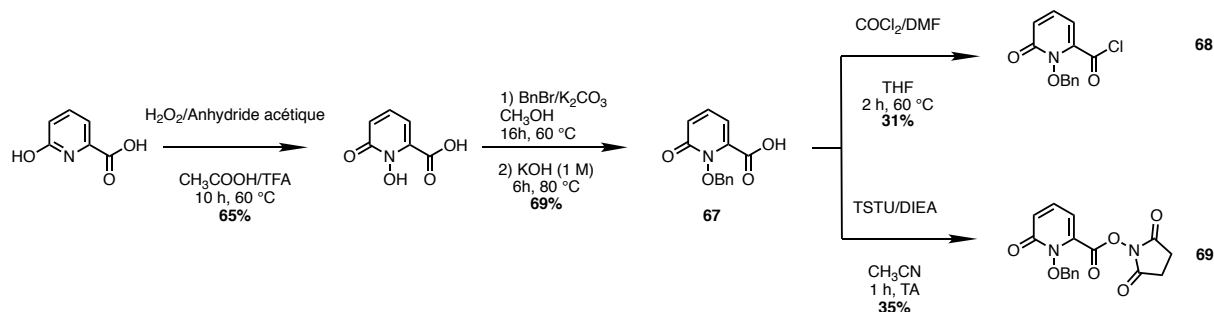


Figure 148 : Synthèse du chlorure d'acyle HOPOBn (haut) et du HOPOBn-NHS (bas)

Après alkylation du cyclène avec un excès de *N*-Boc-2-bromoéthylamine au reflux de l'acétonitrile en présence de carbonate de potassium, le composé **70** a été purifié par chromatographie en phase inverse. Les amines protégées par des groupements Boc de **70** ont été déprotégées dans un mélange d'acide trifluoroacétique et de dichlorométhane (50:50), donnant le macrocycle déprotégé **71**. Le composé **71** a ensuite été acylé par un excès du composé **68** fraîchement préparé en présence de triéthylamine, dans des conditions anhydres. Le composé **72** ainsi obtenu a ensuite été purifié par HPLC en phase inverse. Pour finir, les groupements hydroxamates ont été déprotégés par réaction avec le trichlorure de bore, menant au composé **73** (Figure 149)<sup>27</sup>.

Ainsi, le Cy-HOPO a été obtenu en 4 étapes avec un rendement global de 3%. Le rendement global diminue drastiquement lors des deux dernières étapes, soulignant la nécessité d'optimiser les méthodes d'acylation et de déprotection. Par exemple, Dai *et al.*<sup>26</sup> ont préféré utiliser la tosylazirine plutôt que de la *N*-Boc-bromoéthylamine pour l'alkylation du cyclène. Toutefois, cette méthode d'alkylation n'a pas été considérée, car les conditions d'hydrolyse d'un groupement tosylé ne sont pas compatibles avec la présence d'une fonction amine orthogonalement protégée pour permettre la bioconjugaison à l'anticorps.



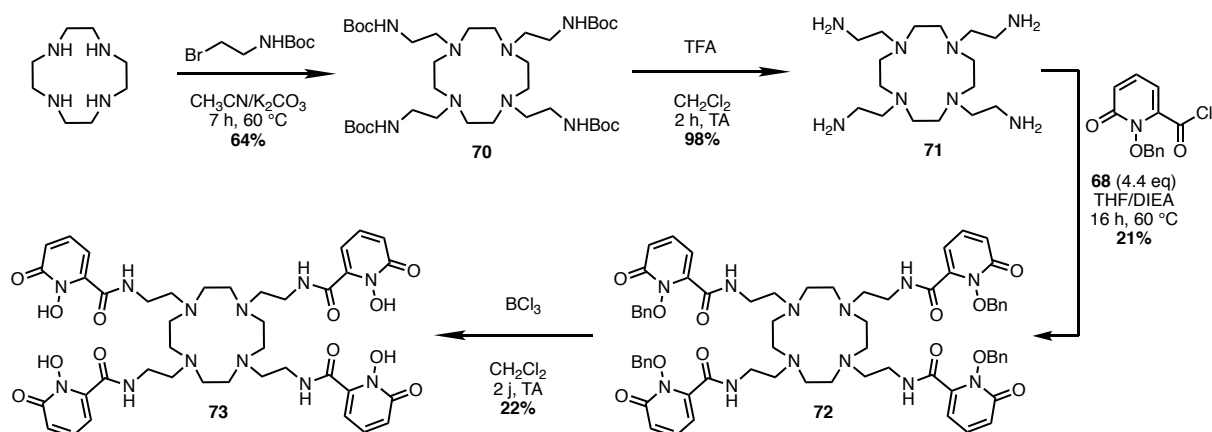


Figure 149 : Synthèse du ligand modèle **73** au départ du cyclène

## 2. Évaluation préliminaire du radio marquage de Cy-HOPO (**73**) au zirconium-89

Un essai de complexation du zirconium-89 par le composé **73** a été mené. Les expériences de radiomarquage ont été réalisées au Centre Georges François Leclerc à Dijon, par le Dr. Pierre Adumeau. Comme source de zirconium-89, nous avons choisi d'utiliser une solution d'oxalate de zirconium enrichi en zirconium-89,  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}(\text{oxalate})_2$ , dans l'acétonitrile (67,3  $\mu\text{M}$ , 3,3 MBq/nmol). L'agent chélatant **73** a été ajouté en excès (10 éq.) à la solution qui a ensuite été agitée à 37°C pendant 5 minutes. Un second essai a été effectué avec une température inférieure (20 °C, 5 min).

Dans le premier cas, la radio-CCM a révélé que le radionucléide a été complexé par le chélate **73** de façon quantitative (>99,9 %). Dans le second essai, 97 % du zirconium-89 était engagé dans un complexe avec **73**. Ces premiers essais de complexation nous ont apporté la preuve que le composé **73**, et par extension que des bras HOPO greffés sur un châssis de type cyclène, constitue un chélateur capable de former des complexes avec le zirconium-89 dans des conditions compatibles avec les anticorps en un temps limité. Afin de remplir le cahier des charges que nous nous étions fixé, nous avons effectué un test de stabilité du complexe  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-73}$ , côte à côte avec le complexe  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}$ , en présence d'un compétiteur (EDTA, 1000 éq.) (Figure 150). Après 5 jours, l'intégrité du complexe  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-73}$  était de 98 % contre 55 % pour le complexe  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}$  démontrant ainsi la supériorité du chélateur **73** à la DFO.

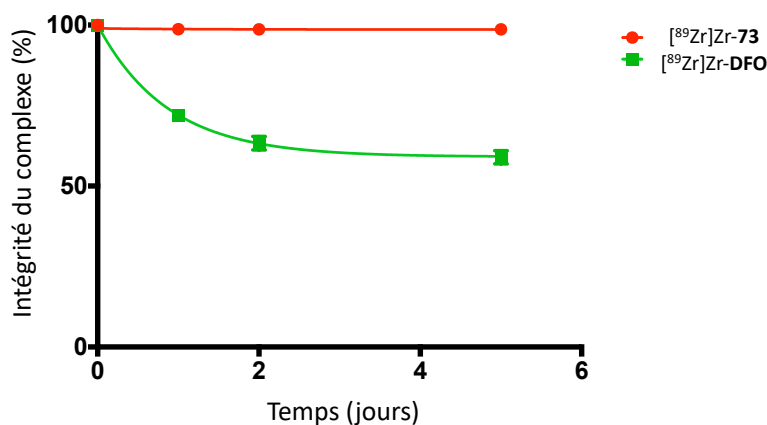


Figure 150 : Test de compétition entre  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-73}$  (rouge) ou  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}$  (vert) contre 1000 équivalents d'EDTA

### III. Synthèse de deux dérivés bifonctionnels de Cy-HOPO

Afin d'obtenir une version bifonctionnelle de **73**, deux stratégies ont été envisagées : une première au départ de *para*-nitrobenzylcyclène commercial et la seconde à partir du cyclène que nous avons fonctionnalisé à l'aide d'un groupement diamine dissymétrique. Dans le premier cas, le cyclène est fonctionnalisé au niveau d'un des atomes de carbone du cycle, dans le second, *via* un des atomes d'azote du cycle.

#### 1. Synthèse de *para*-aminobenzyl-Cy-HOPO (**76**)

Le *para*-nitrobenzylcyclène est un composé commercial. Étant fonctionnalisé sur un atome de carbone du macrocycle, il n'est pas nécessaire de modifier la stratégie de synthèse utilisée précédemment. La préparation du composé **74** est identique à celle du composé **71**, par réaction avec un excès de *N*-Boc-bromoéthylamine au reflux de l'acétonitrile en présence de carbonate de potassium. Après déprotection des groupements amine, le composé **74** a été obtenu avec un rendement global de 35% (Figure 151).

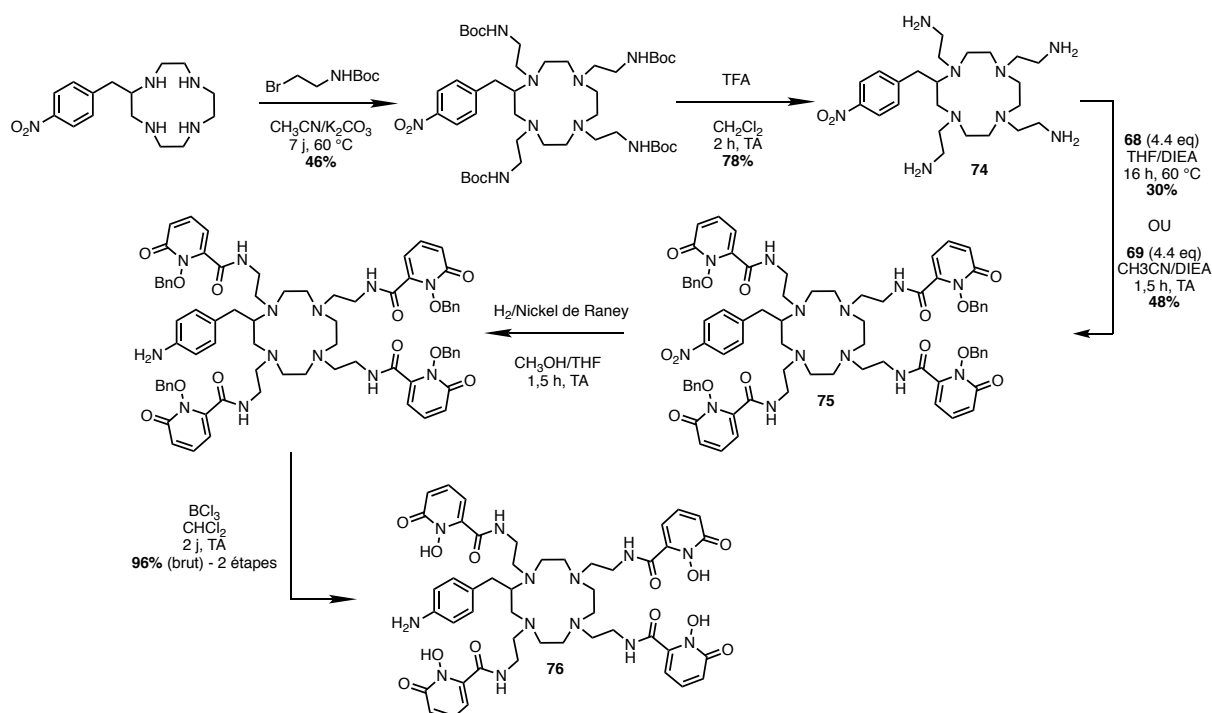


Figure 151 : Synthèse du composé **76** au départ du *p*-NO<sub>2</sub>-Bn-Cyclène disponible commercialement

Nous avons ensuite procédé à la fonctionnalisation du composé **74** avec des bras HOPO, tout d'abord à l'aide du chlorure d'acyle **68**. Nous avons rencontré cependant des difficultés que nous avons attribuées à une hydrolyse du chlorure d'acyle. Nous avons donc préparé un ester de *N*-hydroxysuccinimide **69** à partir de **67**, moins réactif mais pouvant être conservé à -20 °C, et qui conduit à de meilleurs rendements d'acylation (Figure 148). Le composé **75** a ensuite été isolé après chromatographie en phase inverse. Nous avons finalement réduit le groupement nitro en amine par hydrogénation catalytique en présence de nickel de Raney. Le choix s'est porté sur le nickel de Raney, car ce dernier est un catalyseur plus doux que le palladium sur

charbon qui menait à la dégradation du produit. Enfin, nous avons utilisé le trichlorure de bore pour déprotéger les groupements hydroxamates (*Figure 151*) et le composé **76** a été isolé par chromatographie en phase inverse. Ces cinq étapes de synthèse ont été réalisées avec un rendement global de 10% en utilisant le chlorure d'acyle **68** et 17% en utilisant l'ester de NHS **69**.

## 2. Formation d'un dérivé bifonctionnel par addition d'un groupement dissymétrique : synthèse de **82**

La deuxième stratégie que nous avons envisagée s'appuie sur la monoalkylation du cyclène par un groupement diamine dissymétrique. L'avantage de cette stratégie est double. Premièrement, elle exploite le cyclène au lieu du *para*-nitrobenzyl cyclène ce qui rend la synthèse bien moins onéreuse. Deuxièmement, la fonction de greffage pour le groupement destiné à la bioconjugaison est une amine aliphatique plutôt qu'aromatique. Par conséquent, elle est plus nucléophile et peut être substituée plus facilement. La stratégie repose donc sur l'obtention d'une diamine protégée de manière orthogonale. Cette dernière est synthétisée en partant du 1,3-diaminopropan-2-ol comme décrit dans la *Figure 152*. Cette synthèse a été reprise des travaux de Sim *et al.*<sup>28</sup>

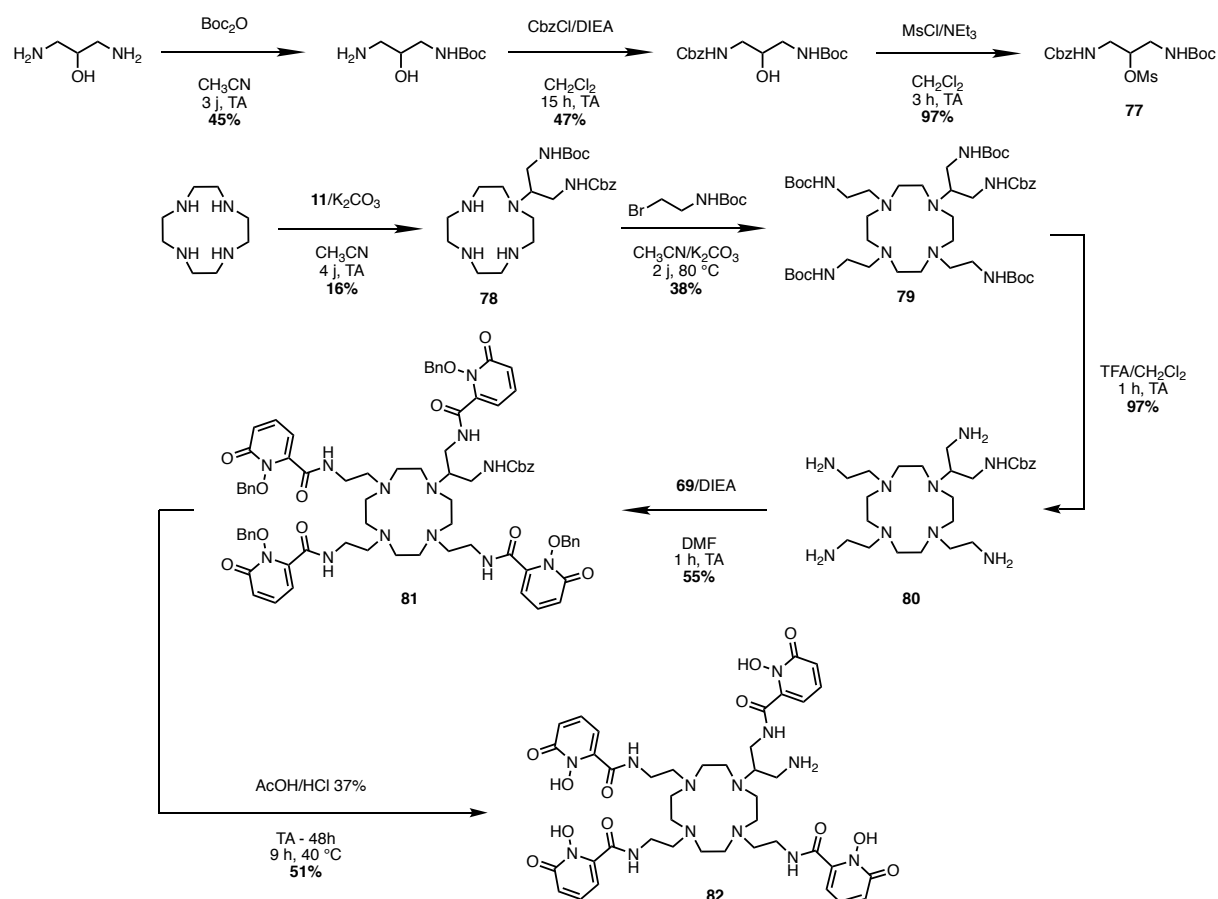


Figure 152 : Synthèse de **77** et synthèse de **82** au départ de **77**

Le mésylate **77** a ensuite été utilisé pour la monoalkylation du cyclène, en utilisant des conditions de haute dilution et une addition au goutte à goutte afin de rester en excès de macrocycle et ainsi limiter les réactions de di et tri-alkylation. Finalement, après purification

par chromatographie en phase inverse, le cyclène monoalkylé **78** a été mis à réagir avec un excès de *N*-Boc-bromoéthylamine dans le but d'alkyler les amines secondaires restantes. (*Figure 152*) Le composé **79** a enfin été purifié par chromatographie en phase inverse, avec un rendement total de 6 %. Par la suite, les amines protégées par des groupements Boc ont été déprotégées par un mélange acide trifluoroacétique/dichlorométhane (1 :1) menant au composé **80** sous la forme d'un sel de TFA avec un rendement de 97 %. Après acylation par le composé **69**, le bras HOPOBn a été couplé sur les amines primaires menant au composé **81** avec un rendement de 55 % après purification par chromatographie en phase inverse. Enfin, l'amine protégée par un groupement Cbz ainsi que les hydroxamates protégés par des benzyles ont été déprotégés en utilisant un mélange d'acide chlorhydrique et d'acide acétique dans un ratio 1:1 à température ambiante pendant 2 jours, puis à 40 °C pendant 9 h, donnant le produit final **82** avec un rendement de 51 % (*Figure 152*).

## IV. Bioconjugaison à un anticorps

### 1. Bioconjugaison « site-spécifique » par cycloaddition sur une fonction azoture

#### A. Contexte

Dans un premier temps, nous avons envisagé de réaliser une fonctionnalisation de l'anticorps par bioconjugaison « site-spécifique ». Dans cette stratégie, une fonction réactive, comme un azoture, est introduite de façon contrôlée sur un anticorps par ingénierie enzymatique. Puis, une fonction réactive vis-à-vis de l'azoture, comme un alcynes contraint, est mise en réaction avec l'anticorps modifié afin d'obtenir un anticorps modifié exclusivement sur des sites précis. L'avantage de ce type de fonctionnalisation est l'obtention d'un taux de greffage (TG ou DOL, *degree of labeling*) reproductible et homogène.

Afin de réaliser cette stratégie de bioconjugaison particulière, nous avons choisi d'utiliser la réaction SPAAC « *Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition* » entre une fonction bicyclononyne (BCN) et un azoture (Figure 153). Il s'agit d'une cycloaddition (3+2) dont la particularité est d'être réalisée à température ambiante et sans catalyseur grâce à la tension de cycle présente dans l'alcyne. En effet, les deux atomes de carbones hybridés *sp* admettent un angle C-C-C compris entre 158° et 163° alors qu'ils tendent naturellement à adopter une géométrie linéaire, et donc des angles de 180°. La réaction péricyclique permet de lever la tension du cycle au niveau des atomes de carbone *sp*, la géométrie du triazole étant favorable aux atomes de carbone hybridés *sp*<sup>2</sup> nouvellement formés<sup>29</sup>. Les alcynes et alcènes contraints sont donc des substrats de choix pour les réactions concertées utilisées en chimie de bioconjugaison (réactions de Diels-Alder, cycloadditions dipolaires, Diels-Alder à demande électronique inverse). Ici, le BCN a été choisi comme substrat pour sa cinétique de réaction rapide et sa symétrie, qui limite le nombre d'isomères obtenus après cycloaddition. L'azoture a été choisi, car son introduction par déglycosylation des chaînes glycosydiques des anticorps, suivie de glycosylation par un sucre azoturé est une technique maîtrisée au sein de notre laboratoire<sup>30</sup>.

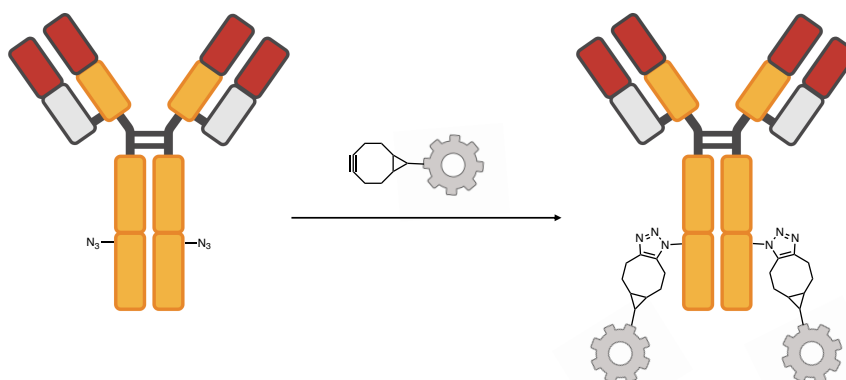


Figure 153 : Principe de bioconjugaison « site-spécifique » par SPAAC sur un anticorps modifié pour porter deux groupements azoture à l'aide d'une fonctionnalité (drogue, agent d'imagerie) greffée avec un groupement bicyclononyne

La SPAAC appartient à la famille des réactions dites de chimie « click ». L'avantage de la SPAAC comme réaction de bioconjugaison, est, dans un premier temps, qu'elle ne nécessite aucune étape d'activation, ni de catalyseur, contrairement à la réaction de Huisgen catalysée par le

cuivre (ou CuAAC)<sup>31</sup>, dont le catalyseur peut présenter une activité cytotoxique. Un autre désavantage de l'utilisation du Cu(I) est sa tendance à s'oxyder facilement en présence d'oxygène. Il est donc nécessaire d'utiliser un réducteur, usuellement l'ascorbate de sodium, pour régénérer le Cu(I). Ce cycle redox génère des ROS (*reactive oxygen species*), qui peuvent dégrader les biomolécules par oxydation<sup>32</sup>. De plus, ce catalyseur métallique peut être complexé par des agents chélatants.

Finalement, la SPAAC ne produit aucun produit secondaire puisque tous les atomes des réactifs se retrouvent impliqués dans les liaisons nouvellement formées. Enfin, sa bioorthogonalité permet de l'utiliser directement *in vivo*<sup>33</sup>. Pour nos travaux, nous avons utilisé le carbonate activé de l'endo-BCN, disponible commercialement.

## B. Fonctionnalisation des composés **76** et **82** avec une fonction BCN

Notre objectif a donc été de greffer un bras endo-BCN, par réaction du composé **76** avec le carbonate activé de l'endo-BCN. Cependant, nos tentatives n'ont pas mené à la formation du composé désiré. En raison de la non-formation du produit d'intérêt, que l'on attribue à un manque de réactivité de l'amine aromatique due à sa faible accessibilité, combinée à son faible caractère nucléophile, nous avons décidé d'abandonner cette méthode pour la fonctionnalisation du composé **76**.

Nous avons également réalisé la fonctionnalisation du composé **82** par un groupement BCN. Le suivi par HPLC-MS a confirmé la formation du produit d'intérêt **83** (Figure 154). Cependant, la cinétique de la réaction s'est avérée faible. La conversion n'était pas totale au bout de plusieurs jours, là où l'acylation d'une amine par l'ester activé commercial ne prend généralement que quelques minutes. De plus, en raison de la très faible quantité du macrocycle **82** dont nous disposons, nous n'avons pas été en mesure d'isoler le produit dans des quantités nous permettant d'effectuer la bioconjugaison sur un anticorps. C'est pourquoi nous avons décidé de nous focaliser sur une méthode de bioconjugaison plus usuelle, bien que non spécifique, la fonctionnalisation des lysines avec un groupement isothiocyanate.

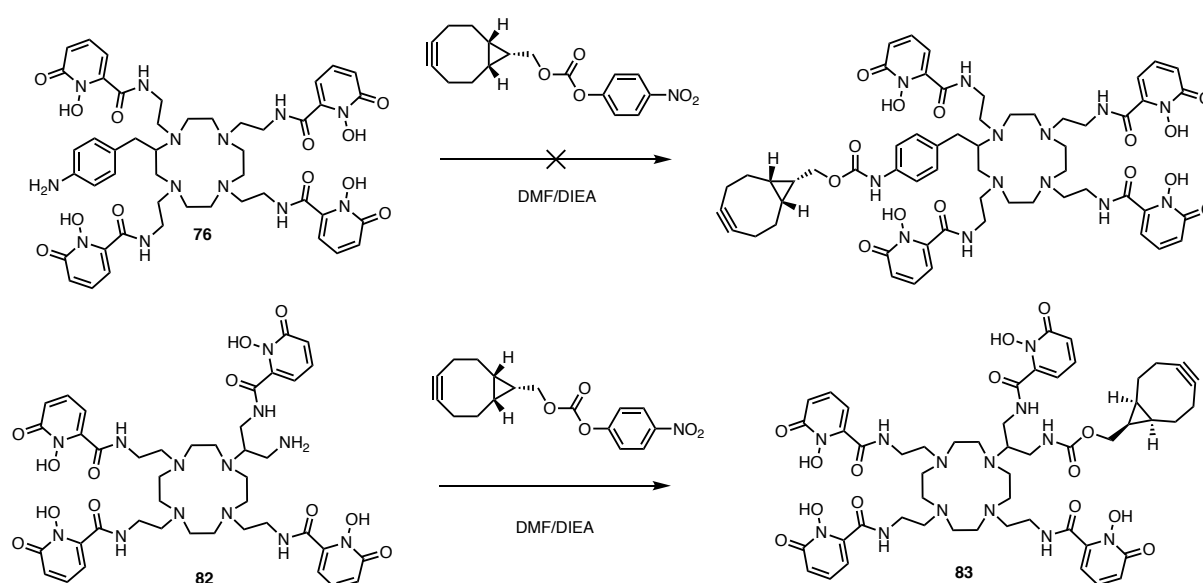


Figure 154 : Fonctionnalisation de **76** et **82** avec une fonction BCN.

## 2. Bioconjugaison statistique via une fonction isothiocyanate

### A. Contexte

L'utilisation d'un groupement isothiocyanate pour la conjugaison à un anticorps est une méthode de bioconjugaison classique. Elle repose sur l'attaque nucléophile des amines primaires des lysines naturellement présentes au sein des protéines pour donner un lien thiourée. (Figure 155) Le taux de greffage (« degree of labeling », DOL), dépendant (entre autres) du nombre d'équivalents  $n$  d'agent chélatant bifonctionnel mis en jeu, est déterminé habituellement par spectrométrie de masse.

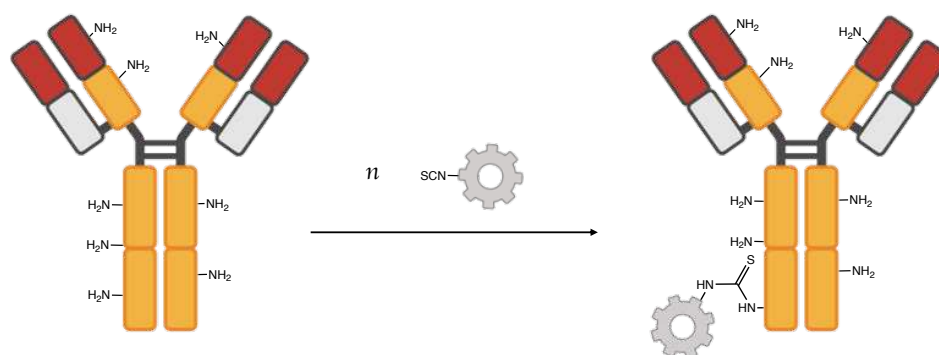


Figure 155 : Principe de bioconjugaison statistique par ciblage des lysines avec une fonction isothiocyanate.

En bioconjugaison, l'utilisation d'isothiocyanates aromatiques est privilégiée par rapport aux aliphatiques, car ces derniers sont trop réactifs pour être utilisés en milieu aqueux. C'est pourquoi seule la molécule **76** a été utilisée pour ce type de bioconjugaison.

### B. Fonctionnalisation de **76** avec une fonction isothiocyanate

Afin de transformer l'amine aromatique du macrocycle bifonctionnel **76** en groupement isothiocyanate, nous avons en premier lieu utilisé une méthode classique de formation d'isothiocyanates, à savoir la réaction avec le thiophosgène en milieu biphasique, dans le chloroforme et l'eau. Malheureusement, cette méthode ne nous a pas permis d'obtenir la molécule visée (Figure 156).

Nous avons ensuite utilisé un nouveau réactif pour la formation d'isothiocyanates, le di(2-pyridyl) thionocarbonate. Cette méthode a été choisie par Vugts *et al.* pour la synthèse d'une version bifonctionnelle de la DFO\*<sup>19</sup>. Le di(2-pyridyl) thionocarbonate a donc été introduit en excès, en phase homogène, dans un mélange eau/acétonitrile. Malheureusement, nous n'avons pas obtenu le produit désiré à l'aide de cette méthode (Figure 156). Plusieurs phénomènes peuvent être mis en avant pour expliquer cet échec. Premièrement, la gêne stérique causée par la présence des bras HOPO peuvent empêcher l'aniline, déjà peu nucléophile, de réagir. Deuxièmement, les fonctions hydroxamates étant nucléophiles, elles peuvent entrer en compétition avec l'aniline.

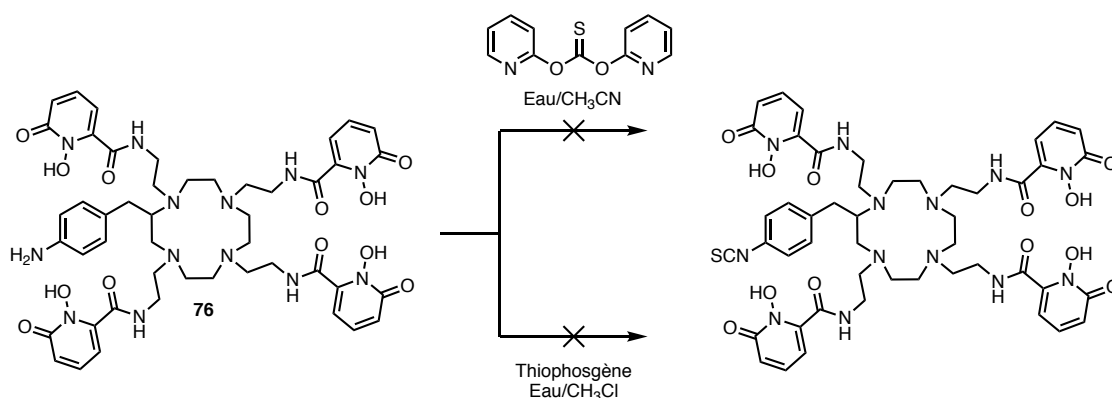


Figure 156 : Schéma réactionnel des tentatives de dérivation de 76 avec fonction isothiocyanate

### 3. Bioconjugaison *via* une fonction alkoxyquaramide

#### A. Contexte

Nous avons finalement décidé de nous tourner vers une méthode de bioconjugaison moins classique, à savoir le greffage sur les résidus lysine *via* la formation d'un lien squaramide<sup>34</sup>. Cette méthode repose sur l'addition séquentielle de fonctions amine sur le diéthyl squarate<sup>35</sup> (Figure 157). Elle est de plus en plus utilisée pour la conjugaison de biomolécules lors de la synthèse de radiopharmaceutiques<sup>36</sup>.

Dans un premier temps, la substitution d'un groupement alkoxy par une amine permet la formation d'un monoalkoxyquaramide. En effet, il a été démontré par Tietze *et al.*<sup>37</sup> qu'en utilisant des amines primaires ou secondaires on observait uniquement la formation du produit de monosubstitution étant observé pour des raisons cinétiques<sup>37</sup>. En effet, l'amidation du diester se produit beaucoup plus rapidement que l'amidation de l'ester-amide. Des simulations de D. Quiñero *et al.* suggèrent que la moindre réactivité de l'ester amide est due à une meilleure stabilisation aromatique comparée au dialkoxyquarate<sup>38</sup>. La seconde amidation est rendue possible par l'ajout d'une base dans le milieu réactionnel (Figure 157).

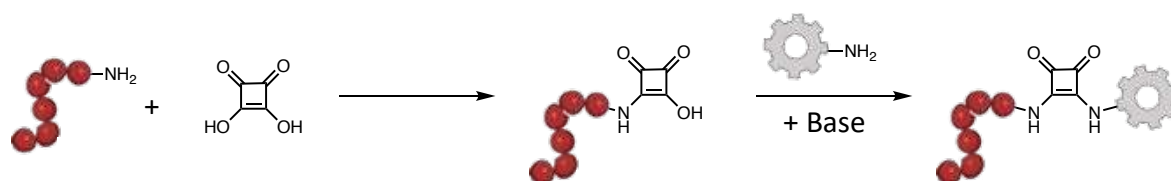


Figure 157 : Schéma du principe de bioconjugaison au départ du diéthylsquarate

Cette stratégie est de plus en plus utilisée pour la dérivation de peptides et de protéines. Un autre avantage de l'utilisation des squaramides comme lien de conjugaison est la stabilité du bioconjugué ainsi obtenu. Une étude de E. Berg *et al.*<sup>39</sup>, publiée en 2019, montre que les bioconjugués possédant un lien squaramide sont plus stables que les composés utilisant un lien de type thiourée obtenu par réaction d'un isothiocyanate avec une amine.

Il a en effet observé, par imagerie TEP, une plus forte accumulation de la radioactivité dans la vessie pour un bioconjugué obtenu à partir de dérivés isothiocyanates de la DFO et DFO\* que pour les mêmes bioconjugués utilisant un lien squaramide. Ceci suggère la formation de



complexes de zirconium-89 de faible poids moléculaire, probablement due à la rupture du lien thiourée par radiolyse<sup>39</sup>.

## B. Fonctionnalisation de 76 avec une fonction éthoxysquaramide

Afin d'obtenir notre dérivé squaramide, la molécule **76** a été mise à réagir avec 10 équivalents de diéthylsquarate dans un mélange eau/éthanol. Après 5,5 h de réaction à 50 °C, le produit d'intérêt a pu être purifié par chromatographie en phase inverse et le composé **84** isolé avec un rendement de 11 % (Figure 158).

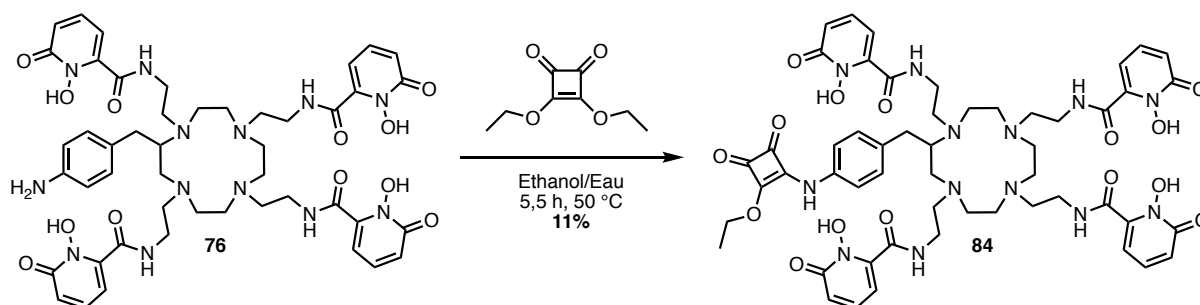


Figure 158 : Fonctionnalisation du composé **76** avec un groupement éthoxysquaramide

## 4. Conjugaison au trastuzumab et test de stabilité dans le sérum humain

### A. Conjugaison au trastuzumab

La bioconjugaison du composé **84** au trastuzumab a été effectuée dans un tampon PBS (*phosphate buffer saline*) à 37 °C pendant 1 h. L'excès de chélateur n'ayant pas réagi a été éliminé par purification sur une colonne d'exclusion stérique PD10 et le surplus de solvant a été retiré sur un dispositif ultrafiltration par centrifugation. Le DOL a été déterminé par spectrométrie de masse MALDI-TOF et était de 1,7 **84**/IgG (Figure 159).

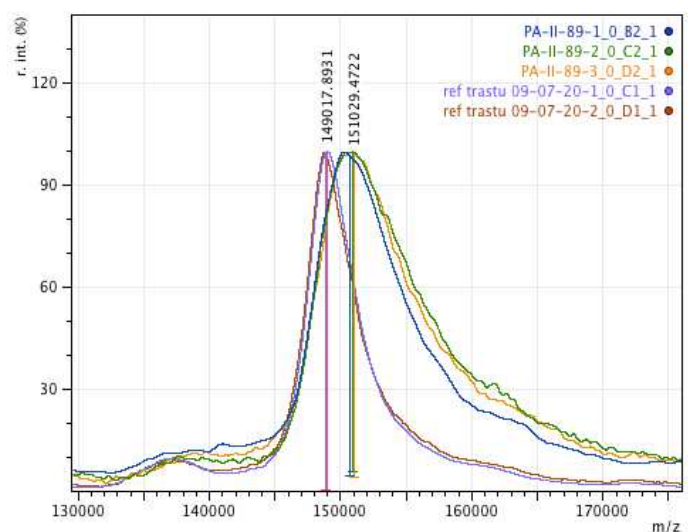


Figure 159 : Superposition des spectres de masse du trastuzumab (149017,8931) et de **76**-trastuzumab (151029,4722). La différence de masse entre l'anticorps et le conjugué détermine le taux de greffage de ce dernier.

## B. Test de stabilité du complexe $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-84-trastuzumab}$ à la transchélation et dans le sérum humain

Après radiomarquage de **84-trastuzumab** au moyen d'oxalate de zirconium enrichi en zirconium-89, la stabilité du complexe  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-84-trastuzumab}$  a été testée vis-à-vis de la transchélation en présence d'EDTA dans un premier temps, et de DFO dans un second. La stabilité de notre complexe a été évaluée côte à côte avec celle du complexe  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-trastuzumab}$ .

De la même manière que pour le ligand modèle, le complexe de zirconium-89 formé avec le Cy-HOPO-trastuzumab affiche une stabilité supérieure que ce soit contre l'EDTA ou contre la DFO. Cependant  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-84-trastuzumab}$  montre une très faible stabilité dans le sérum humain (Figure 160).

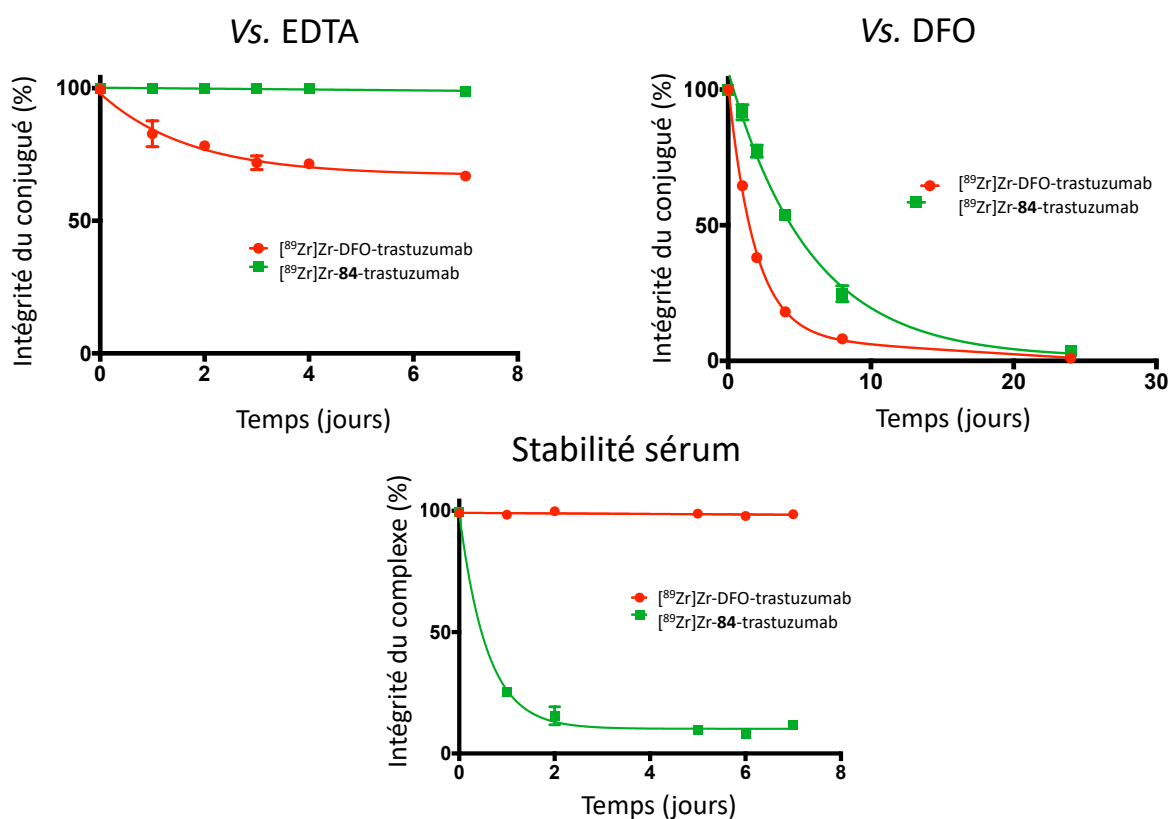


Figure 160 : Test de stabilité de  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-84-trastuzumab}$  et de  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-trastuzumab}$  contre l'EDTA (1000 éq, haut gauche) et contre la DFO (1000 éq, haut droite) et dans le sérum humain (bas)

Afin de comprendre l'origine de l'instabilité du conjugué radiomarqué dans le sérum humain, la même expérience a été reproduite avec le complexe  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-76}$  non conjugué qui s'est avéré stable dans ces mêmes conditions. Par conséquent, nous pouvons en conclure que l'instabilité observée dans le sérum humain n'est pas imputable au chélateur en lui-même, mais à sa liaison avec l'anticorps. Nous formulons l'hypothèse que, lors de l'étape de dérivation par le diéthylsquarate, le cycle se soit lié au chélateur à travers une fonction hydroxamate et non pas sur l'aniline. En effet, comme expliqué précédemment, le caractère relativement nucléophile des groupements hydroxamate peut entrer en compétition avec l'aniline, d'autant plus qu'il

s'agit d'un faible nucléophile et qu'elle subit un encombrement stérique de la part des bras HOPO. Cependant, nous n'avons aucune donnée structurale pour étayer cette hypothèse.

## Conclusions et perspectives

Au vu de sa supériorité face à la DFO au niveau des propriétés de chélation, nous avons prouvé que Cy-HOPO est une molécule prometteuse pour la chélation du zirconium-89. Les études de radiomarquage menées sur le composé **73** ont démontré que l'incorporation de groupements HOPO sur un motif cyclène permet d'abaisser la température de radiomarquage nécessaire en comparaison au DOTA et ainsi de disposer d'un chélateur du zirconium(IV) compatible avec le marquage des anticorps.

Cependant, en raison de la faible stabilité du conjugué [<sup>89</sup>Zr]-**84**-trastuzumab dans le sérum humain, une autre voie de bioconjugaison, qui est en cause dans ce phénomène, doit être envisagée. Des travaux sont actuellement en cours au sein de l'équipe afin de développer une nouvelle version bioconjugable du Cy-HOPO.

## Bibliographie

- (1) Ryman, J. T.; Meibohm, B. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies: Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* **2017**, *6* (9), 576–588. <https://doi.org/10.1002/psp4.12224>.
- (2) Hinkle, G. H.; Loesch, J. A.; Lefevre, S. R. Indium-111-Monoclonal Antibodies in Radioimmunosintigraphy. *J. Nucl. Med. Technol.* **1990**, *18* (1), 16–26.
- (3) Deri, M. A.; Zeglis, B. M.; Francesconi, L. C.; Lewis, J. S. PET Imaging with <sup>89</sup>Zr: From Radiochemistry to the Clinic. *Nucl. Med. Biol.* **2013**, *40* (1), 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2012.08.004>.
- (4) Vugts, D. J.; van Dongen, G. A. M. S. <sup>89</sup>Zr-Labeled Compounds for PET Imaging Guided Personalized Therapy. *Drug Discov. Today Technol.* **2011**, *8* (2–4), e53–e61. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2011.12.004>.
- (5) Heskamp, S.; Raavé, R.; Boerman, O.; Rijpkema, M.; Goncalves, V.; Denat, F. <sup>89</sup>Zr-Immuno-Positron Emission Tomography in Oncology: State-of-the-Art <sup>89</sup>Zr Radiochemistry. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28* (9), 2211–2223. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00325>.
- (6) Jødal, L.; Le Loirec, C.; Champion, C. Positron Range in PET Imaging: Non-Conventional Isotopes. *Phys. Med. Biol.* **2014**, *59* (23), 7419–7434. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/59/23/7419>.
- (7) Verel, I.; Visser, G. W. M.; Boerman, O. C.; van Eerd, J. E. M.; Finn, R.; Boellaard, R.; Vosjan, M. J. W. D.; Stigter-van Walsum, M.; Snow, G. B.; van Dongen, G. E. M. Long-Lived Positron Emitters Zirconium-89 and Iodine-124 for Scouting of Therapeutic Radioimmunoconjugates with PET. *Cancer Biother. Radio.* **2003**, *18* (4), 655–661. <https://doi.org/10.1089/108497803322287745>.
- (8) Sharkey, R. M.; Behr, T. M.; Mattes, M. J.; Stein, R.; Griffiths, G. L.; Shih, L. B.; Hansen, H. J.; Blumenthal, R. D.; Dunn, R. M.; Juweid, M. E.; Goldenberg, D. M. Advantage of Residualizing Radiolabels for an Internalizing Antibody against the B-Cell Lymphoma Antigen, CD22. *Cancer Immunol. Immun.* **1997**, *44* (3), 179–188. <https://doi.org/10.1007/s002620050371>.
- (9) Evers, A.; Hancock, R. D.; Martell, A. E.; Motekaitis, R. J. Metal Ion Recognition in Ligands with Negatively Charged Oxygen Donor Groups. Complexation of Iron(III), Gallium(III), Indium(III), Aluminum(III), and Other Highly Charged Metal Ions. *Inorg. Chem.* **1989**, *28* (11), 2189–2195. <https://doi.org/10.1021/ic00310a035>.
- (10) Yawalkar, S. J. Milestones in the Research and Development of Desferrioxamine. *Nephrol. Dial. Transpl.* **1993**, *8* (supp1), 40–42. <https://doi.org/10.1093/ndt/8.suppl.40>.
- (11) Fischer, G.; Seibold, U.; Schirmacher, R.; Wängler, B.; Wängler, C. <sup>89</sup>Zr, a Radiometal Nuclide with High Potential for Molecular Imaging with PET: Chemistry, Applications and Remaining Challenges. *Molecules* **2013**, *18* (6), 6469–6490. <https://doi.org/10.3390/molecules18066469>.
- (12) Tinianow, J. N.; Gill, H. S.; Ogasawara, A.; Flores, J. E.; Vanderbilt, A. N.; Luis, E.; Vandlen, R.; Darwish, M.; Junutula, J. R.; Williams, S.-P.; Marik, J. Site-Specifically <sup>89</sup>Zr-Labeled Monoclonal Antibodies for ImmunoPET. *Nucl. Med. Biol.* **2010**, *37* (3), 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2009.11.010>.
- (13) Perk, L. R.; Visser, G. W. M.; Tjink, B. M.; Leemans, C. R. <sup>89</sup>Zr as a PET Surrogate Radioisotope for Scouting Biodistribution of the Therapeutic Radiometals <sup>90</sup>Y and <sup>177</sup>Lu in Tumor-Bearing Nude Mice After Coupling to the Internalizing Antibody Cetuximab. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46* (11), 1898–1906.

- (14) Abou, D. S.; Ku, T.; Smith-Jones, P. M. In Vivo Biodistribution and Accumulation of  $^{89}\text{Zr}$  in Mice. *Nucl. Med. Biol.* **2011**, *38* (5), 675–681. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2010.12.011>.
- (15) Bensch, F.; Smeenk, M. M.; van Es, S. C.; de Jong, J. R.; Schröder, C. P.; Oosting, S. F.; Lub-de Hooge, M. N.; Menke-van der Houven van Oordt, C. W.; Brouwers, A. H.; Boellaard, R.; de Vries, E. G. E. Comparative Biodistribution Analysis across Four Different  $^{89}\text{Zr}$ -Monoclonal Antibody Tracers—The First Step towards an Imaging Warehouse. *Theranostics* **2018**, *8* (16), 4295–4304. <https://doi.org/10.7150/thno.26370>.
- (16) Holland, J. P.; Divilov, V.; Bander, N. H.; Smith-Jones, P. M.; Larson, S. M.; Lewis, J. S.  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-J591 for ImmunoPET of Prostate-Specific Membrane Antigen Expression In Vivo. *J. Nucl. Med.* **2010**, *51* (8), 1293–1300. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.076174>.
- (17) Guérard, F.; Lee, Y.-S.; Tripier, R.; Szajek, L. P.; Deschamps, J. R.; Brechbiel, M. W. Investigation of  $\text{Zr(IV)}$  and  $^{89}\text{Zr(IV)}$  Complexation with Hydroxamates: Progress towards Designing a Better Chelator than Desferrioxamine B for Immuno-PET Imaging. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (10), 1002–1004. <https://doi.org/10.1039/C2CC37549D>.
- (18) Patra, M.; Bauman, A.; Mari, C.; Fischer, C. A.; Blacque, O.; Häussinger, D.; Gasser, G.; Mindt, T. L. An Octadentate Bifunctional Chelating Agent for the Development of Stable Zirconium-89 Based Molecular Imaging Probes. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (78), 11523–11525. <https://doi.org/10.1039/C4CC05558F>.
- (19) Vugts, D. J.; Klaver, C.; Sewing, C.; Poot, A. J.; Adamzek, K.; Huegli, S.; Mari, C.; Visser, G. W. M.; Valverde, I. E.; Gasser, G.; Mindt, T. L.; van Dongen, G. A. M. S. Comparison of the Octadentate Bifunctional Chelator DFO\*-PPhe-NCS and the Clinically Used Hexadentate Bifunctional Chelator DFO-PPhe-NCS for  $^{89}\text{Zr}$ -Immuno-PET. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2017**, *44* (2), 286–295. <https://doi.org/10.1007/s00259-016-3499-x>.
- (20) Gorden, A. E. V.; Xu, J.; Raymond, K. N.; Durbin, P. Rational Design of Sequestering Agents for Plutonium and Other Actinides. *Chem. Rev.* **2003**, *103* (11), 4207–4282. <https://doi.org/10.1021/cr990114x>.
- (21) Deri, M. A.; Ponnala, S.; Kozlowski, P.; Burton-Pye, B. P.; Cicek, H. T.; Hu, C.; Lewis, J. S.; Francesconi, L. C. P -SCN-Bn-HOPO: A Superior Bifunctional Chelator for  $^{89}\text{Zr}$  ImmunoPET. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26* (12), 2579–2591. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00572>.
- (22) Pandya, D. N.; Bhatt, N.; Yuan, H.; Day, C. S.; Ehrmann, B. M.; Wright, M.; Bierbach, U.; Wadas, T. J. Zirconium Tetraazamacrocyclic Complexes Display Extraordinary Stability and Provide a New Strategy for Zirconium-89-Based Radiopharmaceutical Development. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (3), 2309–2314. <https://doi.org/10.1039/C6SC04128K>.
- (23) Lejault, P.; Duskova, K.; Bernhard, C.; Valverde, I. E.; Romieu, A.; Monchaud, D. The Scope of Application of Macrocyclic Polyamines Beyond Metal Chelation: The Scope of Application of Macrocyclic Polyamines Beyond Metal Chelation. *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, *2019* (36), 6146–6157. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201900870>.
- (24) Imura, R.; Kumakura, Y.; Yan, L.; Shimoura, Y.; Takahashi, H.; Ida, H.; Wada, Y.; Akimitsu, N. DOTA Chelation through Click Chemistry Enables Favorable Biodistribution of  $^{89}\text{Zr}$ -Radiolabeled Antibodies: A Comparison with DFO Chelation; preprint; Cancer Biology, 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.09.08.507067>.
- (25) Pandya, D. N.; Henry, K. E.; Day, C. S.; Graves, S. A.; Nagle, V. L.; Dilling, T. R.; Sinha, A.; Ehrmann, B. M.; Bhatt, N. B.; Menda, Y.; Lewis, J. S.; Wadas, T. J. Polyazamacrocyclic Ligands Facilitate  $^{89}\text{Zr}$  Radiochemistry and Yield  $^{89}\text{Zr}$  Complexes with Remarkable Stability. *Inorg. Chem.* **2020**, *59* (23), 17473–17487. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c02722>.

- (26) Dai, L.; Lo, W.-S.; Gu, Y.; Xiong, Q.; Wong, K.-L.; Kwok, W.-M.; Wong, W.-T.; Law, G.-L. Breaking the 1,2-HOPO Barrier with a Cyclen Backbone for More Efficient Sensitization of Eu(III) Luminescence and Unprecedented Two-Photon Excitation Properties. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (17), 4550–4559. <https://doi.org/10.1039/C9SC00244H>.
- (27) Xu, J.; Durbin, P. W.; Kullgren, B.; Ebbe, S. N.; Uhlir, L. C.; Raymond, K. N. Synthesis and Initial Evaluation for In Vivo Chelation of Pu(IV) of a Mixed Octadentate Spermine-Based Ligand Containing 4-Carbamoyl-3-Hydroxy-1-Methyl-2(1H)-Pyridinone and 6-Carbamoyl-1-Hydroxy-2(1H)-Pyridinone. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (18), 3963–3971. <https://doi.org/10.1021/jm010564t>.
- (28) Sim, N.; Pal, R.; Parker, D.; Engelmann, J.; Mishra, A.; Gottschalk, S. Magnetic Resonance and Optical Imaging Probes for NMDA Receptors on the Cell Surface of Neurons: Synthesis and Evaluation in Cellulo. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (46), 9389–9404. <https://doi.org/10.1039/C4OB01848F>.
- (29) Ess, D. H.; Jones, G. O.; Houk, K. N. Transition States of Strain-Promoted Metal-Free Click Chemistry: 1,3-Dipolar Cycloadditions of Phenyl Azide and Cyclooctynes. *Org. Lett.* **2008**, *10* (8), 1633–1636. <https://doi.org/10.1021/ol8003657>.
- (30) Adumeau, P.; Raavé, R.; Boswinkel, M.; Heskamp, S.; Wessels, H. J. C. T.; van Gool, A. J.; Moreau, M.; Bernhard, C.; Da Costa, L.; Goncalves, V.; Denat, F. Site-Specific, Platform-Based Conjugation Strategy for the Synthesis of Dual-Labeled Immunoconjugates for Bimodal PET/NIRF Imaging of HER2-Positive Tumors. *Bioconjugate Chem.* **2022**, *33* (3), 530–540. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.2c00049>.
- (31) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596–2599. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4).
- (32) Li, S.; Cai, H.; He, J.; Chen, H.; Lam, S.; Cai, T.; Zhu, Z.; Bark, S. J.; Cai, C. Extent of the Oxidative Side Reactions to Peptides and Proteins During the CuAAC Reaction. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (10), 2315–2322. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00267>.
- (33) Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. Copper-Free Click Chemistry for Dynamic in Vivo Imaging. *P. Natl. A. Sci.* **2007**, *104* (43), 16793–16797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707090104>.
- (34) Wurm, F. R.; Klok, H.-A. Be Squared: Expanding the Horizon of Squaric Acid-Mediated Conjugations. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (21), 8220. <https://doi.org/10.1039/c3cs60153f>.
- (35) Kovác, P.; Xu, P. Controlled and Highly Efficient Preparation of Carbohydrate-Based Vaccines: Squaric Acid Chemistry Is the Way to Go. In *Carbohydrate Chemistry*; Pilar Rauter, A., Lindhorst, T., Queneau, Y., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2016; Vol. 42, pp 83–115. <https://doi.org/10.1039/9781782626657-00083>.
- (36) Grus, T.; Lahnif, H.; Klasen, B.; Moon, E.-S.; Greifenstein, L.; Roesch, F. Squaric Acid-Based Radiopharmaceuticals for Tumor Imaging and Therapy. *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32* (7), 1223–1231. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00305>.
- (37) Tietze, L. F.; Schroeter, C.; Gabius, S.; Brinck, U.; Goerlach-Graw, A.; Gabius, H. J. Conjugation of P-Aminophenyl Glycosides with Squaric Acid Diester to a Carrier Protein and the Use of the Neoglycoprotein in the Histochemical Detection of Lectins. *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2* (3), 148–153. <https://doi.org/10.1021/bc00009a003>.
- (38) Quiñonero, D.; Frontera, A.; Ballester, P.; Deyà, P. M. A Theoretical Study of Aromaticity in Squaramide and Oxocarbons. *Tet. Lett.* **2000**, *41* (12), 2001–2005. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)00084-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)00084-8).

(39) Berg, E.; Gill, H.; Marik, J.; Ogasawara, A.; Williams, S.; van Dongen, G.; Vugts, D.; Cherry, S. R.; Tarantal, A. F. Total-Body PET and Highly Stable Chelators Together Enable Meaningful <sup>89</sup>Zr-Antibody PET Studies up to 30 Days After Injection. *J. Nucl. Med.* **2020**, *61* (3), 453–460. <https://doi.org/10.2967/jnumed.119.230961>.

# **Conclusion Générale**



## Conclusions

Les travaux présentés dans cette thèse s'articulent autour d'un objectif commun : proposer des solutions pour améliorer les propriétés chimiques et pharmacologiques des agents d'imagerie et de radiothérapie vectorisée utilisés pour le diagnostic et le traitement du cancer.

C'est dans ce contexte que nous avons proposé, dans le premier chapitre de cette thèse, d'adapter une procédure précédemment développée au sein de notre laboratoire à la synthèse simple, rapide et modulaire de ligands hétérobivalents (Figure 161).

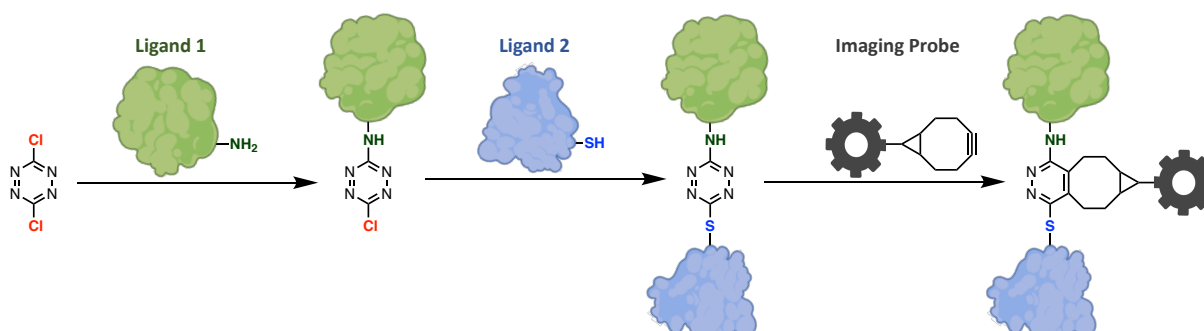


Figure 161 : Schéma représentatif de la synthèse simple, rapide et modulaire de ligands hétérobivalents au départ de la 3,6-dichlorotétrazine : petite molécule disymétriquement fonctionnalisable de manière chimiospécifique.

Comme nous l'avons présenté à la fois dans le chapitre 1 et dans le chapitre 2, cette méthode de synthèse a été largement éprouvée et appliquée à la synthèse de traceurs hétérobivalents constitués de différents agents de vectorisation présentant un intérêt majeur en oncologie :

- KuE ciblant PSMA,
- JMV594 ciblant GRPR,
- Un dérivé de FC131 ciblant CXCR4,

ainsi que différentes sondes (ou précurseurs de sonde) d'imagerie ou de thérapie :

- Les chélateurs DOTA et NODAGA
- Le fluorophore Cyanine 5

Le composé **13**, ciblant GRPR et PSMA, fonctionnalisé avec un NODAGA, a été radiomarqué au gallium-68. Les essais *in vitro* et *in vivo* que nous avons entrepris avec nos collaborateurs ont prouvé que la présence de la plateforme n'entravait pas l'affinité des vecteurs pour leur cible, démontrant ainsi l'efficacité de notre méthode pour la génération de ligands hétérobivalents.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à une autre cible d'intérêt en oncologie, la protéine d'activation des fibroblastes. Ainsi, en nous basant sur les données disponibles dans la littérature, nous avons réalisé avec succès la synthèse de FAPI-04, un inhibiteur de cette enzyme fonctionnalisé avec un DOTA. Nous avons pour projet d'incorporer le motif FAPI dans nos ligands hétérobivalents.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, notre intérêt s'est également porté sur la caractérisation de ces traceurs, habituellement réalisée au moyen de dérivés radioactifs. Nous avons proposé

dans le chapitre 3 une méthode alternative pour réaliser des études préliminaires sur ce type de traceurs et ainsi limiter l'utilisation de la radioactivité aux composés les plus prometteurs. La méthode que nous proposons a été illustrée par la détermination de l'affinité de ligands fluorescents de référence et de la bombésine par compétition avec l'un de ces ligands. Malgré des écarts-types importants, cette nouvelle approche nous a permis de mesurer une affinité de la bombésine pour le GRPR comparable à ce qui est rapporté dans la littérature. Néanmoins, le développement de cette méthode n'en est encore qu'à ses balbutiements et nécessitera un travail supplémentaire d'optimisation dans le but de réduire les marges d'erreur qui accompagnent les constantes thermodynamiques que nous mesurons.

Pour finir, dans le chapitre 4 de cette thèse, notre attention s'est portée sur le développement d'agents chélatants, une thématique d'intérêt dans notre équipe de recherche. Ainsi, nous avons proposé un agent chélatant bifonctionnel, capable de former un complexe stable dans des conditions douces avec le zirconium-89. Malheureusement, une fois conjugué à l'anticorps, le radiotracer s'est avéré instable dans le sérum humain. Cette instabilité est attribuée au lien entre le chélateur et l'anticorps et des travaux visant au développement d'une nouvelle génération de ce composé sont en cours au sein de l'équipe.

Forts de l'expertise de notre équipe dans ce domaine, nous nous sommes intéressés, pendant ces trois années de doctorat, à chacune des « briques » composant un agent d'imagerie (ou de thérapie) vectorisé : vecteurs, espaceur et sonde.

## Perspectives

Dans la continuité de ces travaux de thèse, nous avons pour projet de réaliser des études *in vitro* approfondies sur le composé [<sup>68</sup>Ga]Ga-13 afin d'évaluer l'apport des interactions bivalentes sur l'affinité du traceur pour chacun des récepteurs ciblés. À la suite de ces expériences, nous réaliserons les études d'affinité, vis-à-vis de GRPR et la PSMA, sur les composés [<sup>68</sup>Ga]Ga-31, [<sup>68</sup>Ga]Ga-32 et [<sup>68</sup>Ga]Ga-33 dans le but de déterminer le nombre optimal de résidus β Alanine. Une autre voie d'amélioration de nos traceurs hétérobivalents réside dans la nature des espaceurs. Une étude comparant différents types de résidu séparant les deux vecteurs constitue une étape d'optimisation primordiale au développement de traceurs toujours plus affins de leurs récepteurs.

Dans le même temps, nous continuerons le développement de notre méthode de détermination d'affinité en utilisant des ligands de référence fluorescents, en nous intéressant en particulier à l'étape de lavage qui semble être un point critique.

Nous souhaitons également appliquer la méthode que nous avons développée à la synthèse de nouveaux traceurs hétérobivalents ciblant d'autres biomolécules co-exprimées par des cellules cancéreuses. Pour ce faire, nous envisageons d'étudier, au travers de collaborations, l'expression de différents biomarqueurs sur une banque de tissus afin d'identifier de nouvelles combinaisons de vecteurs présentant un intérêt en imagerie et en thérapie. Nous nous intéresserons tout particulièrement à des combinaisons mettant en jeu CXCR4.

Enfin, une nouvelle génération du chélateur bifonctionnel Cy-HOPO est actuellement en cours de développement au sein de notre équipe.

## Valorisation des résultats

Durant cette thèse, j'ai eu l'opportunité de présenter nos travaux dans différents colloques nationaux et internationaux :

- Présentation orale à l'*European Meeting of Molecular Imaging (EMIM)* à Thessalonique (Grèce) en Mars 2022.
- Présentation orale (au 22<sup>ème</sup> congrès organisé par le Groupe Français des Peptides (GFPP 2022) à Port-Leucate (France) en Mai 2022
- Présentation de poster à l'*International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (ISRS)* à Nantes (France) en Mai 2022
- Présentation orale et poster aux journées conjointes de *France Life Imaging (FLI)* et du Groupe De Recherche pour les Agents d'Imagerie Moléculaire (GDR AIM en Novembre 2021.

Enfin, les travaux que nous avons présentés dans ce manuscrit font l'objet d'une publication soumise à *Chemistry, a European Journal*.

## Remerciements

Je remercie le Conseil général de Bourgogne Franche-Comté d'avoir financé ces trois années de thèse. Je remercie également *France Life Imaging* (FLI) pour le financement du projet BIVALIMAG dont les résultats ont été présentés dans le premier chapitre de cette thèse. Cette thèse a également été soutenue par le CNRS qui a financé une partie des équipements communs au laboratoire. Je souhaite également remercier le Groupe français des peptides (GFPP) pour l'octroi d'une bourse de stage de formation qui m'a permis de me rendre à Paris où j'ai pu participer à l'évaluation *in vivo* d'un des composés présentés dans cette thèse. Pour finir, je remercie Chematech, ainsi que son directeur, le Dr. Frédéric Boschetti, pour avoir fourni tous les composés macrocycliques dont nous avons besoin tout au long de ces travaux.



**CheMatech**  
macrocycle design technologies

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés à l'Institut de chimie moléculaire de l'université de Bourgogne (ICMUB, UMR CNRS 6302) au sein de l'équipe porphyrines, polyamines développement et applications (P2DA). Je remercie le Pr. Franck Denat, directeur de l'ICMUB, et le Dr. David Monchaud, directeur de l'équipe P2DA, de m'avoir accueilli pendant ces trois années.

Je souhaite remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer les travaux présentés dans ce manuscrit. Je remercie la Dr. Florine Cavelier, directrice de recherche CNRS au sein de l'Institut des biomolécules Max Mousseron (IBMM, UMR CNRS 5247) à l'université de Montpellier ainsi que la Dr. Lucie Sancey, directrice de recherche CNRS au sein de l'*Institute for advanced biosciences* (IAB, UMR CNRS 5309) à l'université Grenoble-Alpes, d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant que rapportrices. Je remercie le Dr. Dominique Bonnet, directeur de recherche CNRS au sein du laboratoire d'innovation thérapeutique (LiT, UMR CNRS 7200) à l'université de Strasbourg, d'avoir accepté d'évaluer ces travaux de thèse en tant qu'examinateur.

Je tiens particulièrement à remercier le Pr. Franck Denat, le Dr. Victor Gonçalves et le Dr. Ibai Valverde de m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse sous leur supervision. Travailler à vos côtés a été un réel plaisir et je tiens à vous témoigner toute ma gratitude pour tout le temps que vous avez investi, avec enthousiasme, pour m'accompagner dans ce projet de thèse. Je tiens également à vous remercier pour m'avoir encouragé (et accompagné) à présenter ces travaux dans différents congrès, en particulier en Grèce et à Port-Leucate, on a bien ri et j'en garde des souvenirs très agréables. J'espère que la correction de ce (trop) long manuscrit ne vous aura pas trop épuisé, je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Je tiens également à remercier la Dr. Aurélie Prignon (Sorbonne-Université) ainsi que Dr. Clément Morgat (Université de Bordeaux), avec qui nous avons collaboré dans le cadre du projet BIVALIMAG. Je remercie encore une fois Aurélie pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire à Paris, le laboratoire d'imagerie moléculaire positonique (LIMP, UMS28), et pour m'avoir initié à l'imagerie préclinique.

Je remercie également l'équipe de PACSMUB, et tout particulièrement Marie-José Penouilh, Myriam Heydel et le Dr. Quentin Bonin pour la multitude d'analyses en HRMS et en chromatographie ioniques soumises tout au long de cette thèse ainsi que pour leur support pour la caractérisation RMN.

Je souhaite également exprimer ma gratitude et toute ma considération envers le Pr. Anthony Romieu pour nous avoir fourni bon nombre de précurseurs et de fluorophores, préparés par ses soins et prêts à l'emploi. Je vous remercie également pour m'avoir initié à la synthèse des polyméthines. La fastidieuse purification manuelle en phase inverse de cette Cy5 disulfonaté restera gravée dans ma mémoire.

Un grand merci à M. Baptiste Chartier, un stagiaire, et ami, d'exception sans qui ma dernière année de thèse aurait été bien moins drôle et le chapitre 2 de ce manuscrit infiniment moins fourni. Je suis très heureux d'avoir pu travailler avec toi, je te souhaite bon courage pour ta thèse à Grenoble, tu vas assurer j'en suis sûr.

Merci beaucoup à la Dr. Angie Pipier pour son aide et ses conseils avisés sur la culture cellulaire, la manipulation des cellules et évidemment pour les pauses café accompagnées de leurs conversations très raffinées, en particulier avec l'acolyte Tony.

Merci également au Dr. Pierre Adumeau, qui a réalisé le radiomarquage, la bioconjugaison et les essais de stabilité sur les chélateurs présentés dans le chapitre 4.

J'aimerais également remercier les doctorants, post-doctorants, stagiaires et autres membres du laboratoire que j'ai pu rencontrer pendant ces trois ans pour les moments de rigolade au labo et surtout en dehors : Francesco, Wassima, Valou, Jérem, Ben (t'es rond ?), Romane, Seb, Tony, Youmna, Jelena, Zoé, Léa, Charlotte, Marco, Hasan, Michael, Élisabeth, Baptiste(s), Marta, Maxime, Thibaut et le doux Yoan. Sans oublier les anciens du labo : Kevin, Seb, Emma, Anne, Garance, Robin, Adrien, Léo et les évidemment, le S : Vivian et Osian.

Je remercie aussi ma famille : mes parents et mon frère Justin. Ainsi que mes amis de longue date : Joan, Jimmy et Christophe.

Pour finir, je remercie Audrey, pour ton soutien et les bons moments partagés depuis maintenant deux ans.

# **Experimental section**

## Table des Matières

<b>I. Materials and methods .....</b>	<b>243</b>
<b>II. Synthesis of compounds 1 to 84.....</b>	<b>245</b>
1. Chapter I – compounds 1 to 32 .....	245
2. Chapter II – compounds 34 to 56.....	304
3. Chapter III – Compounds 57A to 66.....	348
4. Chapter IV – compounds 67 to 84 .....	370
<b>III. Radiolabeling and biological evaluation of conjugates.....</b>	<b>404</b>
1. <i>In vitro</i> evaluation of conjugates [ <sup>68</sup> Ga]Ga-13, [ <sup>68</sup> Ga]Ga-16 and [ <sup>68</sup> Ga]Ga-17.....	404
2. <i>In vivo</i> evaluation of conjugates [ <sup>68</sup> Ga]Ga-12, [ <sup>68</sup> Ga]Ga-13, [ <sup>68</sup> Ga]Ga-16 and [ <sup>68</sup> Ga]Ga-17.	405
3. Fluorescence-based <i>in vitro</i> evaluation of conjugates .....	407

## I. Materials and methods

Unless stated differently, reactions were performed in technical grade solvents from Carlo Erba under normal atmosphere. Dry solvents were non-stabilized, purchased from Carlo Erba and dried over alumina cartridges using a PureSolv-MD-5 (Inert<sup>®</sup>) system (Innovative Technology). All reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Merck), ACROS Organics or Alfa Aesar and used without further purification. All amino acids and solid-phase peptide synthesis resins were purchased from Iris Biotech and used without further purification. Polypropylene frits were obtained from Roland Vetter Laborbedarf OHG (Ammerbuch, Germany), and Teflon taps from Biotage (Uppsala, Sweden). HATU and hexafluoroisopropanol were purchased from Fluorochem. KuE(tBu)<sub>3</sub>, NODAGA-BCN, and DOTA-BCN were provided by Chematech. Moisture-sensitive reactions were performed under argon atmosphere.

<sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR were recorded at 298 K on a Brüker Avance Neo 500 MHz equipped with a 5 mm BBOF iProbe. Chemical shifts are given relative to TMS and were referenced to the residual solvent signal. The following abbreviations and their combinations are used: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; m, multiplet.

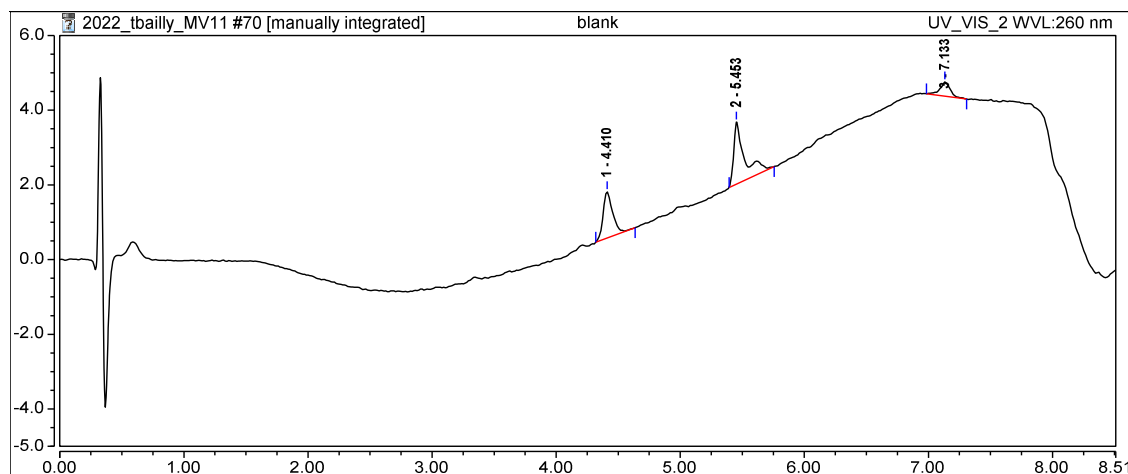
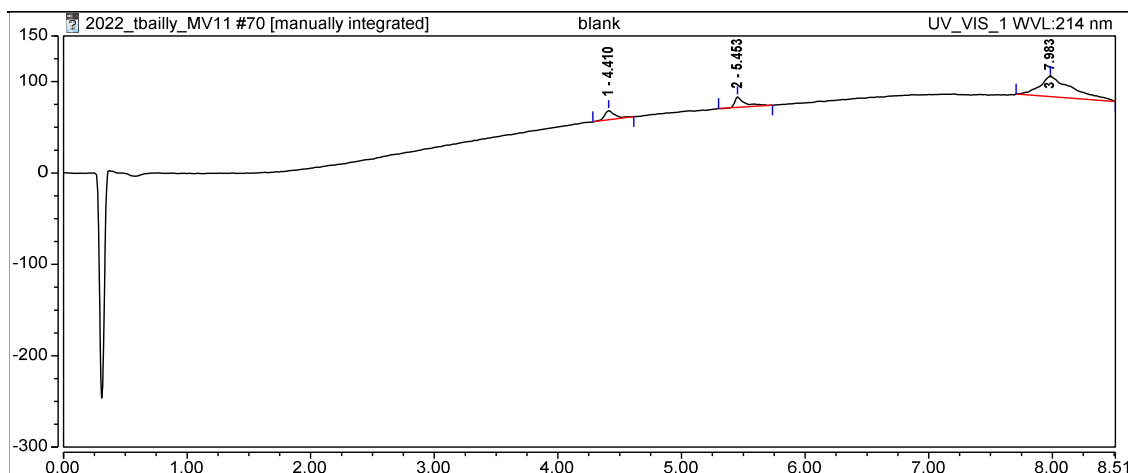
High-resolution mass spectra were recorded using a Thermo LTQ Orbitrap XL ESI-MS spectrometer. The following source parameters were used if no further specification is mentioned: Heater Temperature: 50 °C, Gas Flow: Sheath 15 / Aux 10 / Sweep 0, Spray Voltage: 4 kV, Capillary Temperature: 275 °C, Capillary Voltage: 22 V, Resolution (m/z = 400): 60 000. If not specified, the spectrum was recorded in positive mode.

Reactions were followed by RP-HPLC-MS on a Thermo-Dionex Ultimate 3000 instrument (pump + autosampler at 20 °C and column oven at 25 °C) equipped with a Thermo-Dionex DAD 3000-RS diode array detector and a MSQ Plus single quadrupole mass spectrometer. The employed column was a Phenomenex Kinetex (2.6 μm, C<sub>18</sub>, 100 Å, 50 × 2.1 mm) and compounds were eluted at 0.5 mL/min with the following solvents: Eluent A: H<sub>2</sub>O 0.1% formic acid, and eluent B: CH<sub>3</sub>CN 0.1% formic acid. HPLC-gradient grade acetonitrile was obtained from Carlo Erba. Aqueous mobile phases for HPLC were prepared using deionized water (18.2 MΩ.cm) produced by a Purelab Ultra system from Elga. The gradient employed for analyses was the following: 5% B for 1.5 min then 5 to 100% B in 5 minutes and a 1.5 min plateau at 100% B.

The purity of title compounds was determined from the integration of HPLC-MS chromatograms at 214 nm or 260 nm.



### HPLC chromatogram blank at 214 and 260 nm:



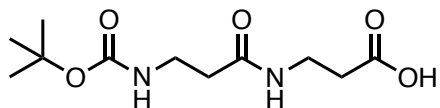
Purifications by flash chromatography were performed on a Reveleris® X1 system (Grace) or a PuriFlash 5.250 system (Interchim) with prepacked FlashPure Silica columns (40  $\mu\text{m}$  irregular particles, Büchi) or FlashPure ID C<sub>18</sub> (40  $\mu\text{m}$  irregular particles, Büchi).

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  $\mu\text{m}$ , 150  $\text{\AA}$ , 150  $\times$  30 mm) at 20 mL/min or SiliaChrom® dt C<sub>18</sub> column (Silicycle; 10  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 250  $\times$  20 mm) at 20 mL/min or Jupiter Proteo (4  $\mu\text{m}$ , C<sub>18</sub>, 90  $\text{\AA}$ , 250  $\times$  21.2 mm) with elution performed at 15 mL/min, 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.

## II. Synthesis and characterization of compounds 1 to 84

### 1. Chapter I – compounds 1 to 32

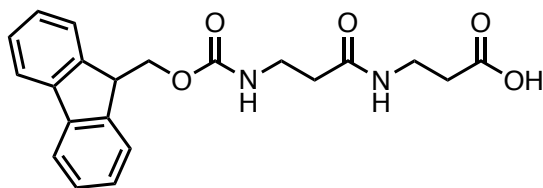
*Boc-(βAla)<sub>2</sub>-OH, 1 (CAS 126074-82-6)*



TSTU (397 mg, 1.3 mmol) and DIPEA (458  $\mu$ L, 2.6 mmol) was added to a solution of N-Boc protected  $\beta$  Alanine (250 mg, 1.3 mmol) in DMF (2 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature. After complete formation of the succinimide ester (follow-up by HPLC-MS),  $\beta$  Alanine (129 mg, 1.5 mmol) was added to the reaction mixture and was left to stir overnight. The solvent was evaporated under reduced pressure. The resulting yellow oil was redissolved in 50% acetonitrile in water (1 mL) and purified by semi-preparative RP-HPLC. After lyophilization the product was obtained as a white powder (242 mg, 0.93 mmol) in 70 % yield.

Analytical data were found to be identical to literature data.

*Fmoc-(βAla)<sub>2</sub>-OH, 2 (CAS 855316-46-0)*



TSTU (484 mg, 1.6 mmol) and DIPEA (560  $\mu$ L, 3.2 mmol) was added to a solution of N-Fmoc protected  $\beta$  Alanine (500 mg, 1.6 mmol) in DMF (4 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature. After complete formation of the succinimide ester (follow-up by HPLC-MS),  $\beta$  Alanine (157 mg, 1.8 mmol) was added to the reaction mixture and was left to stir overnight. The solvent was evaporated under reduced pressure. The resulting yellow oil was redissolved in 50% acetonitrile in water (1 mL) and purified by semi preparative RP-HPLC. After lyophilization, the product was obtained as a white powder (420 mg, 1.1 mmol) in 68 % yield.

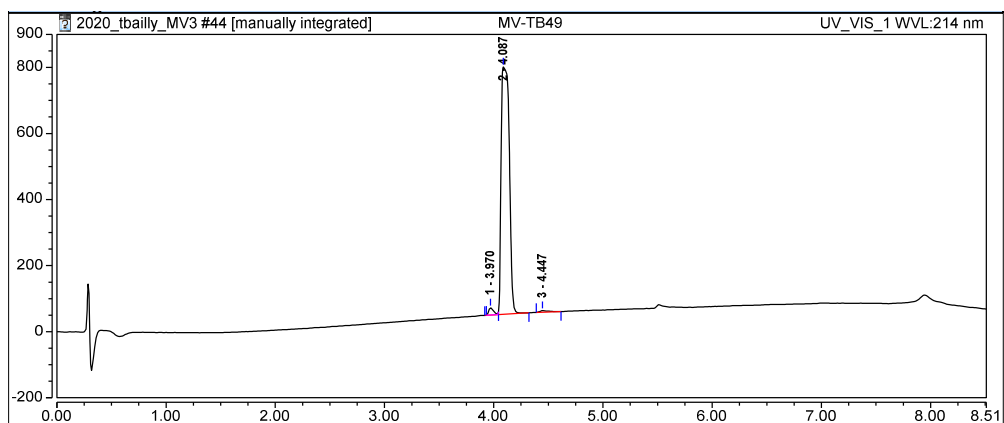
**HPLC:** *retention time* = 4.09 min, *purity* = 0.97,  $\lambda_{max}$  = 219, 265 and 299 nm

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.94 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H), 7.88 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 7.68 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 7.41 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 7.33 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 7.29 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 1H), 4.27 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 2H), 4.20 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 1H), 3.24 (q, 2H), 3.18 (q,  $J$  = 6.7 Hz, 2H), 2.37 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 2.24 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H).

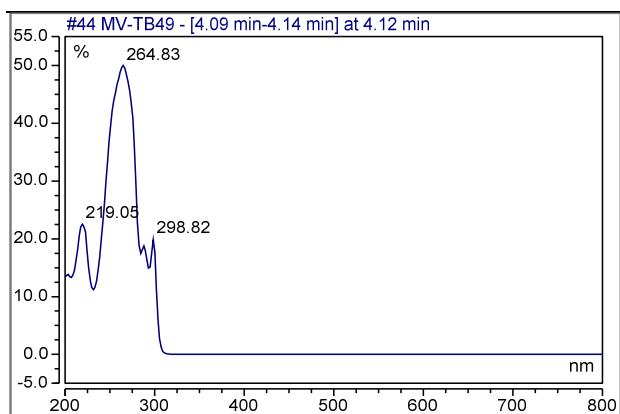
**LRMS:**  $[M+H]^+$  :  $m/z$  = 383.2 (calcd. for  $C_{21}H_{23}N_2O_5$  : 383.2)

**HRMS:**  $[M+H]^+$  :  $m/z$  = 383.15978 (calcd. for  $C_{21}H_{23}N_2O_5$  : 383.16015)

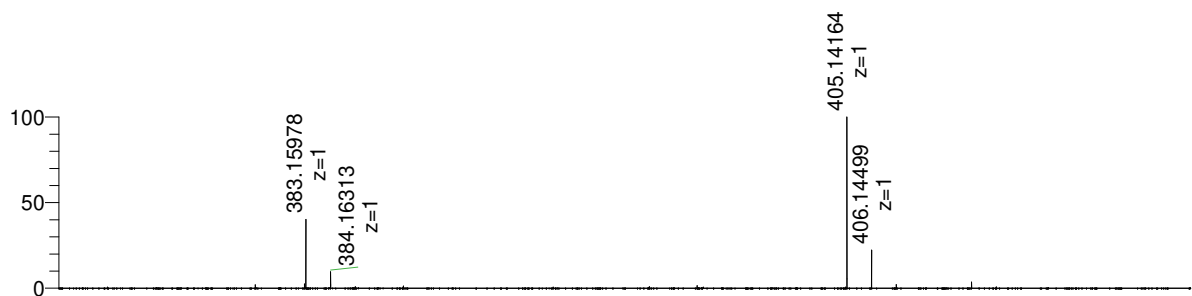
HPLC chromatogram:



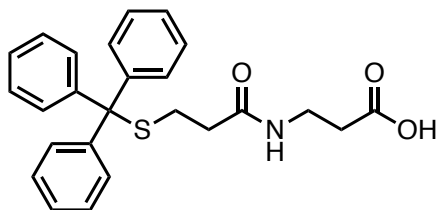
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



**3-(3-(tritylthio)propanamido)propanoic acid, **3**** (CAS 196200-01-8)



TSTU (301 mg, 1.0 mmol) and DIPEA (260  $\mu$ L, 1.5 mmol) were added to a solution of 3-(tritylthio)propanoic acid (174 mg, 0.5 mmol) in DMF (5 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature. After complete formation of the succinimide ester (follow-up by HPLC-MS), ethyl acetate (30 mL) was added to the reaction mixture and washed with distilled water (3 $\times$ 10 mL). After evaporation of the ethyl acetate, the yellowish oil was dissolved in DMF (10 mL).  $\beta$  Alanine (89 mg, 1.0 mmol) and DIPEA (260  $\mu$ L, 1.5 mmol) were added to the reaction mixture containing the activated 3-(tritylthio)propanoic acid and was left to stir overnight at room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure. The resulting yellow oil was purified by flash chromatography (DCM:MeOH, dry loading). After evaporation of the solvents, the product was obtained as a pale-yellow oil (200 mg, 0.48 mmol) in 96 % yield.

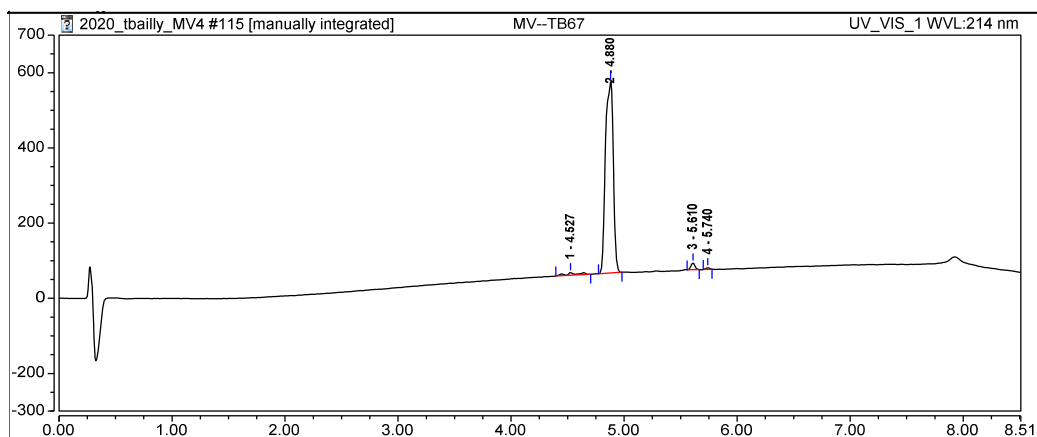
**HPLC:** *retention time* = 4.88 min, *purity* = > 0.99,  $\lambda_{max}$  = 201, 221 nm

**$^1$ H NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.34 (d, 6H), 7.20 (t, 6H), 7.13 (t, 3H), 3.34 (t, 2H), 2.41 (m, 4H), 1.91 (t, 2H).

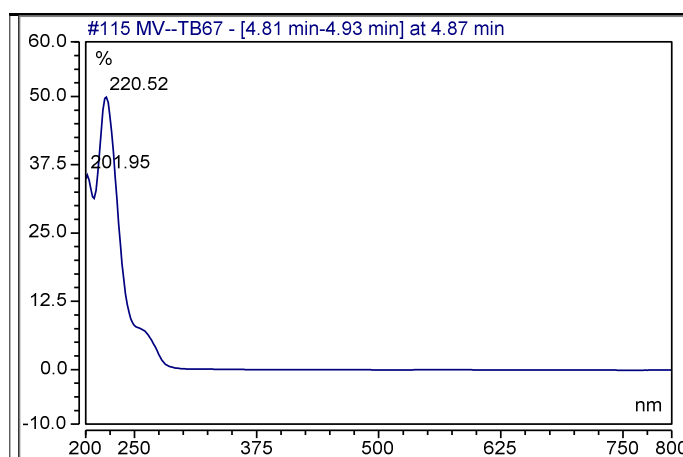
**LRMS:**  $[2M+H]^+$  :  $m/z$  = 839.6 (calcd. for  $C_{50}H_{51}N_2O_6S_2$  : 839.3)

**HRMS:**  $[M+Na]^+$  :  $m/z$  = 442.14302 (calcd. for  $C_{25}H_{25}NO_3SNa$  : 442.14474)

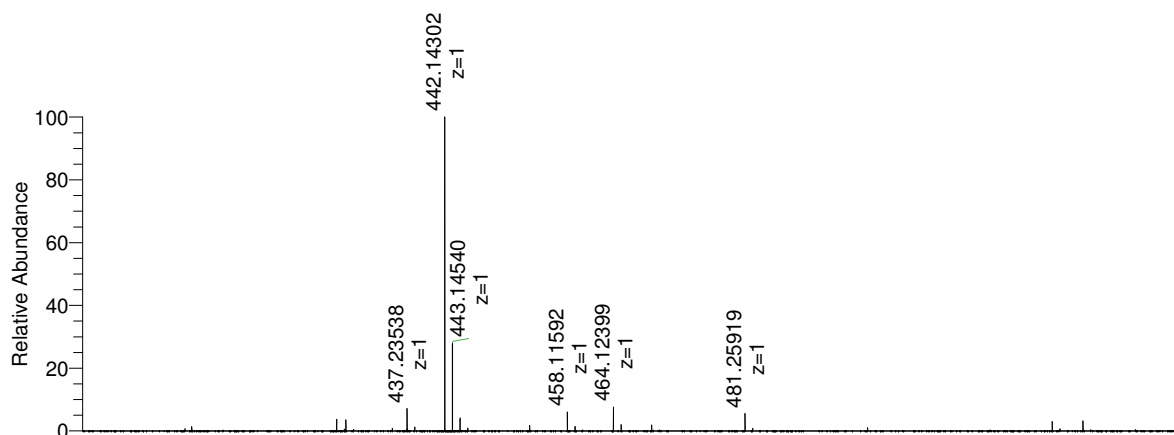
HPLC chromatogram:



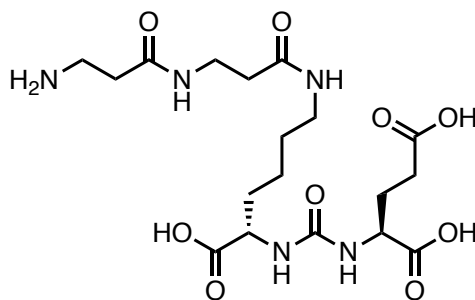
UV-vis spectrum:



HRMS spectrum:



*KuE*-( $\beta$ Ala)<sub>2</sub>, **4**



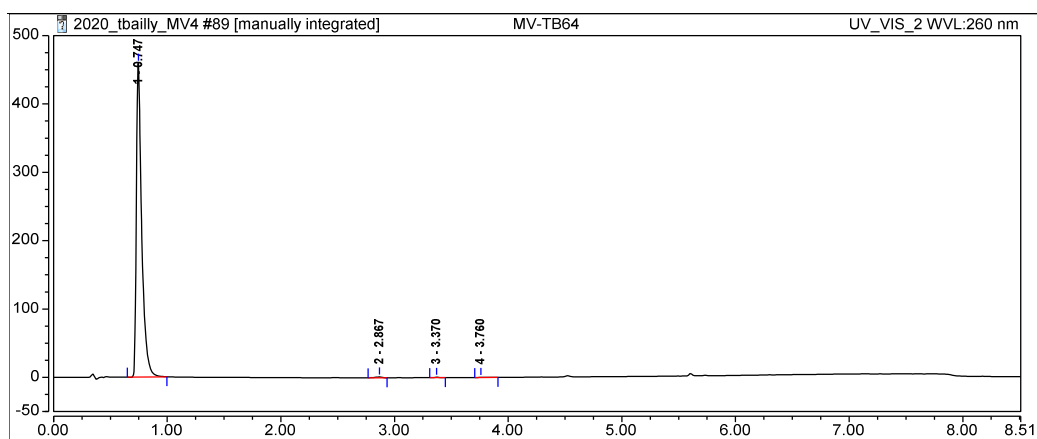
HATU (115 mg, 0.3 mmol) and DIPEA (107  $\mu$ L, 0.6 mmol) were added to a solution of commercially available *KuE*(tBu)<sub>3</sub> (100 mg, 0.2 mmol) in DMF (5 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature. After completion of the reaction (follow-up by HPLC-MS), the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and purified by RP-HPLC. After lyophilization of the product, the resulting white powder was treated with TFA. The compound **4** was finally purified by RP-HPLC, resulting in a white powder (105 mg, 0.15 mmol) obtained in 75 % yield.

**HPLC:** *retention time* = 0.75 min, *purity* = > 0.99,  $\lambda_{max}$  = 201 nm

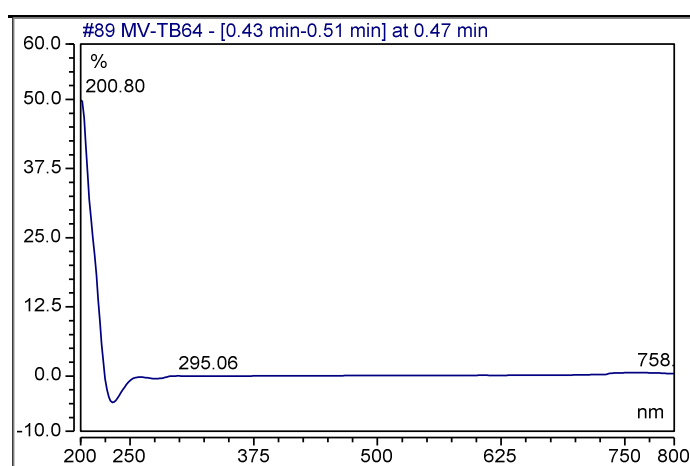
**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup> : *m/z* = 462.5 (calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub> : 462.2)

**HRMS:** [M+H]<sup>+</sup> : *m/z* = 462.21901 (calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub> : 462.21945)

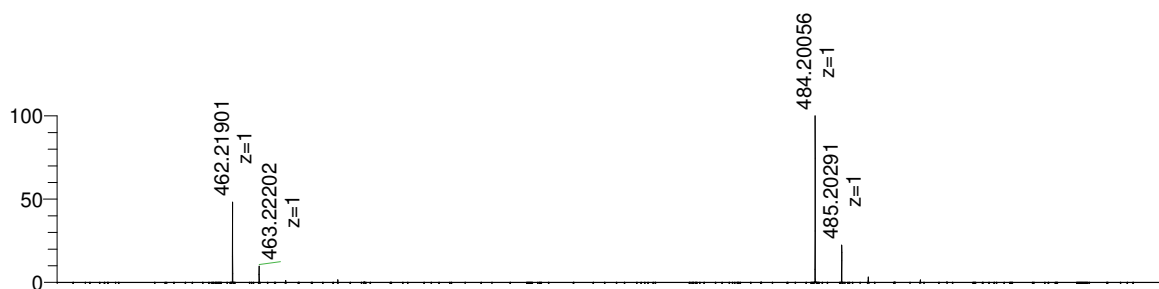
HPLC chromatogram:



UV-vis spectrum:

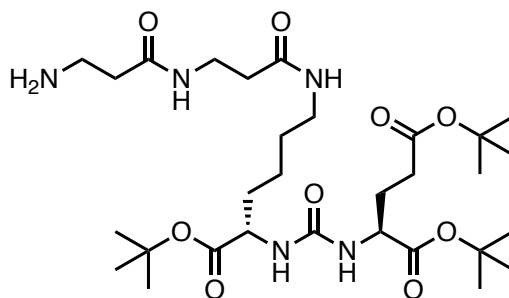


HRMS spectrum:





*KuE(tBu<sub>3</sub>)-(βAla)<sub>2</sub>, 5*



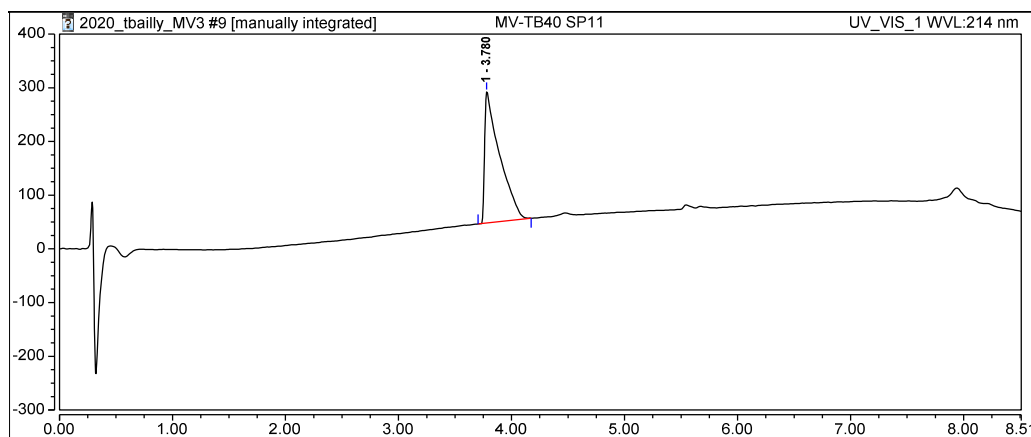
HATU (69 mg, 0.18 mmol) and DIPEA (115  $\mu$ L, 0.65 mmol) were added to a solution of <sup>t</sup>Bu-protected PSMA (100 mg, 0.16 mmol) and **2** (91 mg, 0.18 mmol) in DMF (2 mL). The reaction was stirred for 1 h at room temperature and the DMF was evaporated under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in DCM:diethylamine (50:50, 6 mL) and stirred for 1 h at room temperature. The solvents were evaporated under reduced pressure. The resulting product was redissolved in acetonitrile and purified by RP-HPLC yielding to **5** as a white solid (86 mg, 0.095 mmol) in 57 % yield.

**HPLC:** *retention time* = 3.78 min, *purity* = > 0.99,  $\lambda_{max}$  = 201 nm

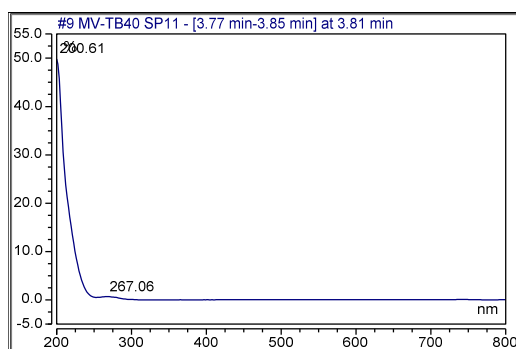
**LRMS:**  $[M+H]^+$   $m/z$  = 630.6 (calcd. for C<sub>30</sub>H<sub>56</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub> : 630.4)

**HRMS:**  $[M+H]^+$   $m/z$  = 630.40644 (calcd. for C<sub>30</sub>H<sub>56</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub> : 630.40725)

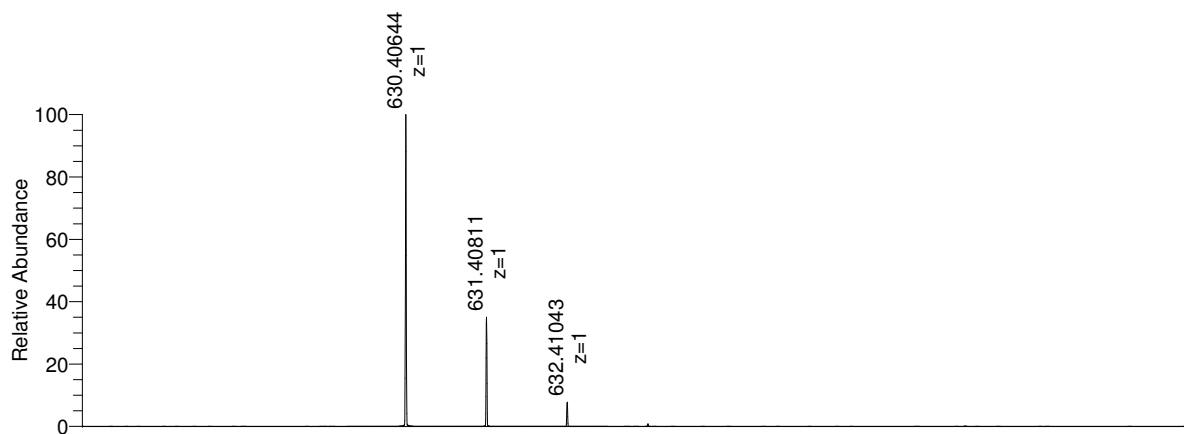
HPLC chromatogram:



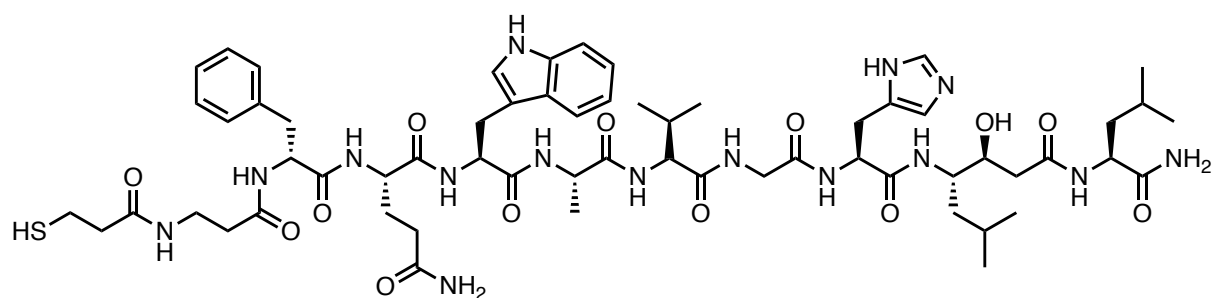
UV-vis spectrum:



HRMS spectrum:



*JMV594-βAla-mercaptopropionyl, 6*



The synthesis of **6** was carried out on a Fmoc-Rink Amide AM resin (520 mg, 0.48 mmol/g, 75-150  $\mu\text{m}$ , Iris Biotech) with an automated peptide synthesizer Liberty Blue (CEM). Amino acids were activated with DIC/Oxyma Pure. Fmoc-protected amino acids were deprotected with 20% v/v peptide grade piperidine (Iris Biotech) solution in peptide grade DMF (Carlo Erba). The amino acid sequence of JMV594 (H-DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH<sub>2</sub>) was extended with a  $\beta$  Alanine residue (added to the sequence with the automated synthesizer). 3-(tritylthio)-propionic acid was added by manual coupling. Briefly, after Fmoc deprotection by addition of 20% piperidine in DMF (3 x 3 min), the resin was thoroughly washed, the resin was swollen in DMF then drained, and the acid (1 equiv.) and HATU (1 equiv.), both dissolved in a minimum amount of DMF, were successively added. DIEA (2 equiv.) was added and the mixture was stirred gently for 2 hours. Excess reagents were eliminated by filtration and the peptide resin was washed successively with DMF. Completion of the reaction was determined by a standard TNBS test.

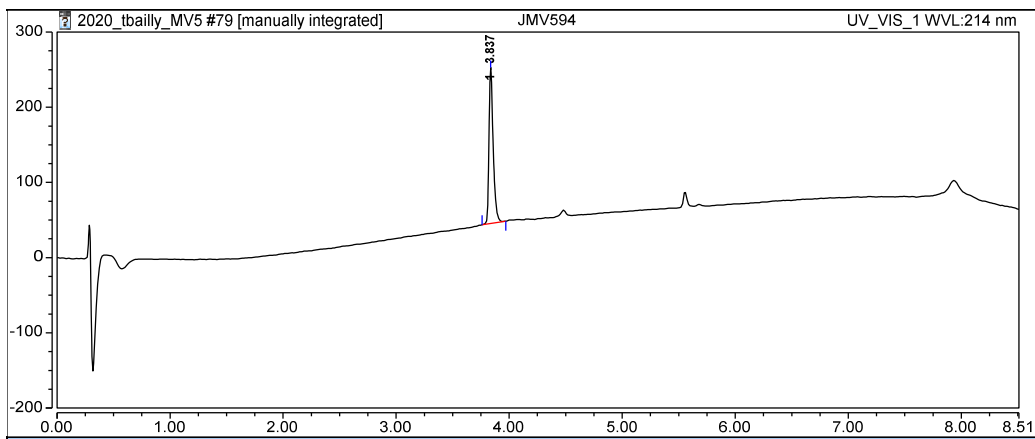
The peptide was cleaved from the resin and deprotected using a solution of triisopropylsilane (2%), 2,2'-(ethylenedioxy)diethanethiol (2%), and water (1%) in TFA. After cleavage and deprotection of the side chains, the solution was concentrated and the peptide was precipitated with diethyl ether (4°C). The precipitate was purified by RP-HPLC giving a white solid in 12% yield (48 mg, 0.030 mmol).

**HPLC:** retention time = 3.84 min, purity = > 0.99,  $\lambda_{\text{max}}$  = 218, 380 nm

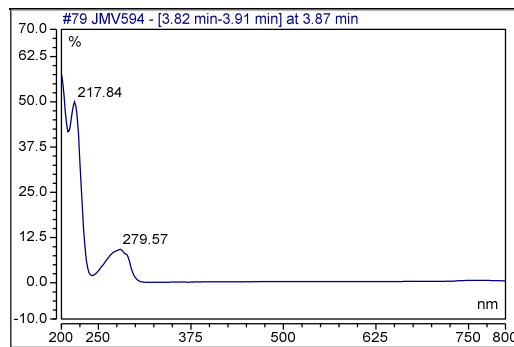
**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  = 1273.0 (calcd. for C<sub>61</sub>H<sub>90</sub>N<sub>15</sub>O<sub>13</sub>S<sup>+</sup>: 1272.7)

**HRMS:** [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  = 1272.65702 (calcd. for C<sub>61</sub>H<sub>90</sub>N<sub>15</sub>O<sub>13</sub>S<sup>+</sup>: 1272.65577)

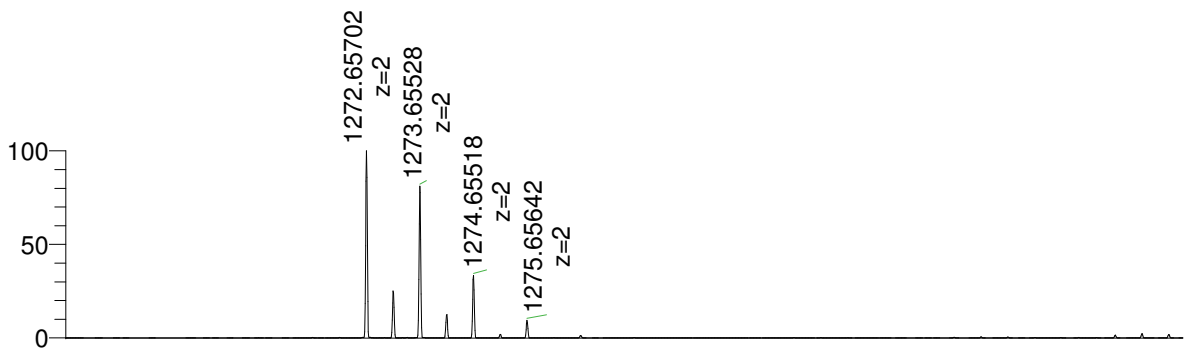
HPLC chromatogram:



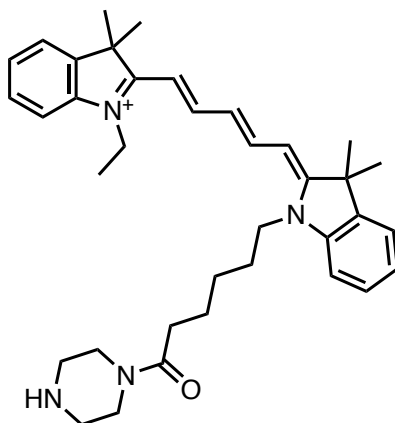
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*Cyanine 5-piperazine, 8*



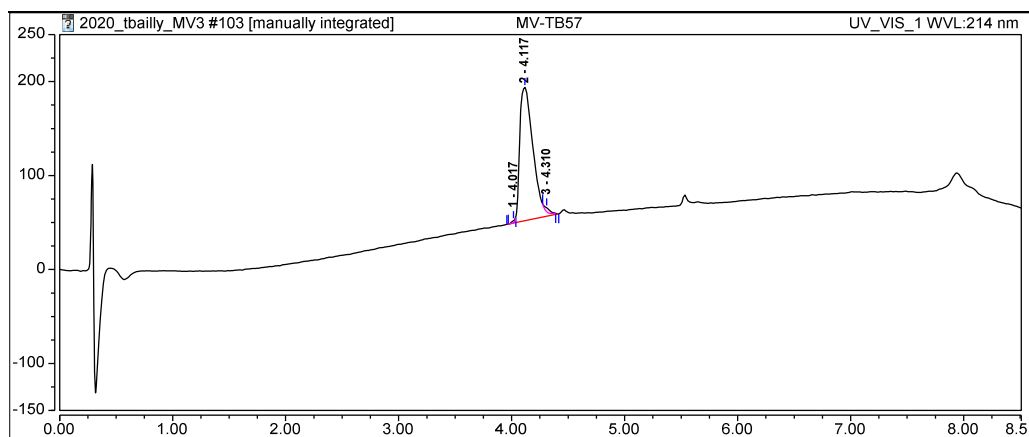
HATU (29.6 mg, 0.108 mmol) and DIEA (41.6  $\mu$ L, 0.433 mmol) were added to a solution of Cy-5-COOH (54.0 mg, 0.108 mmol) in DCM (15 mL) after which *N*-Boc-piperazine (10.3 mg, 0.119 mmol) was added to the reaction mixture that was left to stir at room temperature until completion of the reaction (1 h, monitored by HPLC-MS). TFA (3.5 mL) was then added to the crude and stirred at room temperature for 2 h (Boc removal monitored by HPLC-MS). The color of the solution switched from blue to green upon addition of the acid. The solvents were then evaporated under reduced pressure. The crude was then redissolved in DCM and washed with brine. The brine was then extracted with a mixture of DCM:iPrOH (70:30). The organic phases were assembled and evaporated under reduced pressure. The crude was then purified by RP-HPLC to give the Cy5-piperazine intermediate as an amorphous blue solid (58 mg, 0.103 mmol) in 95 % yield.

**HPLC:** *retention time* = 4.12 min, *purity* = 0.96,  $\lambda_{max}$  = 641 nm

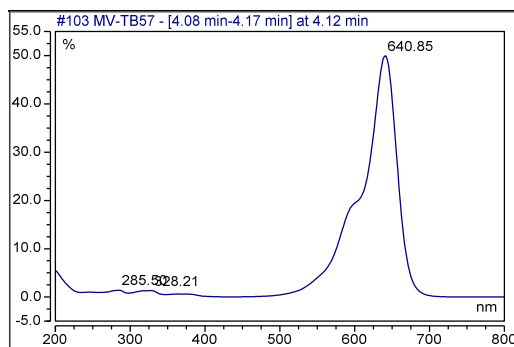
**LRMS:**  $[M]^+$  :  $m/z$  = 565.5 (calcd. for  $C_{37}H_{49}N_4O$  : 565.4)

**HRMS:**  $[M]^+$  :  $m/z$  = 565.38840 (calcd for  $C_{37}H_{49}N_4O$  : 565.39009)

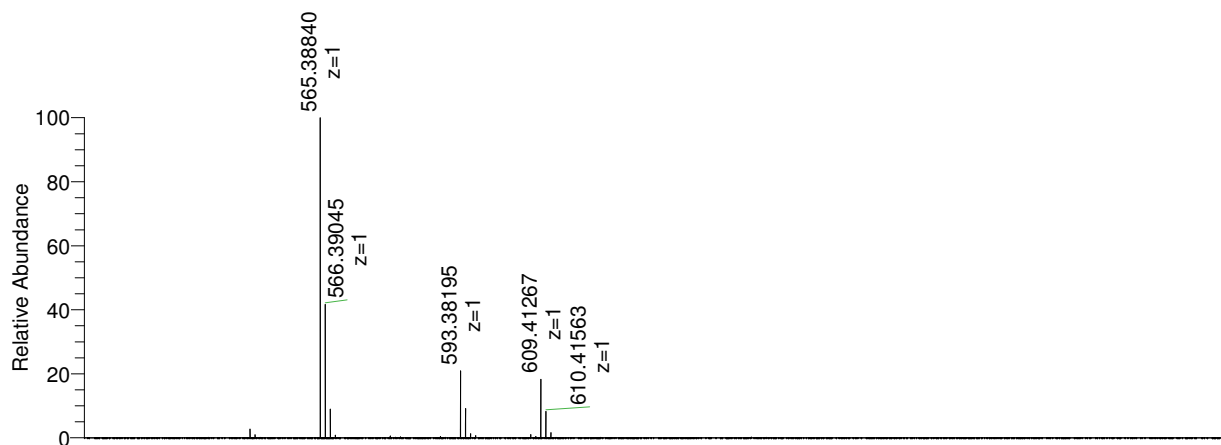
HPLC chromatogram:



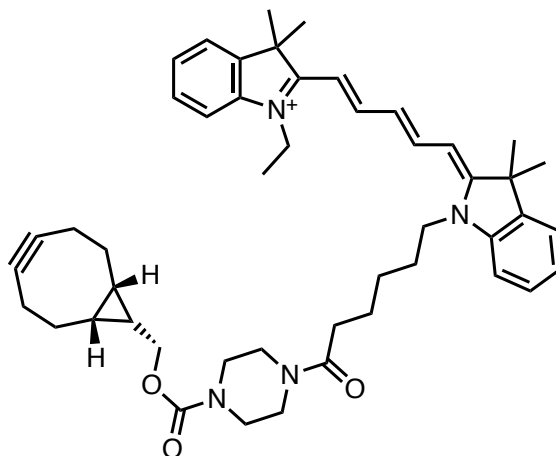
UV-Vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



**Cyanine 5-BCN, 9**



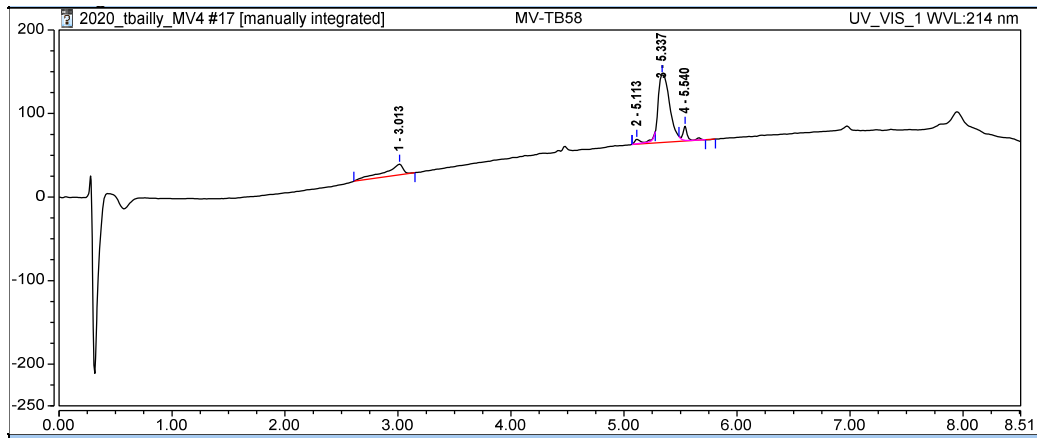
Endo BCN – active ester (p-NPE) (19.1 mg, 0.102 mmol) and DIEA (39.3  $\mu$ L, 0.410 mmol) were added to a solution of Cy5-piperazine (58 mg, 0.102 mmol) in DMF (1 mL). The reaction mixture was left to stir at 30  $^{\circ}$ C for 3 h. The crude was directly purified by RP-HPLC to give the desired blue powder **9** (7.0 mg, 0.0094 mmol) in 9% yield.

**HPLC:** retention time = 5.54 min, purity = 0.70,  $\lambda_{max}$  = 641 nm

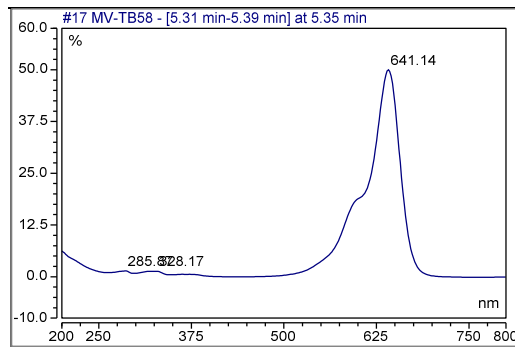
**LRMS:**  $[M]^+$  :  $m/z$  = 741.6 (calcd for  $C_{48}H_{61}N_4O_3$  : 741.5)

**HRMS:**  $[M]^+$  :  $m/z$  experimental = 741.47091 (calcd for  $C_{48}H_{61}N_4O_3$  : 741.47382)

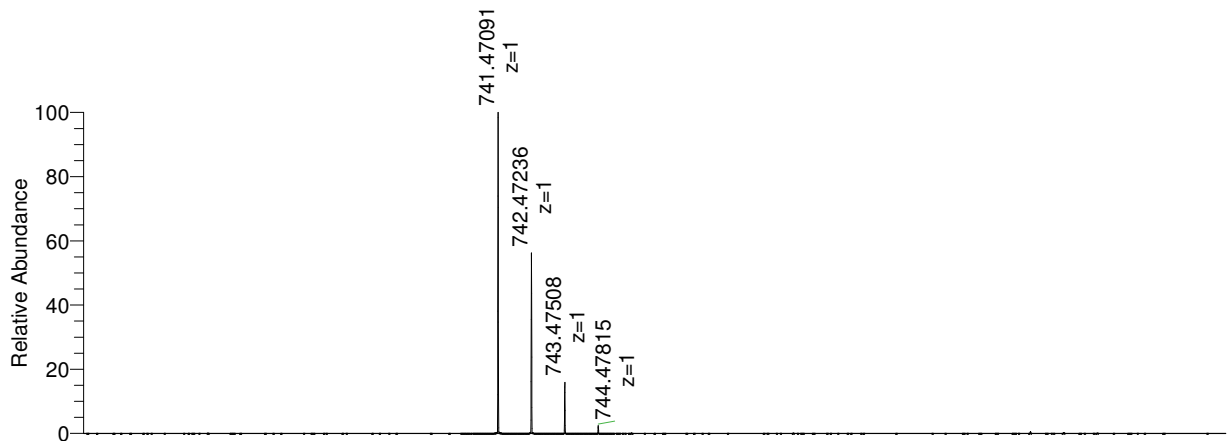
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:

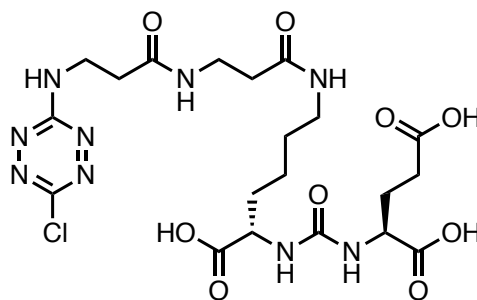


HRMS spectrum:





*KuE*-( $\beta$ Ala)<sub>2</sub>-Tz-Cl, **10**



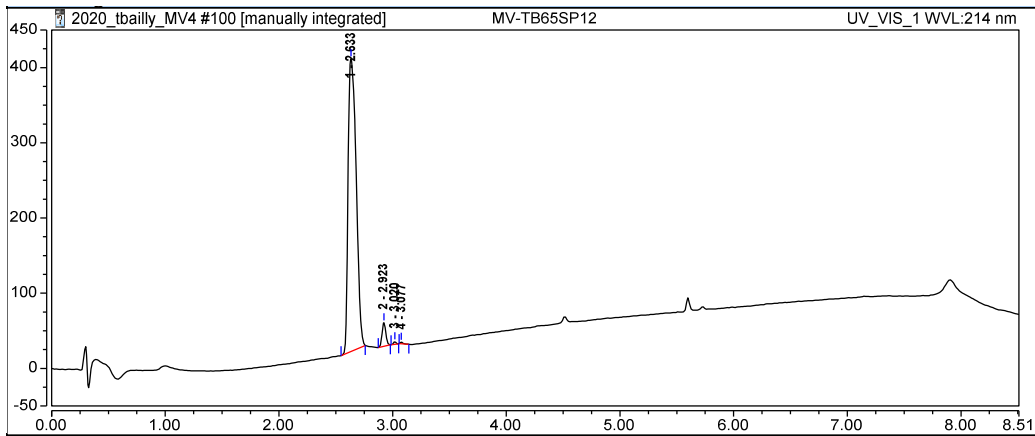
Dichlorotetrazine (42.5 mg, 0.282 mmol) was added to a solution of **4** (95.0 mg, 0.141 mmol) in PBS buffer (pH = 7.3). The reaction mixture was stirred at 25 °C until completion of the reaction (follow-up by HPLC-MS, 3 h). The crude was purified by RP-HPLC to give **10** as an orange powder after lyophilization in 16 % yield (18.0 mg, 0.023 mmol).

**HPLC:** *retention time* = 2.63 min, *purity* = 0.91,  $\lambda_{max}$  = 246, 402, 497 nm

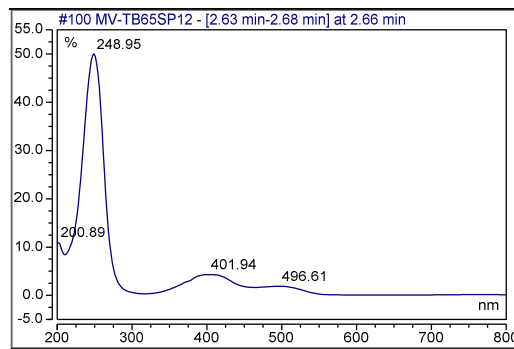
**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup> : *m/z* = 576.4 (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>9</sub>O<sub>9</sub> : 576.2)

**HRMS:** [M+Na]<sup>+</sup> experimental = 598.17373 (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>9</sub>O<sub>9</sub>Na : 598.17472)

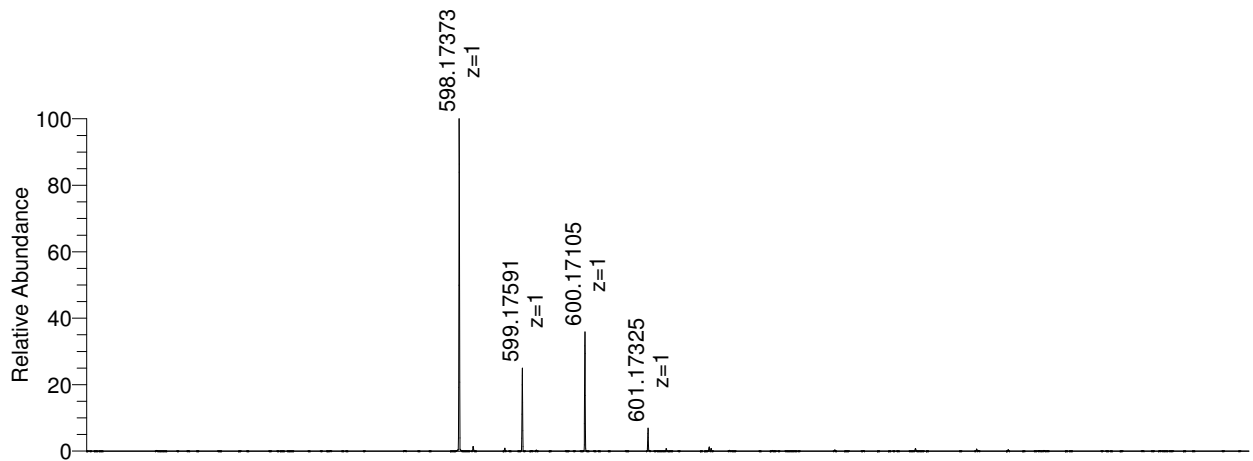
HPLC chromatogram:



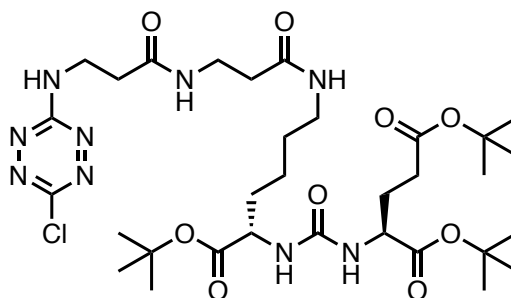
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*KuE(tBu<sub>3</sub>)-(βAla)<sub>2</sub>-Tz-Cl, 11*



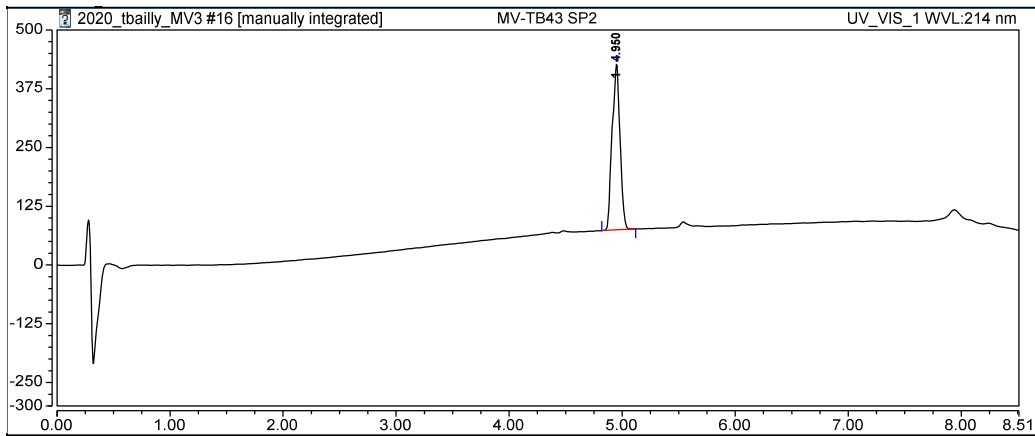
Dichlorotetrazine (23 mg, 0.15 mmol) was added to a solution of **5** (86 mg, 0.095 mmol) and DIPEA (70  $\mu$ L, 0.41 mmol) and left to stir at room temperature for 10 minutes. The crude was purified by RP-HPLC yielding to **11** as an orange powder (39 mg, 0.058 mmol) in 61% yield.

**HPLC:** *retention time* = 4.95 min, *purity* = > 0.99,  $\lambda_{max}$  = 249, 397, 506 nm

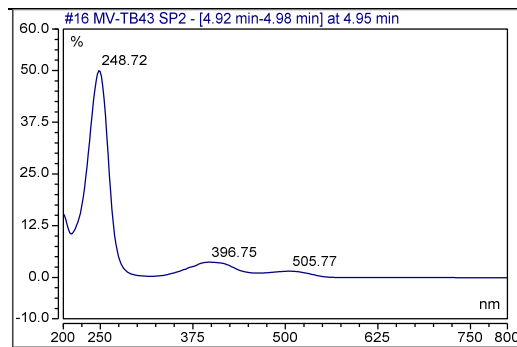
**LRMS:**  $[M+H]^+$   $m/z$  = 744.4 (calcd. C<sub>32</sub>H<sub>55</sub>ClN<sub>9</sub>O<sub>9</sub> : 744.4)

**HRMS:**  $[M+Na]^+$   $m/z$  = 766.36355 (calcd. C<sub>32</sub>H<sub>54</sub>ClN<sub>9</sub>O<sub>9</sub>Na : 766.36252)

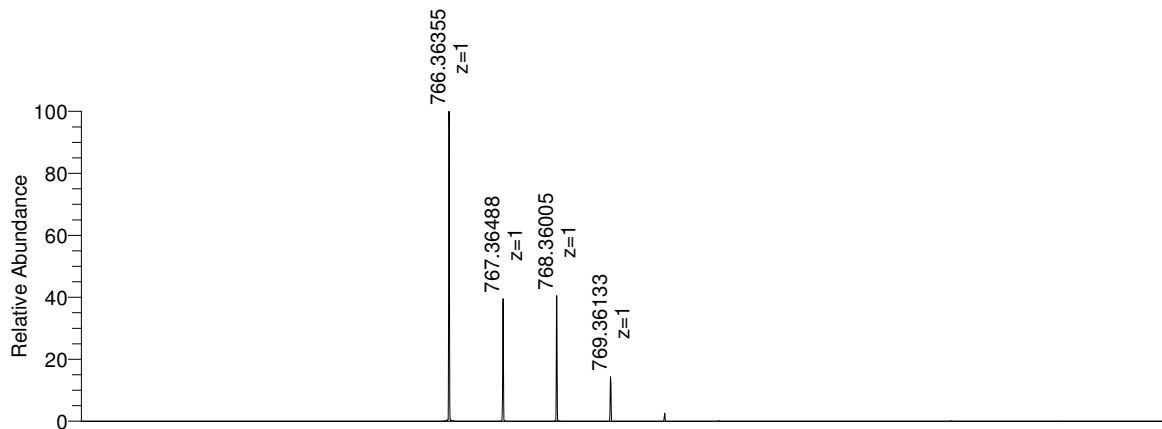
HPLC chromatogram:



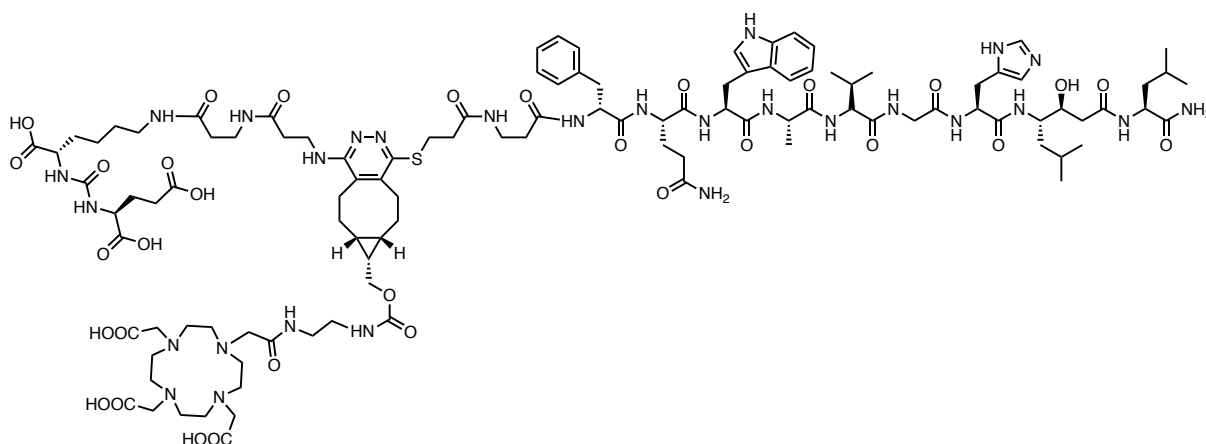
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



(*KuE-pdz-JMV594*)DOTA HBL (DOTA-HBL1), **12**



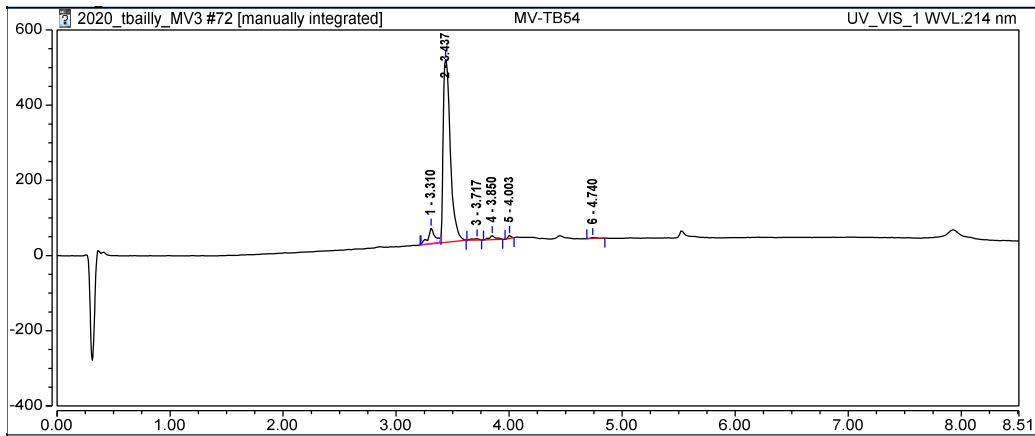
**6** (15.9 mg, 9.6  $\mu\text{mol}$ ) was added to a solution of **11** (9.8 mg, 12.5  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (0.7 mL). After addition of DIPEA (7  $\mu\text{L}$ , 39.5  $\mu\text{mol}$ ) the reaction mixture was left to stir at 80  $^{\circ}\text{C}$  for 5 h. After completion of the reaction (monitored by RP-HPLC-MS), BCN-DOTA (10.6 mg, 17.1  $\mu\text{mol}$ ) was added to the reaction mixture that was left to stir at room temperature for 20 h. The crude was then purified by RP-HPLC yielding to the protected product as a white powder. The white powder was dissolved in a mixture of TFA:TIS:EDT:water (95:2:2:1) (1 mL) and left to stir for 1 h. The crude was then precipitated in cold diethyl ether and was purified by RP-HPLC giving **12** as a white amorphous TFA salt (7.9 mg, 2.7  $\mu\text{mol}$ ) in 28% yield.

**HPLC:** retention time = 3.44 min, purity = 0.88,  $\lambda_{\text{max}}$  = 221, 258 nm

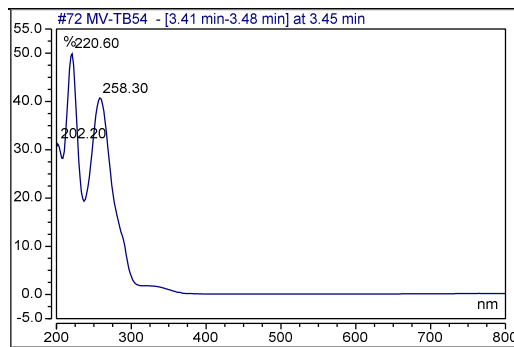
**LRMS:**  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ :  $m/z$  = 803.2 (calcd. for  $\text{C}_{110}\text{H}_{167}\text{N}_{28}\text{O}_{31}\text{S}$ : 803.1)

**HRMS:**  $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$   $m/z$  = 1214.59015 (calcd. For  $\text{C}_{110}\text{H}_{165}\text{N}_{28}\text{O}_{31}\text{SNa}$ : 1214.58790)

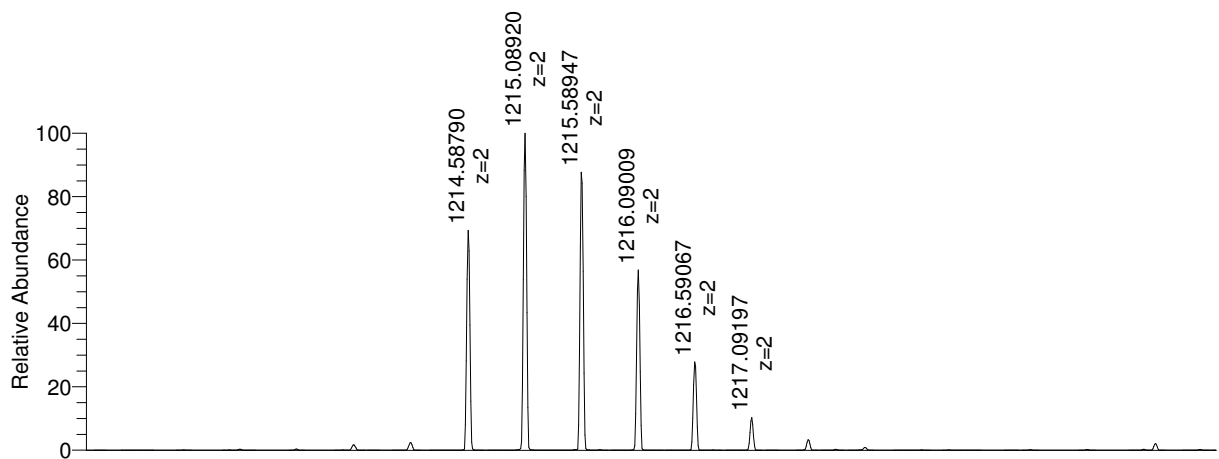
HPLC chromatogram:



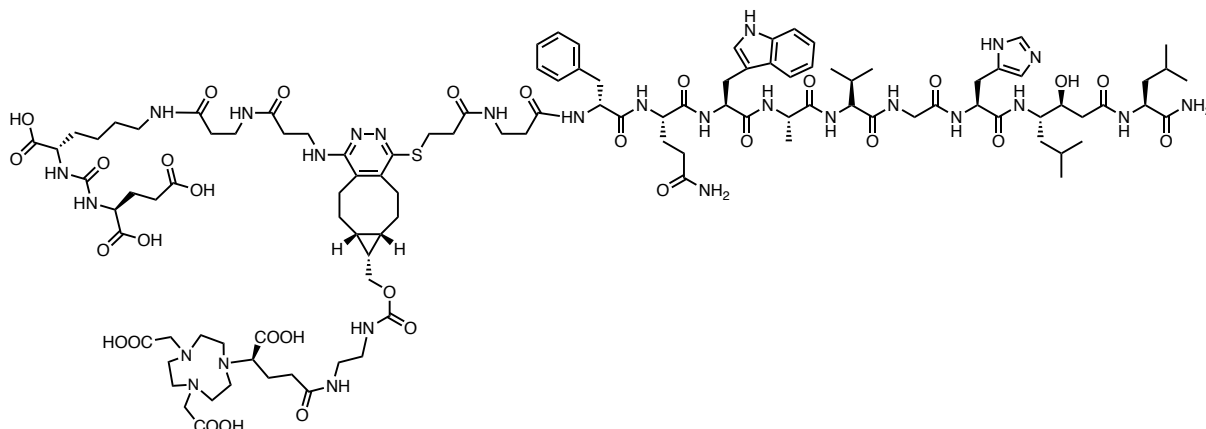
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



(*KuE-pdz-JMV594*)NODAGA HBL (NODAGA-HBL1), **13**



**Stepwise procedure:**

**6** (6.3 mg, 3.8  $\mu\text{mol}$ ) and DIEA (2.3  $\mu\text{L}$ , 12.8  $\mu\text{mol}$ ) were added to a solution of **11** (3.2 mg, 4.1  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (0.5 mL). The reaction was stirred at 80 °C for 3 h (after completion of the reaction, monitored by HPLC-MS) and BCN-NODAGA (6.9 mg, 11.6  $\mu\text{mol}$ ) was added to the reaction mixture that was left to stir for 20 h at 37 °C. The crude was directly purified by RP-HPLC to give the tBu-protected product as a white amorphous solid. The latter was then redissolved in a mixture of TFA:TIS:EDT:Water (95:2:2:1) and stirred for 1 h at room temperature. Cold diethyl ether was added to the reaction mixture resulting in the precipitation of the desired deprotected compound. The white solid was washed with cold diethyl ether and dried under vacuum resulting in a white amorphous TFA salt (1.44 mg, 0.54  $\mu\text{mol}$ ) in 13 % yield.

**One-pot procedure:**

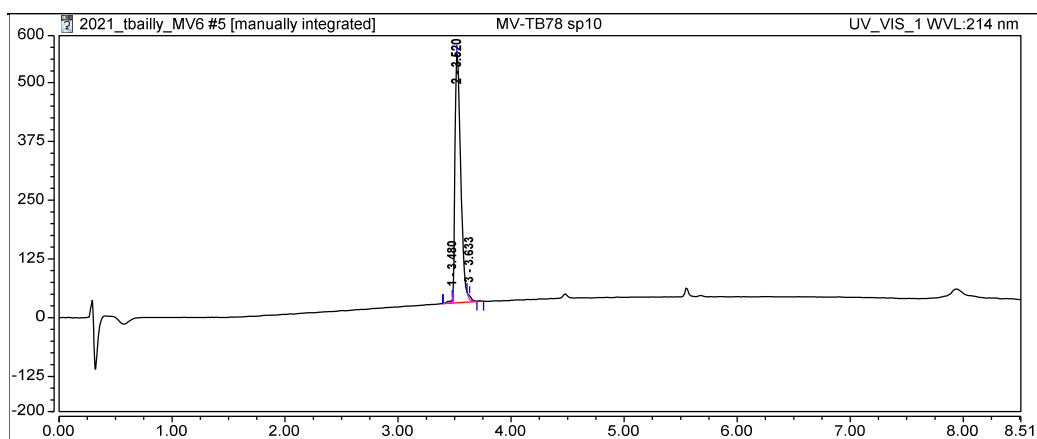
**5** (10.0 mg, 0.0111 mmol) and DIEA (11  $\mu\text{L}$ , 0.0635 mmol) was added to a solution of dichlorotetrazine (2.40 mg, 0.0159 mmol) in DMF (240  $\mu\text{L}$ ). After completion of the reaction (instantaneous, monitored by HPLC-MS), **6** (19.2 mg, 0.0116 mmol) was added to the reaction mixture that was left to stir at 80 °C for 4 h. BCN-NODAGA (17.9 mg, 0.030 mmol) was afterward added to the solution and the crude was stirred for 20 h at 37 °C. The reaction mixture was then directly purified by RP-HPLC-MS. The resulting white powder was dissolved in a mixture of TFA:TIS:EDT:Water (95:2:2:1) and stirred for 1 h at room temperature. Cold diethyl ether was added to the reaction mixture resulting in the precipitation of the desired deprotected compound. The white solid was washed with cold diethyl ether and dried under vacuum resulting in a white amorphous solid (8.1 mg, 2.8  $\mu\text{mol}$ ) in 26 % yield.

**HPLC:** retention time = 3.52 min, purity = 0.98,  $\lambda_{\text{max}}$  = 226, 306 nm

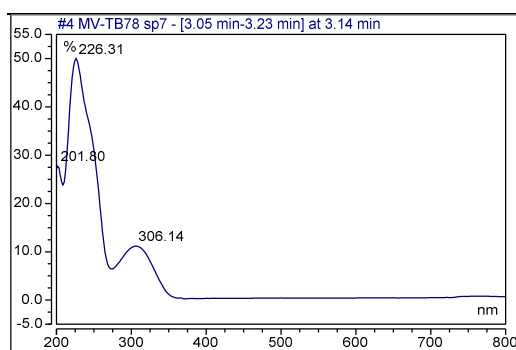
**LRMS:**  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$   $m/z$  = 793.7 (calcd. For  $\text{C}_{109}\text{H}_{164}\text{N}_{27}\text{O}_{31}\text{S}$  : 793.4)

**HRMS:**  $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$  = 1211.06930 (calcd for  $\text{C}_{109}\text{H}_{161}\text{N}_{27}\text{O}_{31}\text{SNa}_2$  : 1211.06785)

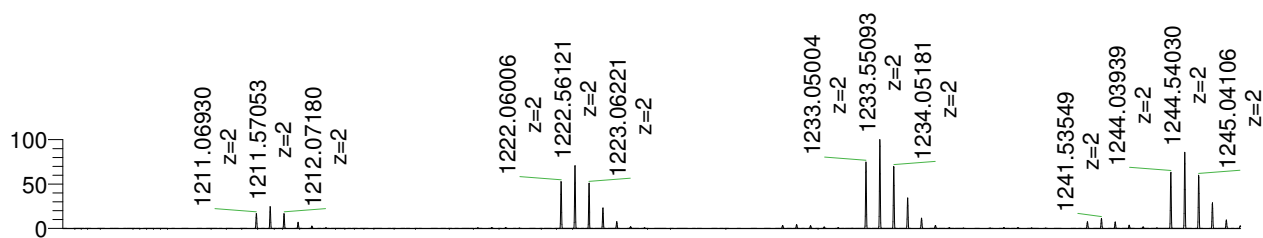
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:

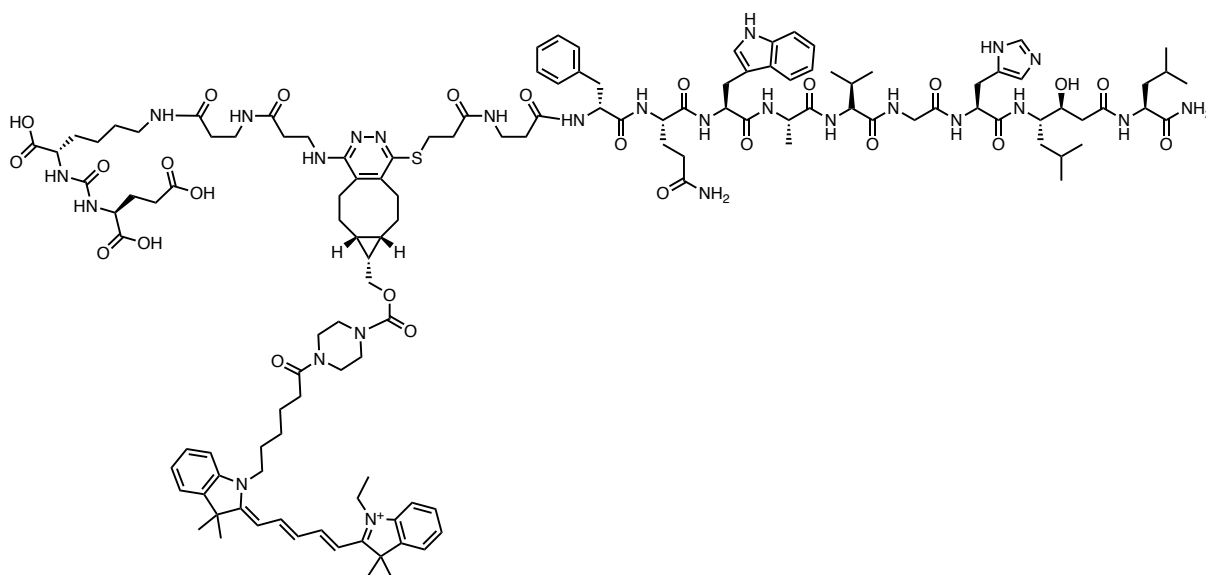


HRMS spectrum:





*(KuE-pdz-JMV594)Cy5 HBL (Cy5-HBL1), 14*



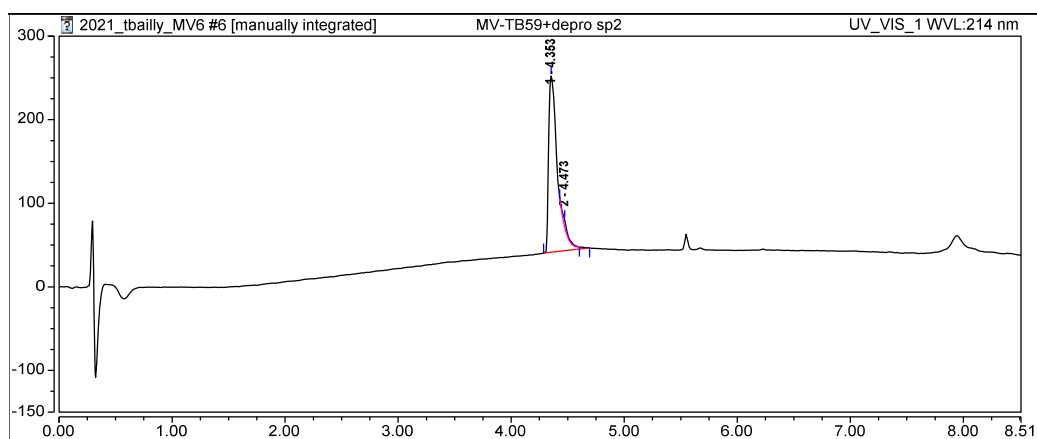
**6** (17.0 mg, 0.010 mmol) and DIEA (5.1  $\mu$ L, 0.053 mmol) were added to a solution of **11** (10 mg, 0.014 mmol) in DMF. The reaction mixture was left to stir at 80 °C for 5 h (monitored by RP-HPLC-MS). **9** (10.3 mg, 0.012 mmol) was added to the solution. The crude was then stirred at 40°C for 5 days (monitored by RP-HPLC-MS) and was directly purified by RP-HPLC. The obtained blue protected compound (8.0 mg, 0.003 mmol) was then dissolved in formic acid (1 mL) and stirred for 24 h at room temperature. The acid was evaporated under reduced pressure. The formylated residue was finally dissolved in aqueous ammonia (10%) in acetonitrile and stirred at room temperature for 1 h. Solvents were evaporated and the crude was purified by RP-HPLC to provide **14** (1.2 mg, 0.00043 mmol) in 4% yield.

**HPLC:** *retention time* = 4.35 min, *purity* = 0.96,  $\lambda_{max}$  = 642 nm

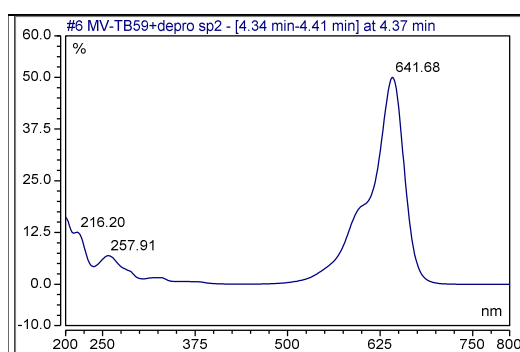
**LRMS:**  $[M+2H]^{3+}$  :  $m/z$  = 842.9 (calcd. for  $C_{129}H_{181}N_{26}O_{25}S$  : 842.1)

**HRMS:**  $[M+2H]^{3+}$  :  $m/z$  = 842,11201 (calcd. for  $C_{129}H_{181}N_{26}O_{25}S$  : 842.11318)

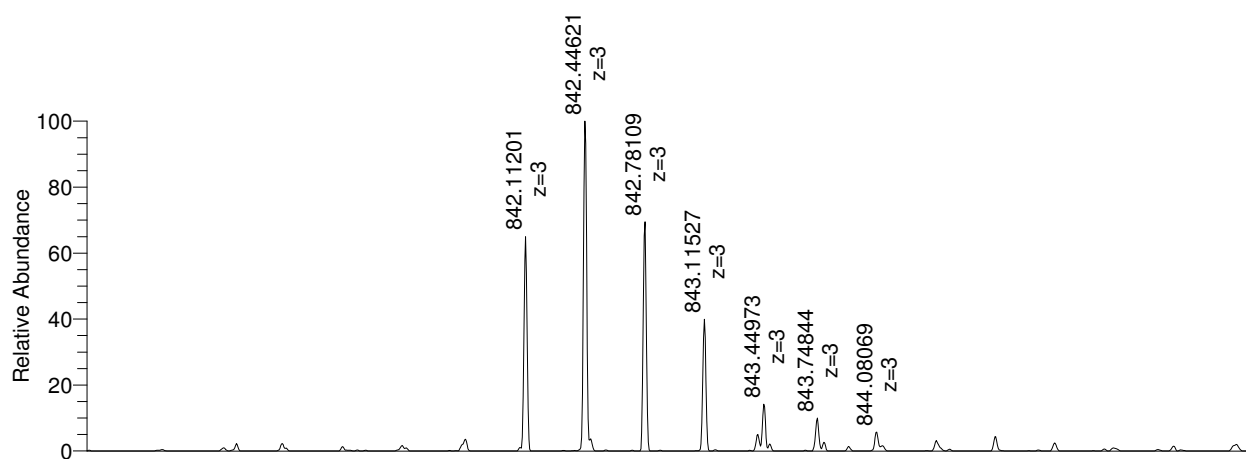
HPLC chromatogram:



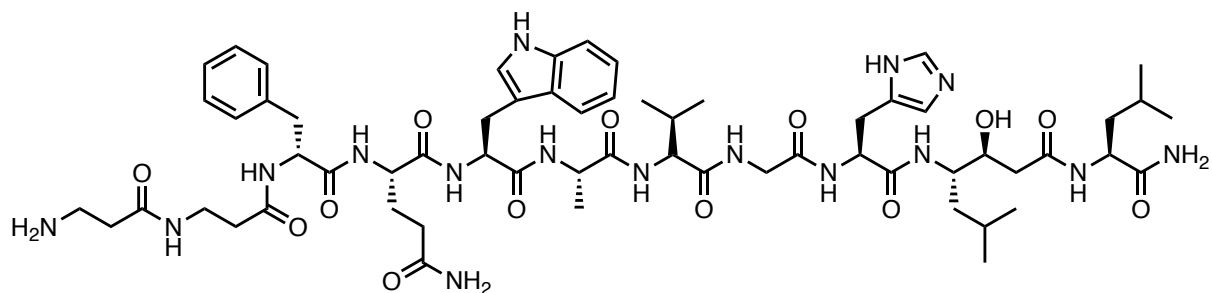
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*JMV594-(βAla)<sub>2</sub>*, **15**



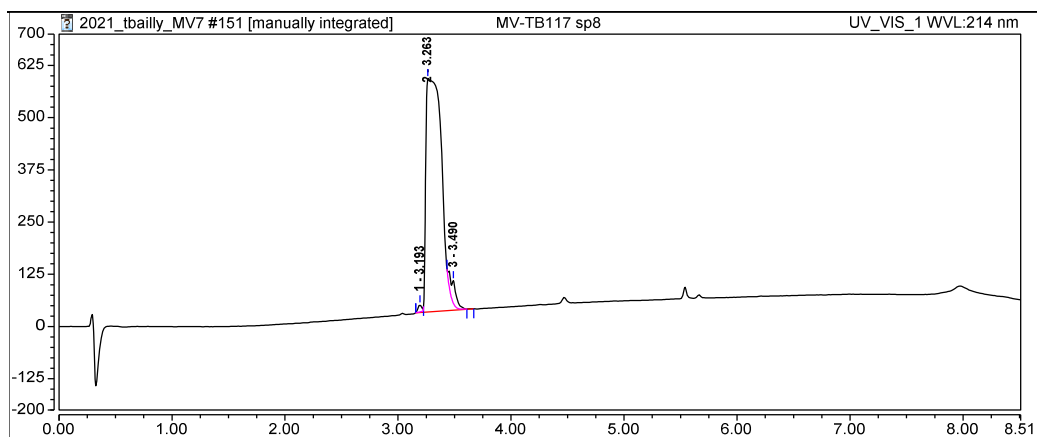
The peptide **7** was synthesized in an analogous manner as the thio-derivatized peptide **6** on a Rink amide resin (250 mg, 0.48 mmol/g, 75-150  $\mu$ m, Iris Biotech). The only difference between the two syntheses is that the final 3-(tritylthio)-propionic acid was replaced by a second  $\beta$  Alanine residue directly added by automated SPPS. The targeted molecule was obtained in 18 % yield (30.4 mg, 0.0218 mmol).

**HPLC:** *retention time* = 3.26 min, *purity* = 0.89,  $\lambda_{max}$  = 223, 280 nm

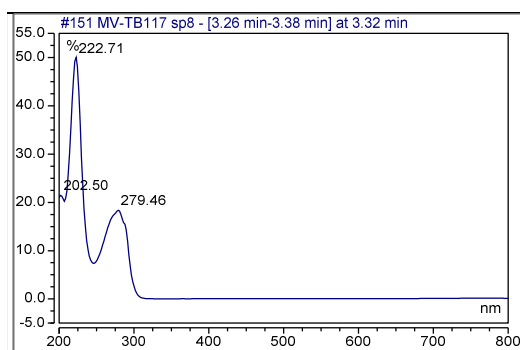
**LRMS:**  $[M+H]^+$  *m/z* = 1256.5 (calcd. for  $C_{61}H_{91}N_{16}O_{13}$ : 1255.7)

**HRMS:**  $[M+H]^+$  *m/z* = 1255.69327 (calcd. for  $C_{61}H_{91}N_{16}O_{13}$ : 1255.69)

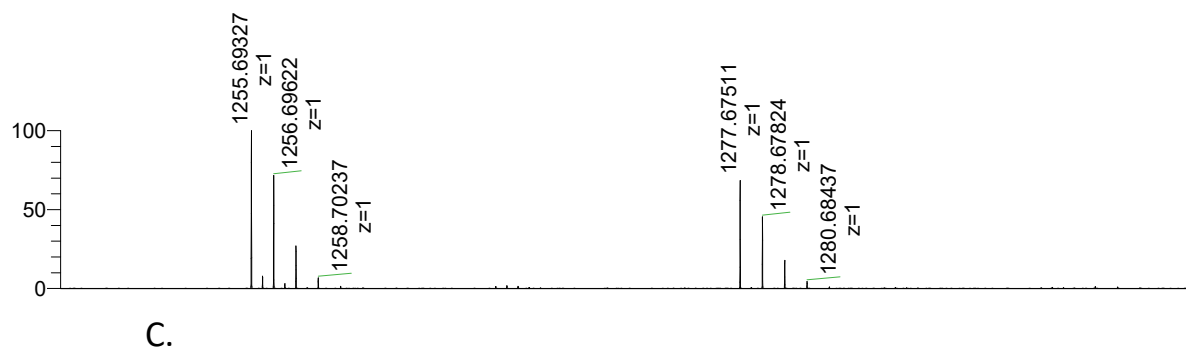
HPLC chromatogram:



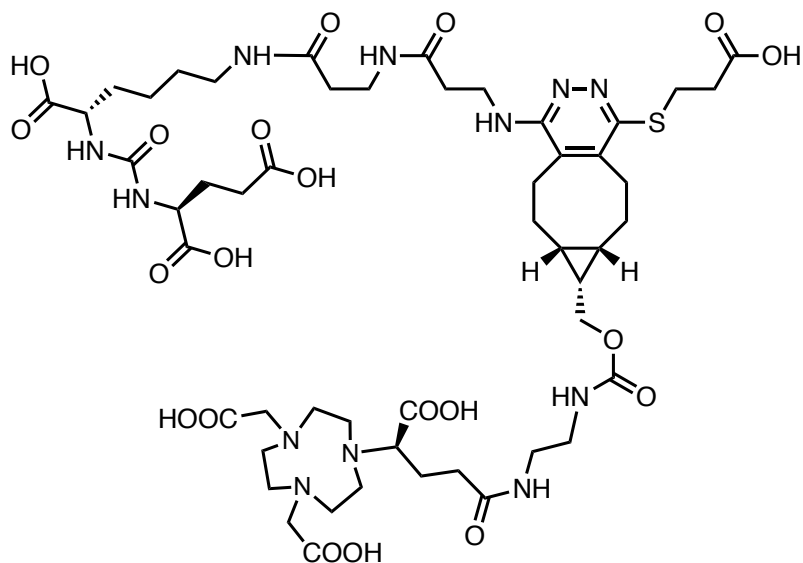
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*(KuE-pdz-mercaptopropionic acid)NODAGA (PSMA-MVL), 16*



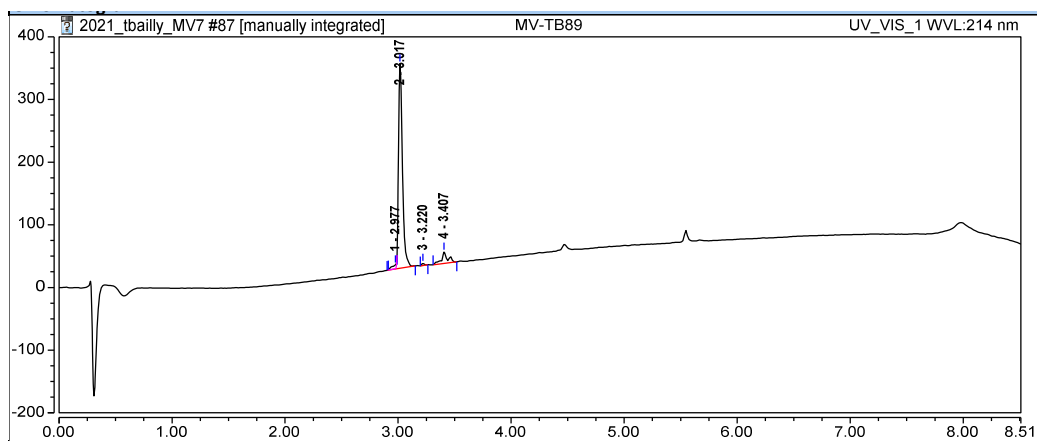
**5** (15.0 mg, 0.024 mmol) and DIEA (17  $\mu$ L, 0.095 mmol) were added to a solution of dichlorotetrazine (3.9 mg, 0.026 mmol) in DMF (500  $\mu$ L). Right afterward, mercaptopropionic acid (3.6  $\mu$ L, 0.026 mmol) was added to the reaction mixture that was stirred at 80  $^{\circ}$ C until completion (2 h, follow-up by HPLC-MS). NODAGA-BCN (15.6 mg, 0.026 mmol) was finally added to the crude. It was stirred at 37  $^{\circ}$ C for 48 h and the reaction mixture was then directly purified by RP-HPLC-MS. The resulting white powder was dissolved in a mixture of TFA:TIS:EDT:Water (95:2:2:1) and stirred for 1 h at room temperature. Cold diethyl ether was added to the reaction mixture resulting in the precipitation of the desired deprotected compound. The white solid was washed with cold diethyl ether and dried under vacuum resulting in a white amorphous solid (11.1 mg, 8.4  $\mu$ mol) in 35 % yield.

**HPLC:** *retention time* = 3.02 min, *purity* = 0.90,  $\lambda_{max}$  = 256 nm

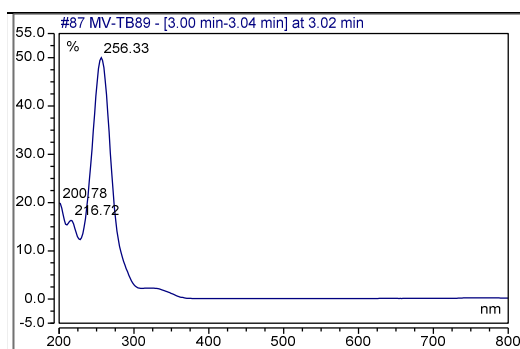
**LRMS:**  $[M+H]^+$   $m/z$  = 1212.4 (calcd. for  $C_{51}H_{79}N_{12}O_{20}S$ : 1211.5)

**HRMS:**  $[M-2H]^-$   $m/z$  = 604.25115 (calcd. for  $C_{51}H_{76}N_{12}O_{20}S$  : 604.25152)

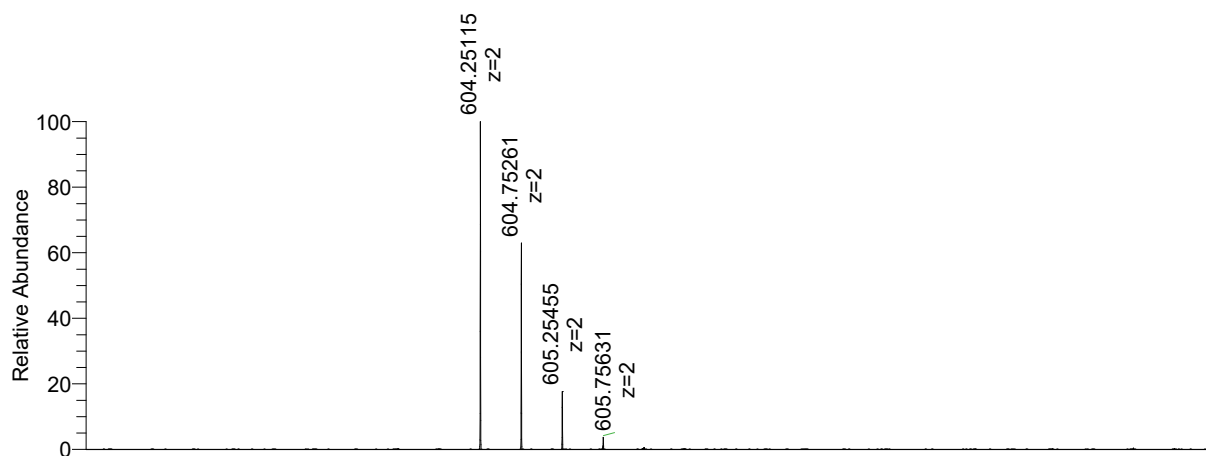
HPLC chromatogram:



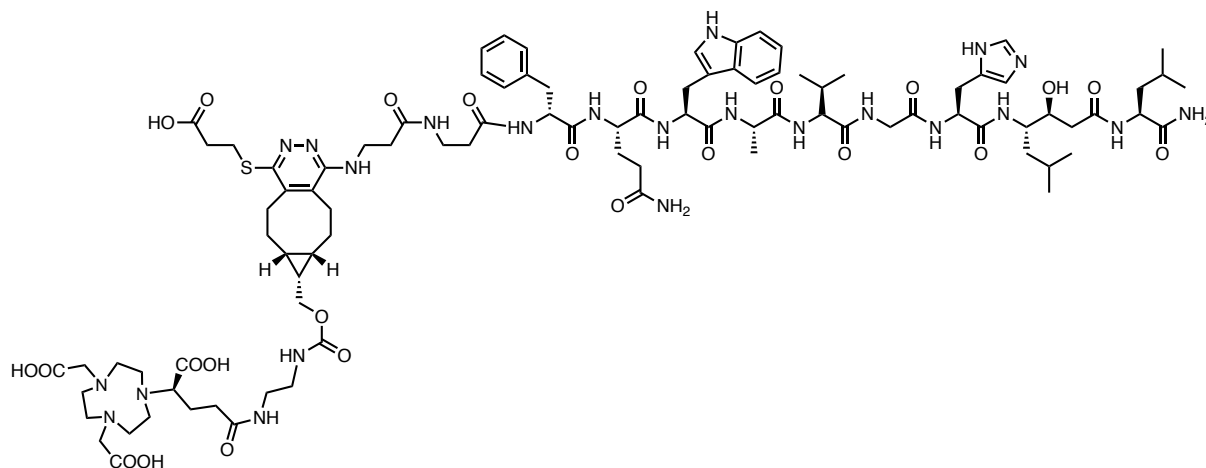
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*(JMV594-pdz-mercaptopropionic acid)NODAGA (JMV594-MVL), 17*



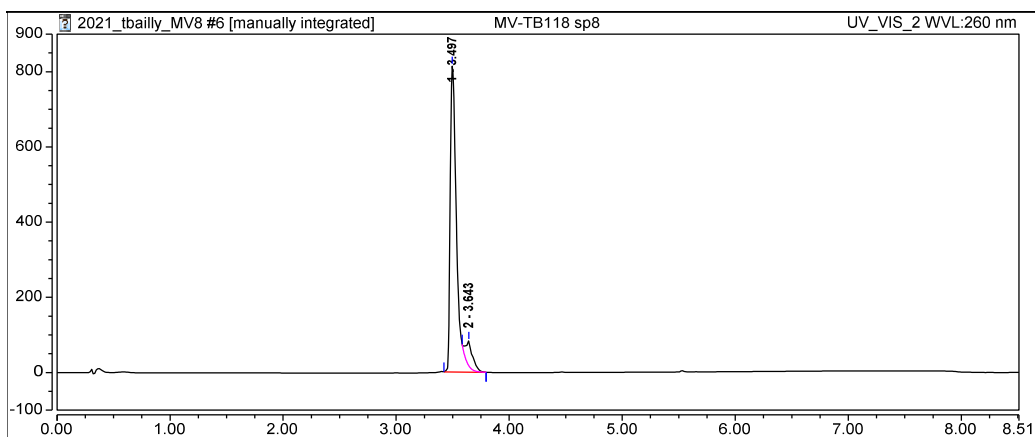
**15** (11.8 mg, 8.46  $\mu\text{mol}$ ) and DIEA (6  $\mu\text{L}$ , 0.034 mmol) were added to a solution of dichlorotetrazine (1.3 mg, 8.46  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (200  $\mu\text{L}$ ). Right afterward, mercaptopropionic acid (0.73  $\mu\text{L}$ , 8.37  $\mu\text{mol}$ ) was added to the reaction mixture that was stirred at 80  $^{\circ}\text{C}$  until completion (2 h, follow-up by HPLC-MS). NODAGA-BCN (10. mg, 0.017 mmol) was finally added to the crude. It was stirred at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 48 h and the reaction mixture was then directly purified by RP-HPLC-MS resulting in a white amorphous solid (1.5 mg, 0.65  $\mu\text{mol}$ ) in 8 % yield.

**HPLC:** retention time = 3.50 min, purity = 0.92,  $\lambda_{\text{max}}$  = 221, 258 nm

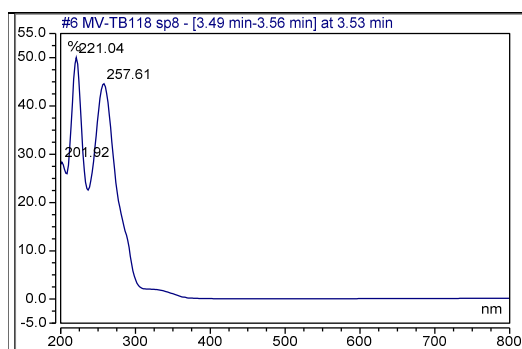
**LRMS:**  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$   $m/z$  = 1003.6 (calcd. for  $\text{C}_{94}\text{H}_{139}\text{N}_{23}\text{O}_{24}\text{S}$  : 1003.0)

**HRMS:**  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$   $m/z$  = 1003.00394 (calcd. for  $\text{C}_{94}\text{H}_{139}\text{N}_{23}\text{O}_{24}\text{S}$  : 1003.00365)

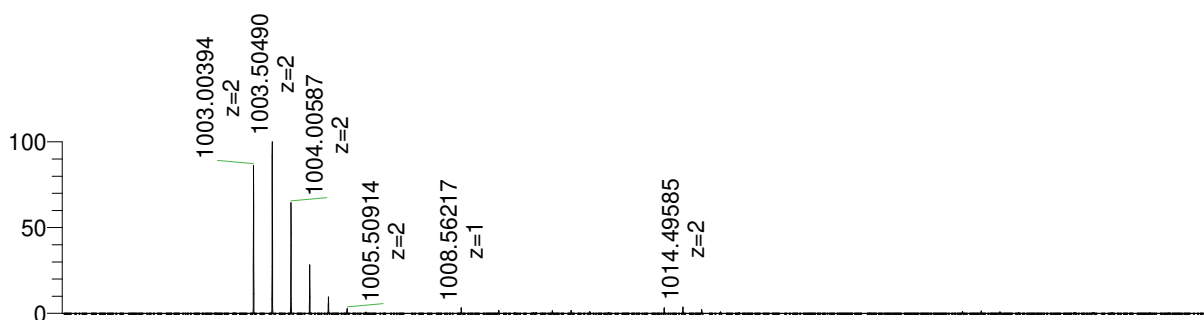
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:

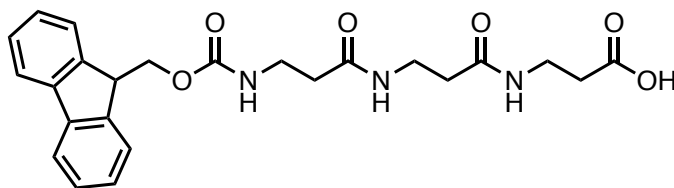


HRMS spectrum:





*Fmoc-(βAla)<sub>3</sub>-OH, 19*



The synthesis of **19** was carried out by manual solid-phase synthesis on 2-CTC resin (0.45 g, 1.6 mmol/g) previously grafted with *N*-Fmoc-βAla-OH (1.3 mmol/g) and capped with a mixture of MeOH and DIEA (5:1 v/v). Amino acids were coupled according to this procedure: AA (2 eq) and HATU (2 eq) were dissolved in DMF (2 mL). DIPEA (4 eq) was added to the solution which was directly added to the resin. The suspension was stirred for 2h at room temperature. Fmoc protecting groups were removed with 20 % v/v peptide grade piperidine (Iris Biotech) solution in peptide grade DMF (Carlo Erba). The cleavage of the resin was achieved using a solution of hexafluoroisopropanol (20 %) in DCM (3 × 2 mL, 3 × 20 min). The solvents were evaporated under reduced pressure. The resulting oil was solubilized in methanol (0.5 mL) and precipitated in diethyl ether (4 °C) to give the desired linker as a white powder (145 mg, 0.32 mmol) in 55 % yield.

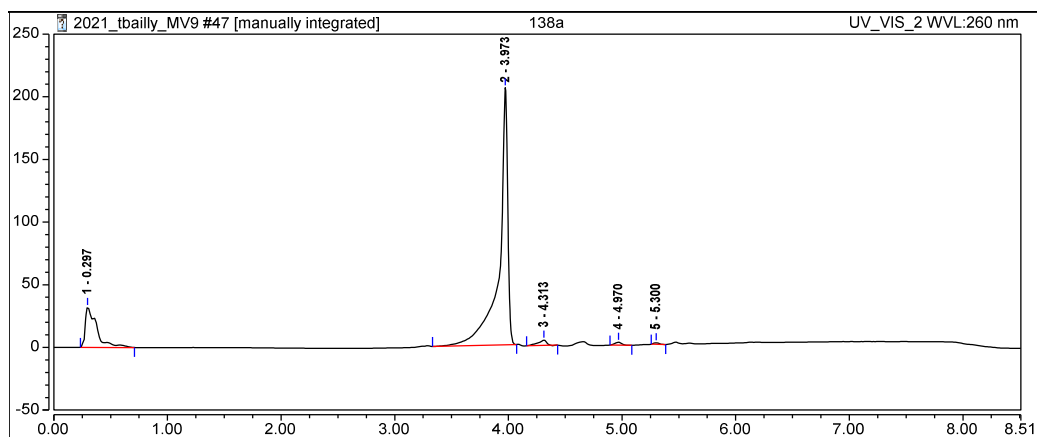
**HPLC:** *retention time* = 3.97 min, *purity* = 0.80,  $\lambda_{max}$  = 203, 264, 299 nm

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7.93 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.68 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.41 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.32 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.28 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 5.75 (s, 1H), 4.27 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.20 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.26 – 3.16 (m, 6H), 2.36 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.22 (q, *J* = 7.8 Hz, 4H).

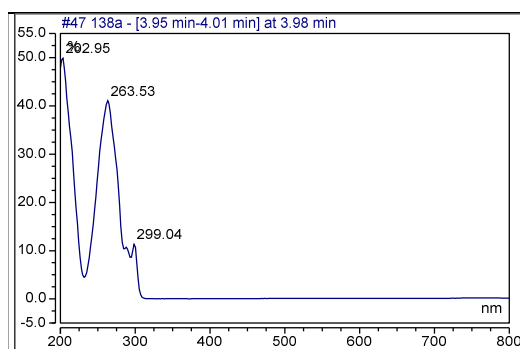
**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 454.4 (calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>: 454.2)

**HRMS:** [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 476.17848 (calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Na: 476.17921)

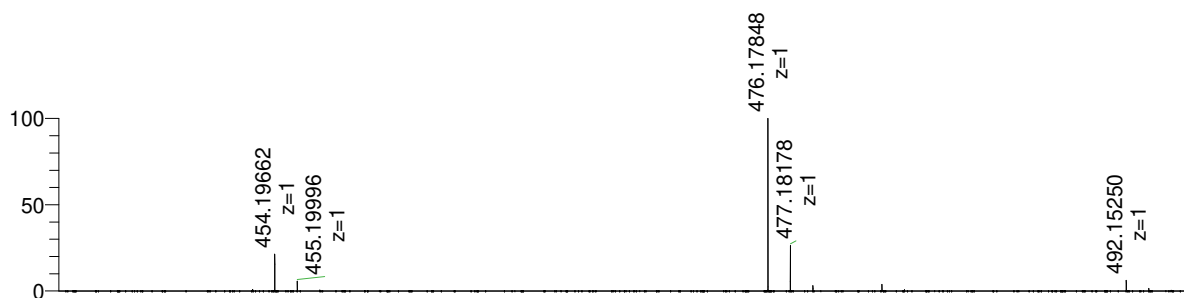
HPLC chromatogram:



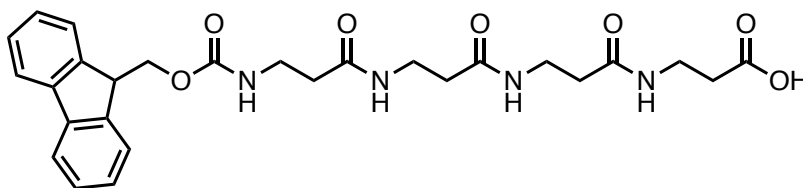
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*Fmoc-(βAla)<sub>4</sub>-OH, 20*



The synthesis of **20** was carried out by manual solid-phase synthesis on 2-CTC resin (0.4 g, 1.6 mmol/g) previously grafted with *N*-Fmoc-βAla-OH (1.3 mmol/g) and capped with a mixture of MeOH and DIEA (5:1 v/v). Amino acids were coupled according to this procedure: AA (2 eq) and HATU (2 eq) were dissolved in DMF (2 mL). DIPEA (4 eq) was added to the solution which was directly added to the resin. The suspension was stirred for 2h at room temperature. Fmoc protecting groups were removed with 20 % v/v peptide grade piperidine (Iris Biotech) solution in peptide grade DMF (Carlo Erba). The cleavage of the resin was achieved using a solution of hexafluoroisopropanol (20 %) in DCM (3 × 2 mL, 3 × 20 min). The solvents were evaporated under reduced pressure. The resulting oil was solubilized in methanol (0.5 mL) and precipitated in diethyl ether (4 °C) to give the desired linker as a white powder (223 mg, 0.42 mmol) in 81 % yield.

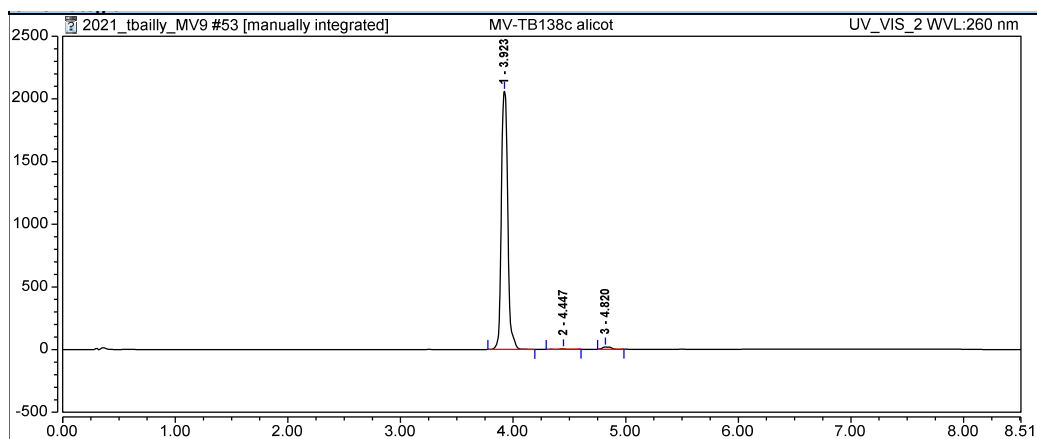
**HPLC:** *retention time* = 3.92 min, *purity* = 0.99,  $\lambda_{max}$  = 219, 265, 299 nm

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.92 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.90 – 7.84 (m, 3H), 7.68 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.41 (t, *J* = 7.5, 2H), 7.32 (t, *J* = 7.5, 2H), 7.29 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 5.75 (s, 1H), 4.27 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 4.21 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 3.25 – 3.17 (m, 8H), 2.35 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.25 – 2.18 (m, 6H).

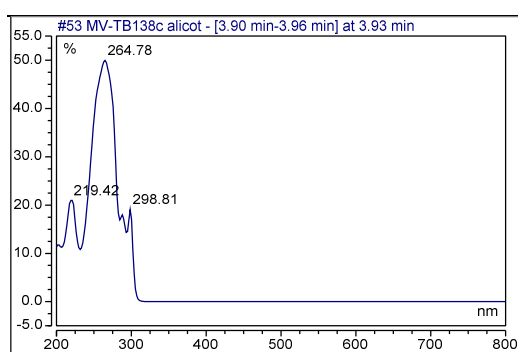
**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 525.5 (calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>: 525.2)

**HRMS:** [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 547.21567 (calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>Na: 547.21632)

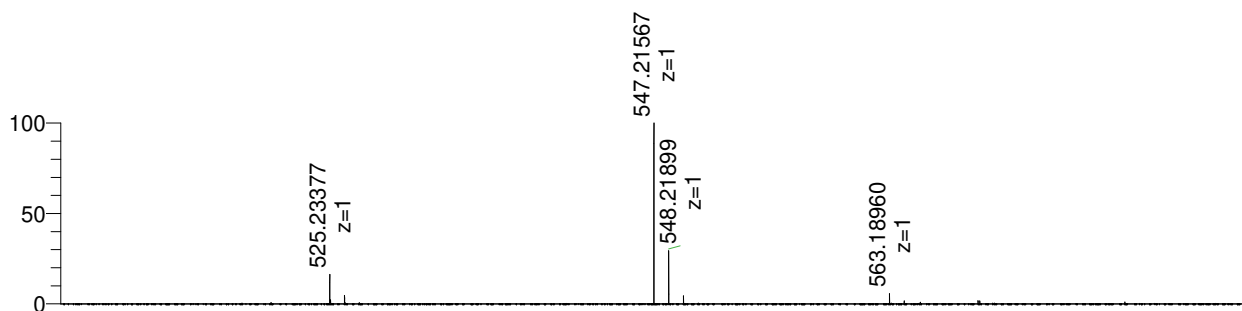
HPLC chromatogram:



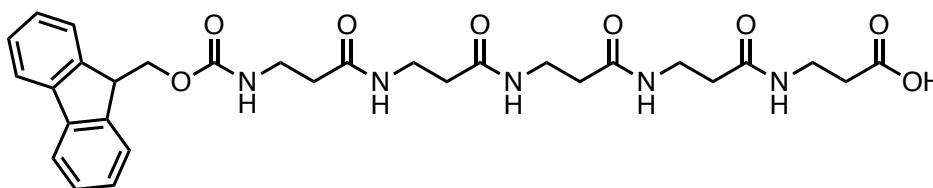
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*Fmoc-(βAla)<sub>5</sub>-OH, 21*



The synthesis of **21** was carried out by manual solid-phase synthesis on 2-CTC resin (0.4 g, 1.6 mmol/g) previously grafted with *N*-Fmoc-βAla-OH (1.3 mmol/g) and capped with a mixture of MeOH and DIEA (5:1 v/v). Amino acids were coupled according to this procedure: AA (2 eq) and HATU (2 eq) were dissolved in DMF (2 mL). DIPEA (4 eq) was added to the solution which was directly added to the resin. The suspension was stirred for 2h at room temperature. Fmoc protecting groups were removed with 20 % v/v peptide grade piperidine (Iris Biotech) solution in peptide grade DMF (Carlo Erba). The cleavage of the resin was achieved using a solution of hexafluoroisopropanol (20 %) in DCM (3 × 2 mL, 3 × 20 min). The solvents were evaporated under reduced pressure. The resulting oil was solubilized in methanol (0.5 mL) and precipitated in diethyl ether (4 °C) to give the desired linker as a white powder (159 mg, 0.27 mmol) in 42 % yield.

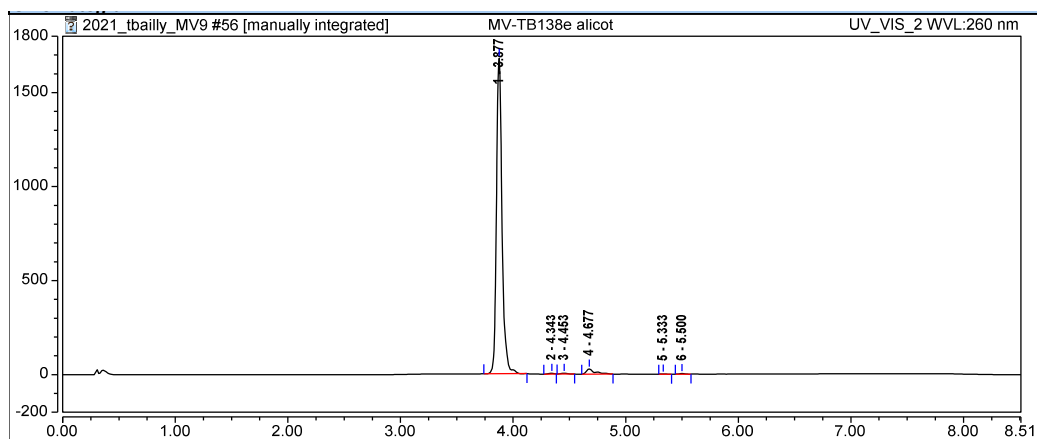
**HPLC:** *retention time* = 3.87 min, *purity* = 0.97,  $\lambda_{max}$  = 218, 264, 299 nm

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7.92 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 5H), 7.68 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.41 (td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 2H), 7.32 (td, *J* = 7.4, 1.2 Hz, 2H), 7.28 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.27 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.20 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.25 – 3.15 (m, 10H), 2.36 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.25 – 2.18 (m, 8H).

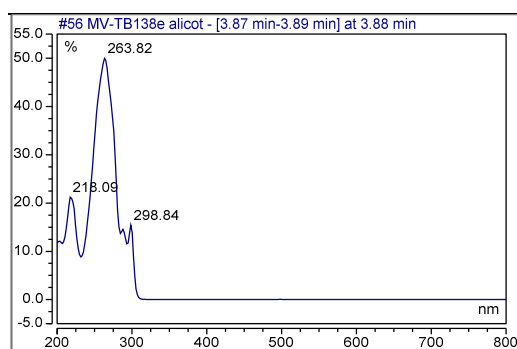
**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 596.6 (calcd. for C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>: 596.3)

**HRMS:** [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 618.25270 (calcd. for C<sub>30</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>Na: 618.25343)

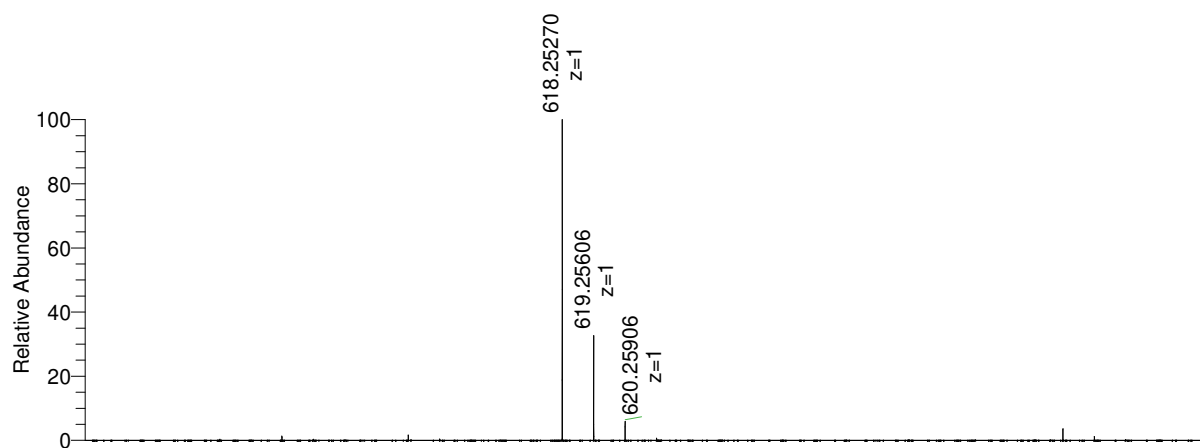
HPLC chromatogram:



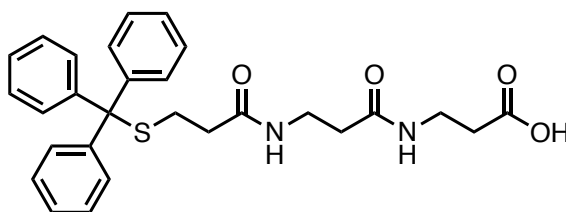
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*S*(Trt)mercaptopropionyl-(βAla)<sub>2</sub>-OH, **22**



The synthesis of **22** was carried out by manual solid-phase synthesis on 2-CTC resin (0.45 g, 1.6 mmol/g) previously grafted with N-Fmoc-βAla-OH (1.3 mmol/g) and capped with a mixture of MeOH and DIEA (5:1 v/v). Amino acids were coupled according to this procedure: AA (2 eq) and HATU (2 eq) were dissolved in DMF (2 mL). DIPEA (4 eq) was added to the solution which was directly added to the resin. The suspension was stirred for 2 h at room temperature. Fmoc protecting groups were removed with 20 % v/v peptide grade piperidine (Iris Biotech) solution in peptide grade DMF (Carlo Erba). The cleavage of the resin was achieved using a solution of hexafluoroisopropanol (20 %) in DCM (3 × 2 mL, 3 × 20 min). The solvents were evaporated under reduced pressure. The resulting oil was solubilized in methanol (0.5 mL) and precipitated in diethyl ether (4 °C) to give the desired linker as a white powder (170 mg, 0.35 mmol) in 60 % yield.

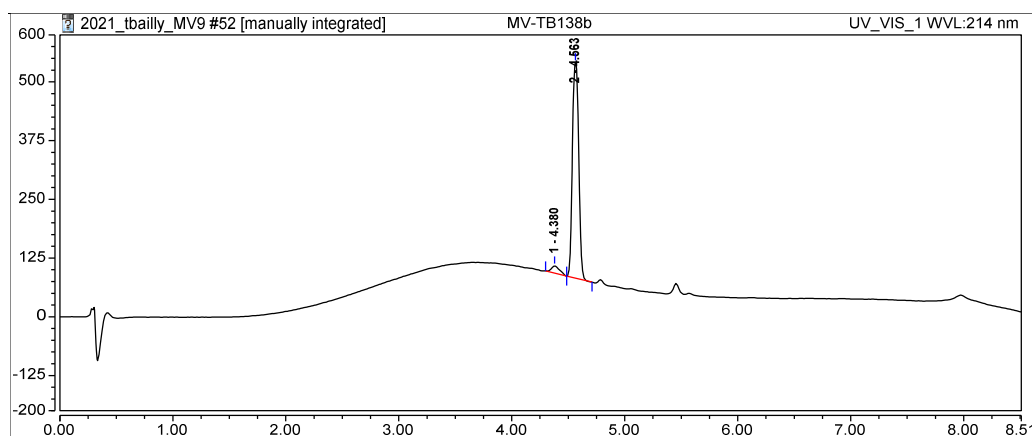
**HPLC:** *retention time* = 4.56 min, *purity* = 0.96,  $\lambda_{max}$  = 201, 222 nm

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.90 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.81 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.37 – 7.22 (m, 15H), 3.25 – 3.14 (m, 4H), 2.35 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.23 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.17 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.12 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H).

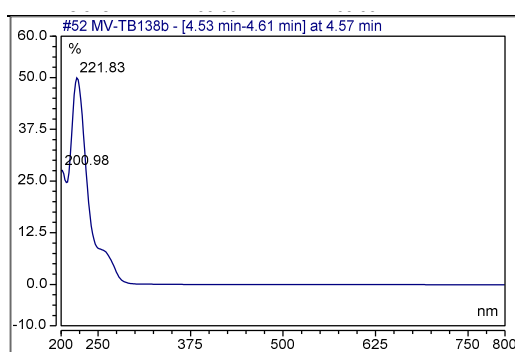
**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 491.4 (calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S: 491.2)

**HRMS:** [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 513.18101 (calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na: 513.18185)

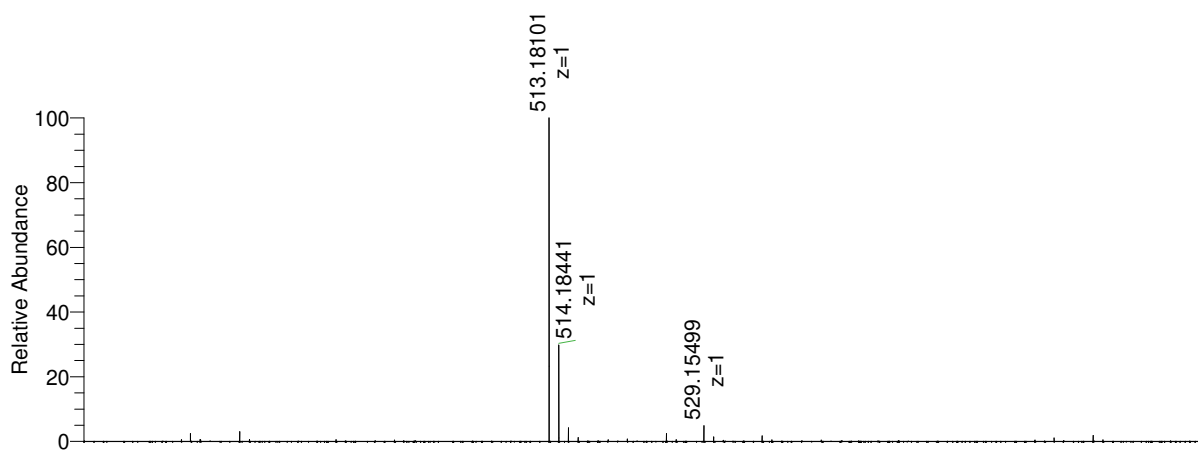
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum

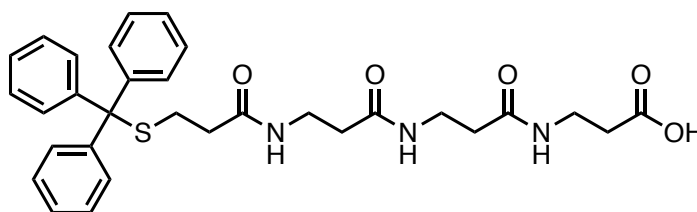


HRMS spectrum:





*S*(Trt)mercaptopropionyl-(βAla)<sub>3</sub>-OH, **23**



The synthesis of **23** was carried out by manual solid-phase synthesis on 2-CTC resin (0.4 g, 1.6 mmol/g) previously grafted with *N*-Fmoc-βAla-OH (1.3 mmol/g) and capped with a mixture of MeOH and DIEA (5:1 v/v). Amino acids were coupled according to this procedure: AA (2 eq) and HATU (2 eq) were dissolved in DMF (2 mL). DIPEA (4 eq) was added to the solution which was directly added to the resin. The suspension was stirred for 2 h at room temperature. Fmoc protecting groups were removed with 20 % v/v peptide grade piperidine (Iris Biotech) solution in peptide grade DMF (Carlo Erba). The cleavage of the resin was achieved using a solution of hexafluoroisopropanol (20 %) in DCM (3 × 2 mL, 3 × 20 min). The solvents were evaporated under reduced pressure. The resulting oil was solubilized in methanol (0.5 mL) and precipitated in diethyl ether (4 °C) to give the desired linker as a white powder (121 mg, 0.22 mmol) in 34 % yield.

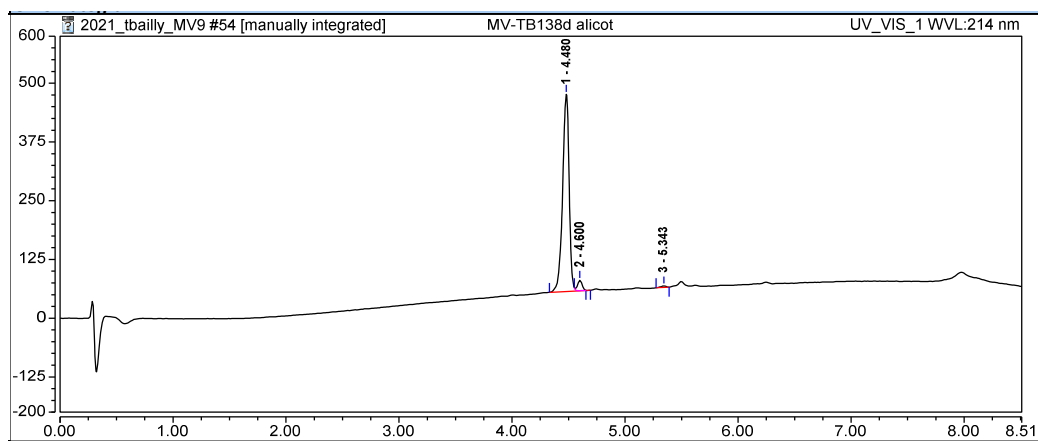
**HPLC:** retention time = 4.48 min, purity = 0.96,  $\lambda_{max}$  = 201, 216 nm

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.91 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.84 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.81 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.36 – 7.28 (m, 12H), 7.28 – 7.22 (m, 3H), 3.25 – 3.15 (m, 6H), 2.35 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.25 – 2.10 (m, 8H).

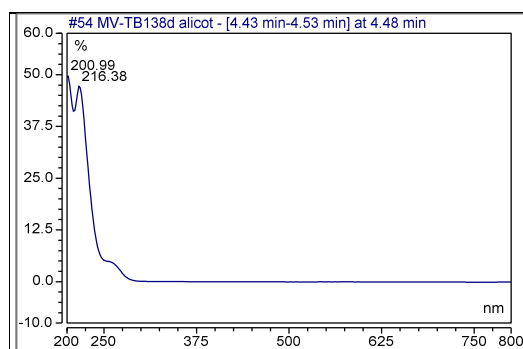
**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 562.3 (calcd. for C<sub>31</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S: 562.2)

**HRMS:** [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 584.21833 (calcd. for C<sub>31</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Na: 584.21896)

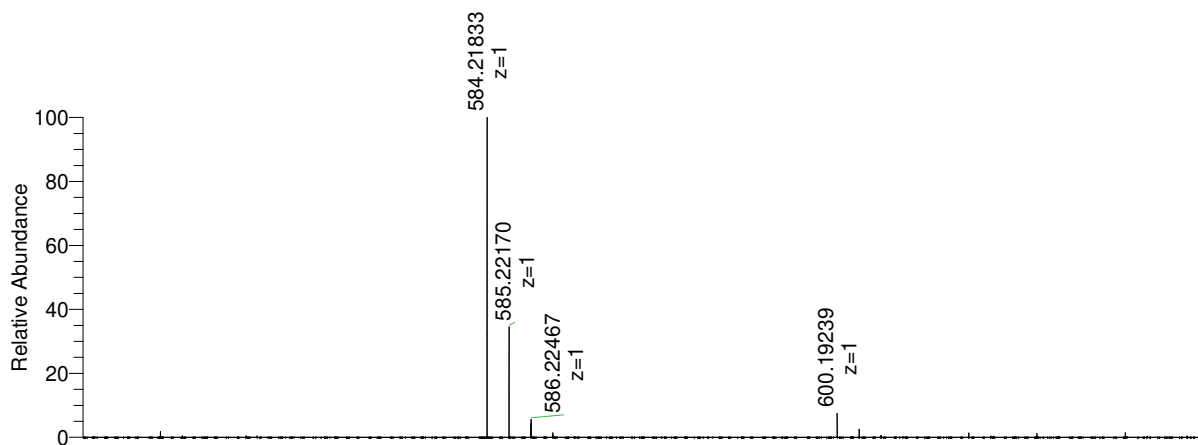
HPLC chromatogram:



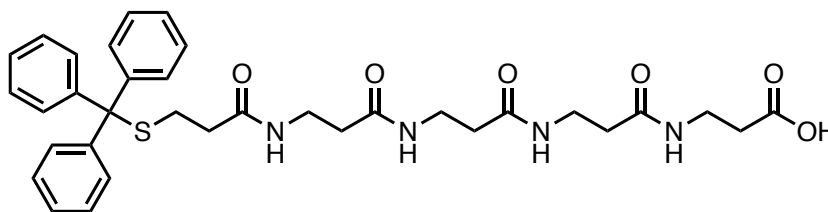
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*S*(Trt)mercaptopropionyl-(βAla)<sub>4</sub>-OH, **24**



The synthesis of **24** was carried out by manual solid-phase synthesis on a 2-CTC resin (0.4 g, 1.6 mmol/g) previously grafted with *N*-Fmoc-βAla-OH (1.3 mmol/g) and capped with a mixture of MeOH and DIEA (5:1 v/v). Amino acids were coupled according to this procedure: AA (2 eq) and HATU (2 eq) were dissolved in DMF (2 mL). DIPEA (4 eq) was added to the solution which was directly added to the resin. The suspension was stirred for 2 h at room temperature. Fmoc protecting groups were removed with 20 % v/v peptide grade piperidine (Iris Biotech) solution in peptide grade DMF (Carlo Erba). The cleavage of the resin was achieved using a solution of hexafluoroisopropanol (20 %) in DCM (3 × 2 mL, 3 × 20 min). The solvents were evaporated under reduced pressure. The resulting oil was solubilized in methanol (0.5 mL) and precipitated in diethyl ether (4 °C) to give the desired linker as a white powder (134 mg, 0.21 mmol) in 33 % yield.

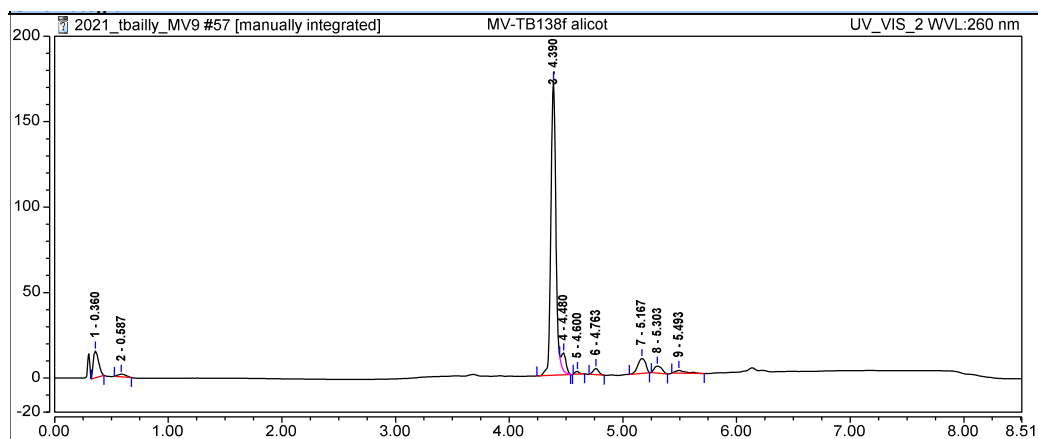
**HPLC:** *retention time* = 4.39 min, *purity* = 0.78,  $\lambda_{max}$  = 201, 216 nm

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.92 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.89 – 7.83 (m, 2H), 7.81 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.37 – 7.22 (m, 15H), 3.25 – 3.15 (m, 8H), 2.36 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.27 – 2.09 (m, 10H).

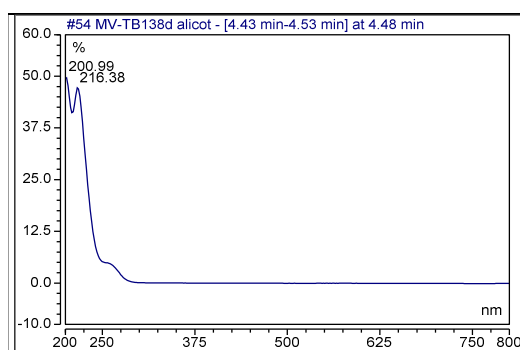
**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 633.3 (calcd. for C<sub>34</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S: 633.3)

**HRMS:** [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 655.25557 (calcd. for C<sub>34</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>SNa: 655.25608)

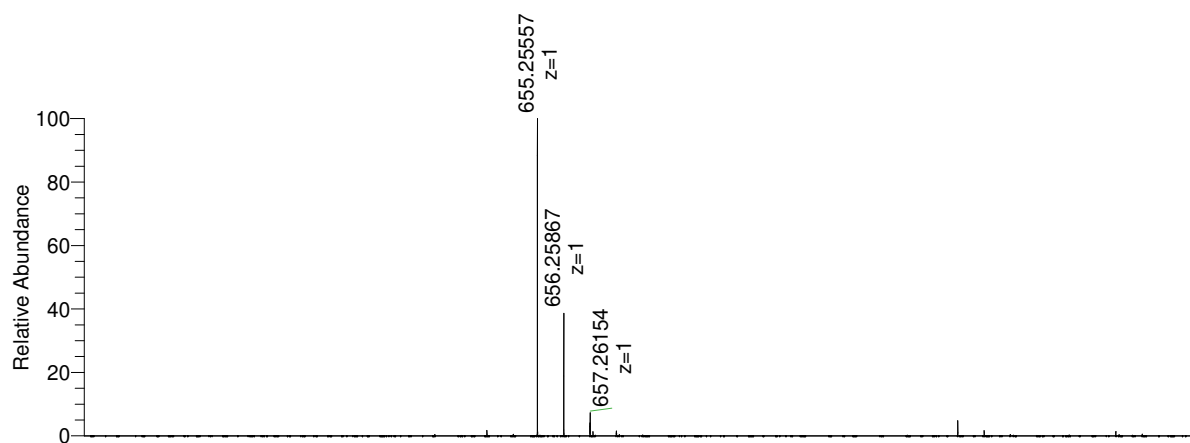
HPLC chromatogram:



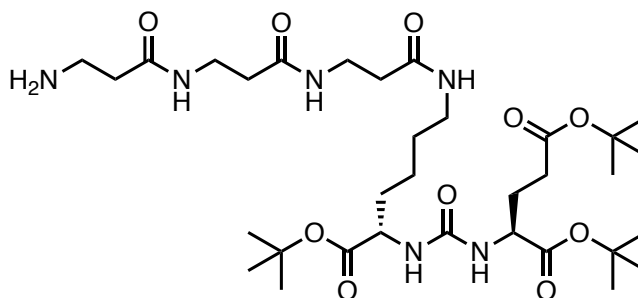
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*KuE(tBu)<sub>3</sub>-(βAla)<sub>3</sub>, 25*



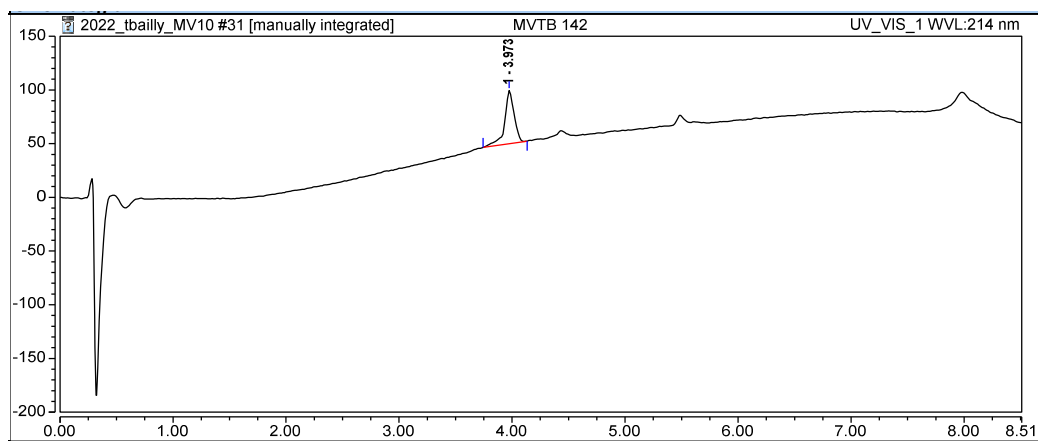
Triethylamine (43  $\mu$ L, 0.306 mmol) and  $KuE(tBu)_3$  (50 mg, 0.102 mmol) were added to a solution of **19** (51 mg, 0.112 mmol) and HATU (41 mg, 0.107 mmol) in DMF (5 mL). The reaction was stirred at rt for 2 h. DMF was removed under reduced pressure and the crude was purified by flash-chromatography to give the desired product as a white powder (83 mg, 0.09 mmol) in 88 % yield. The resulting white powder (36 mg, 0.039 mmol) was dissolved in a solution of piperidine (20 % v) in DMF. The mixture was left to stir for 1h. Solvents were then removed under reduced pressure. The resulting yellow solid was purified by RP-HPLC to give the desired unprotected product as a white powder (23 mg, 0.026 mmol) in 67 % yield.

**HPLC:** *retention time* = 3.98 min, *purity* = > 0.99,  $\lambda_{max}$  = 200 nm

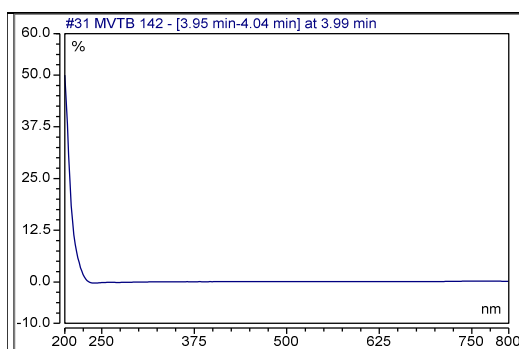
**LRMS:**  $[M+H]^+$   $m/z$  = 701.9 (calcd. for  $C_{33}H_{61}N_6O_{10}$ : 701.4)

**HRMS:**  $[M+H]^+$   $m/z$  = 701.44440 (calcd. for  $C_{33}H_{61}N_6O_{10}$ : 701.44437)

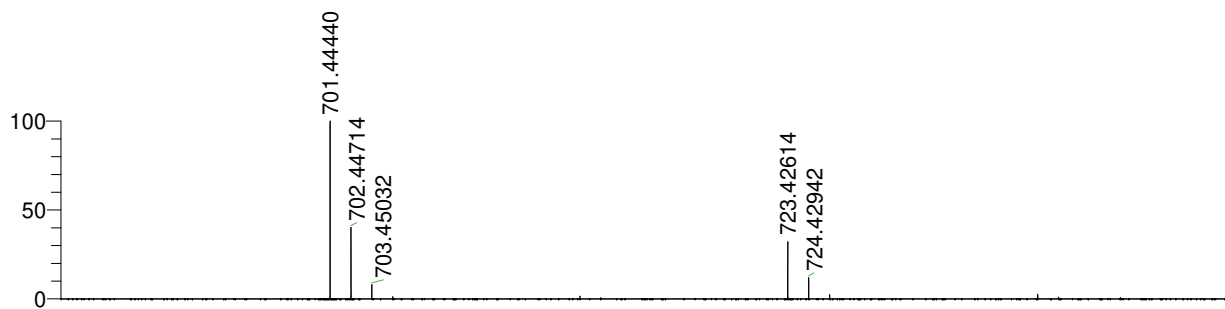
HPLC chromatogram:



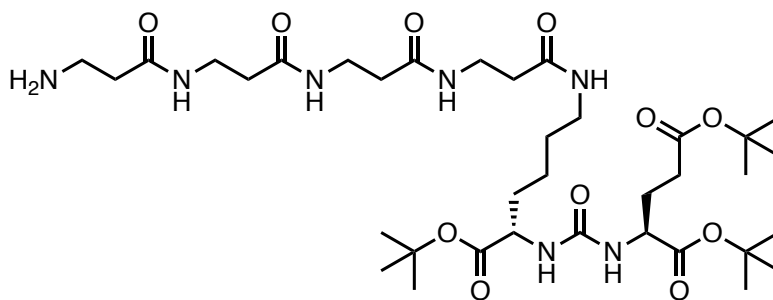
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*KuE(tBu)<sub>3</sub>-(βAla)<sub>4</sub>*, **26**



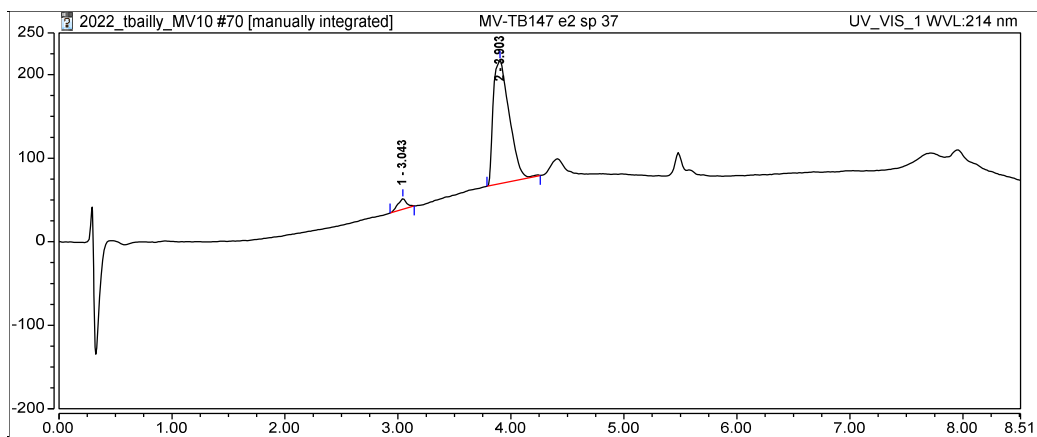
Triethylamine (21  $\mu$ L, 0.153 mmol) and  $KuE(tBu)_3$  (25 mg, 0.051 mmol) were added to a solution of **20** (29.4 mg, 0.056 mmol) and HATU (20.4 mg, 0.054 mmol) in DMF (5 mL). The reaction was stirred at rt for 2 h. DMF was removed under reduced pressure and the crude was purified by flash-chromatography to give the desired product as a white powder (39.4 mg, 0.04 mmol) in 77 % yield. The obtained white powder was then dissolved in piperidine (20 % v/v in DMF) and stirred at rt for 1 h. Solvents were evaporated under reduced pressure and the crude was purified by RP-HPLC to give a white amorphous solid (20.0 mg, 0.0225 mmol) in 40 % yield.

**HPLC:** *retention time* = 3.90 min, *purity* = 0.92,  $\lambda_{max}$  = 200 nm

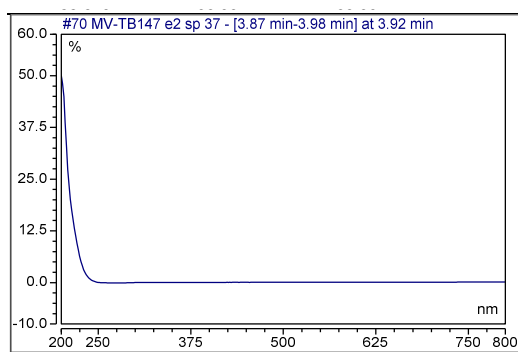
**LRMS:**  $[M+H]^+$   $m/z$  = 772.9 (calcd. for  $C_{36}H_{66}N_7O_{11}$ : 772.5)

**HRMS:**  $[M+H]^+$   $m/z$  = 772.48138 (calcd. for  $C_{36}H_{66}N_7O_{11}$ : 772.48148)

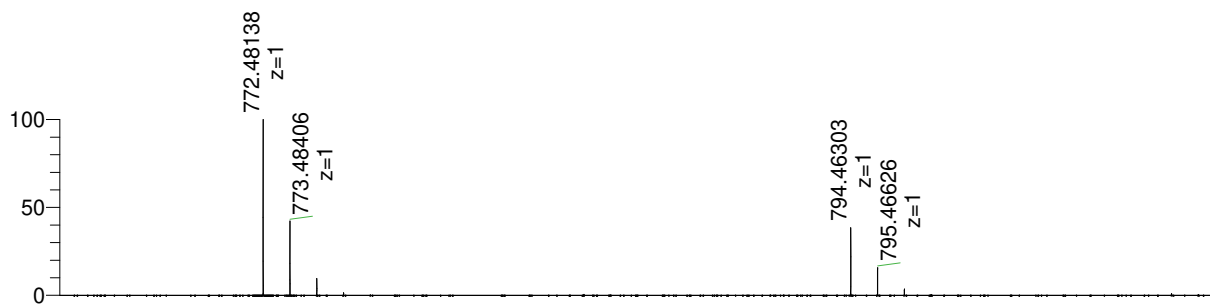
HPLC chromatogram:



UV-vis spectrum:

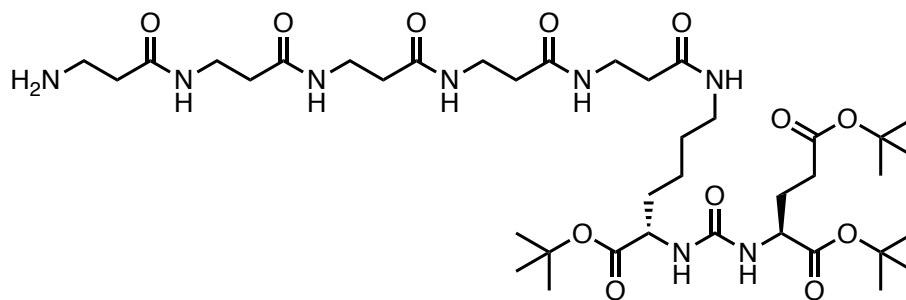


HRMS spectrum:





*KuE(tBu)<sub>3</sub>-(βAla)<sub>5</sub>, 27*



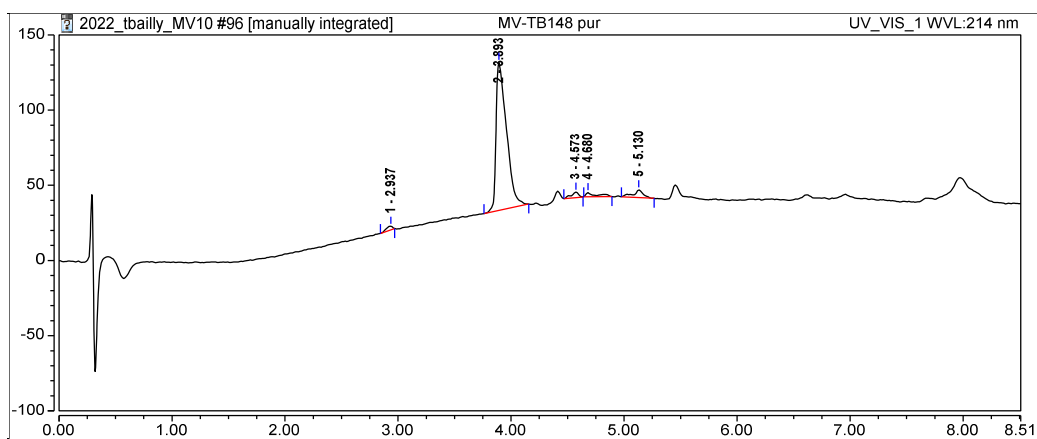
Triethylamine (16  $\mu$ L, 0.116 mmol) and  $KuE(tBu)_3$  (19 mg, 0.039 mmol) were added to a solution of **21** (25.4 mg, 0.043 mmol) and HATU (15.4 mg, 0.041 mmol) in DMF (5 mL). The reaction was stirred at rt for 2 h. DMF was removed under reduced pressure and the crude was purified by flash-chromatography to give the desired product as a white powder. The obtained white powder was then dissolved in piperidine (20 % in DMF) and stirred at rt for 1 h. Solvents were evaporated under reduced pressure and the crude was purified by RP-HPLC to give a white amorphous solid (17 mg, 20.1  $\mu$ mol) in 52 % yield.

**HPLC:** *retention time* = 3.89 min, *purity* = 0.88,  $\lambda_{max}$  = 200 nm

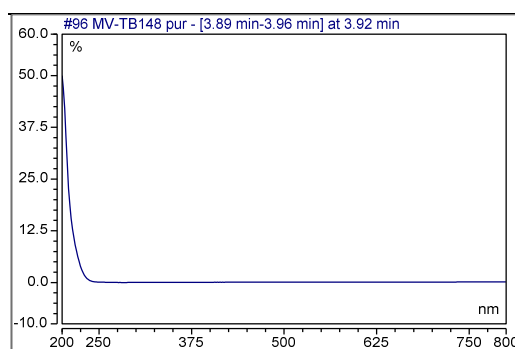
**LRMS:**  $[M+H]^+$   $m/z$  = 844.0 (calcd. for  $C_{39}H_{71}N_8O_{12}$ : 843.5)

**HRMS:**  $[M+H]^+$   $m/z$  = 843.51819 (calcd. for  $C_{36}H_{66}N_7O_{11}$ : 843.51860)

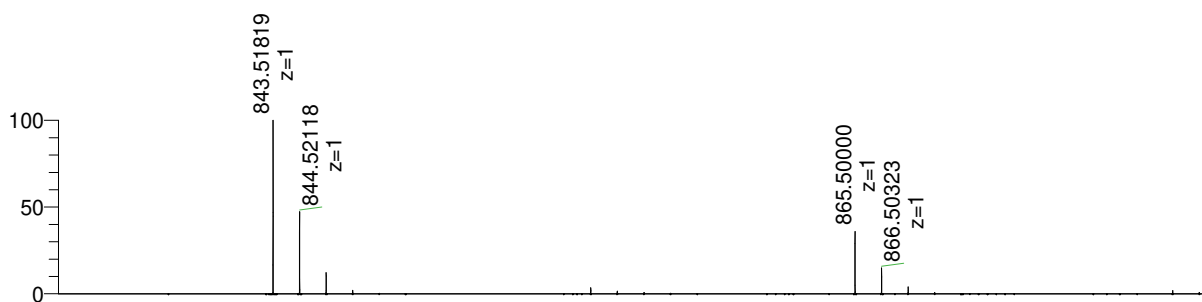
HPLC chromatogram:



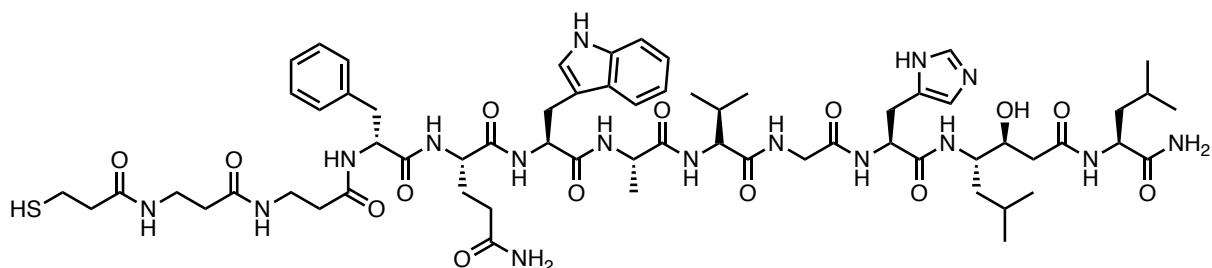
UV-vis absorption spectrum :



HRMS spectrum :



*JMV594-(βAla)<sub>2</sub>-mercaptopropionyl, 28*



The synthesis of **28** was carried out on a Fmoc-Rink Amide AM resin (71 mg, 0.48 mmol/g, 75-150 μm, Iris Biotech) with an automated peptide synthesizer Liberty Blue (CEM). Amino acids were activated with Oxyma Pure and DIC. Fmoc protected amino acids were deprotected with 20 % v/v peptide grade piperidine (Iris Biotech) solution in peptide grade DMF (Carlo Erba). The amino acid sequence of JMV594 (D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu) was extended with **22** as a linker (added manually through HATU/DIPEA activation).

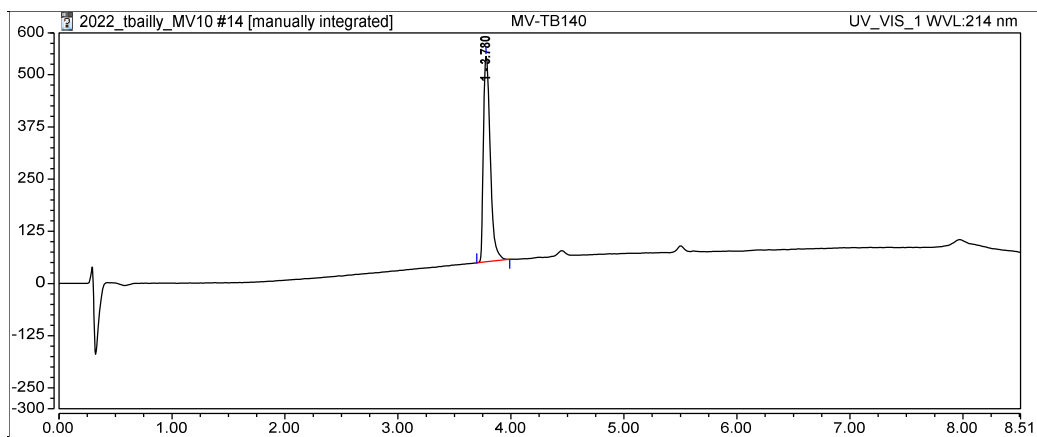
The resin was cleaved using a solution of triisopropylsilane (2 %) 2,2'-(ethylenedioxy)diethanethiol (2 %) and water (1 %) in TFA. After cleavage and deprotection of the side chains, the solution was concentrated and the peptide was precipitated with diethyl ether (4°C). The resulting whitish powder was purified by RP-HPLC giving a white solid as a trifluoroacetate salt in 14 % yield (6.9 mg, 4.7 μmol)

**HPLC:** retention time = 3.78 min, purity = > 0.99, λ<sub>max</sub> = 220, 280 nm

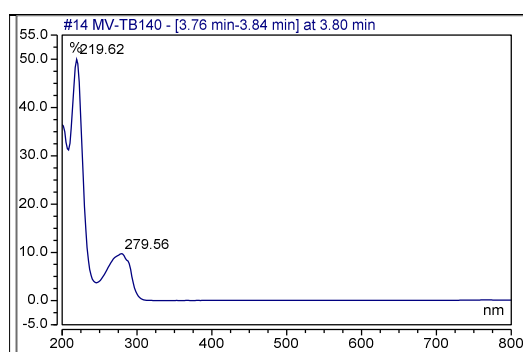
**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup> m/z = 1344.1 (calcd. for C<sub>64</sub>H<sub>95</sub>N<sub>16</sub>O<sub>14</sub>S: 1343.7)

**HRMS:** [M+H]<sup>+</sup> m/z = 1343.69263 (calcd. for C<sub>64</sub>H<sub>95</sub>N<sub>16</sub>O<sub>15</sub>S: 1343.69289)

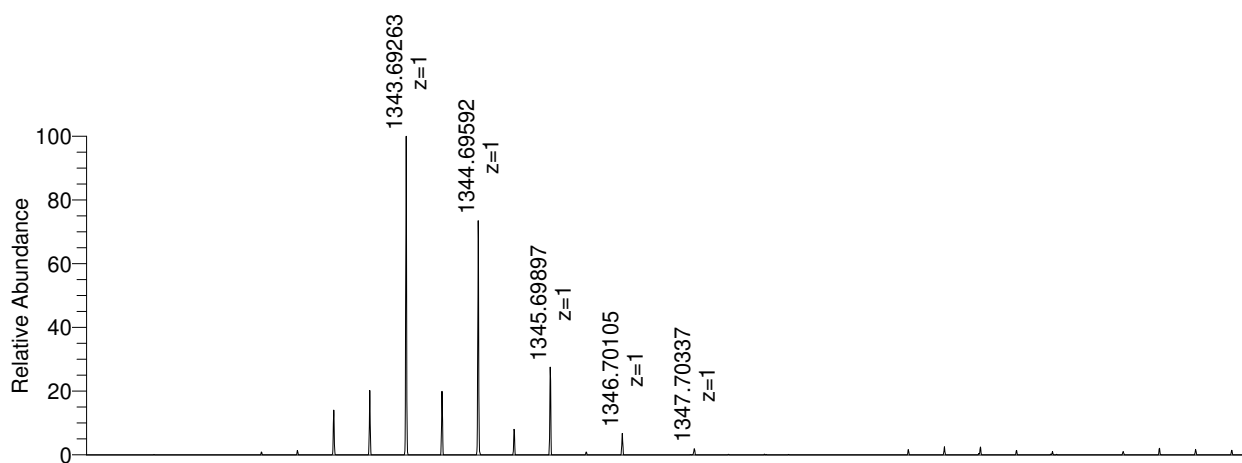
HPLC chromatogram:



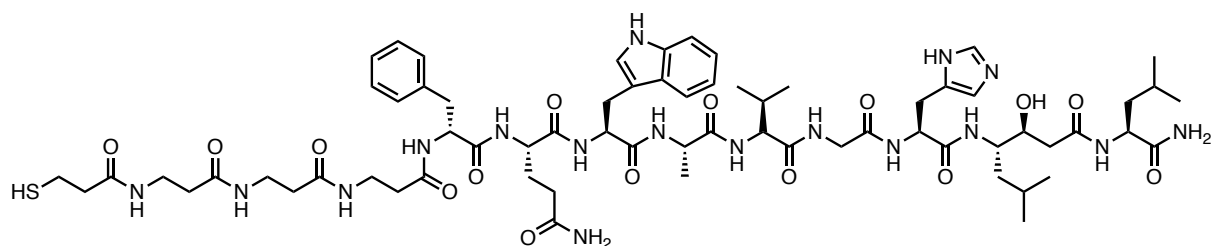
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*JMV594-(βAla)<sub>3</sub>-mercaptopropionyl, 29*



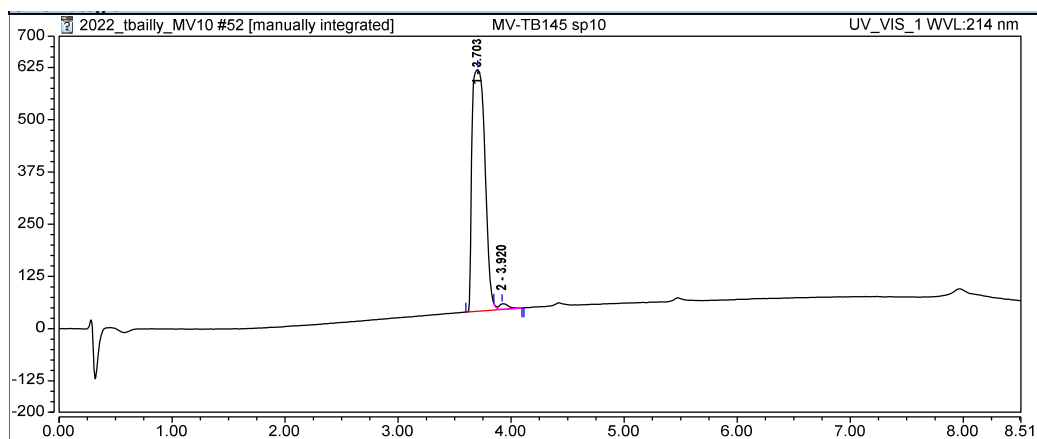
The synthesis of **29** was carried out on a Fmoc-Rink Amide AM resin (83 mg, 0.48 mmol/g, 75-150  $\mu\text{m}$ , Iris Biotech) with an automated peptide synthesizer Liberty Blue (CEM). Amino acids were activated with Oxyma Pure and DIC. Fmoc protected amino acids were deprotected with 20 % v/v peptide grade piperidine (Iris Biotech) solution in peptide grade DMF (Carlo Erba). The amino acid sequence of JMV594 (D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu) was extended with **23** as a linker (added manually through HATU/DIPEA activation). The resin was cleaved using a solution of triisopropylsilane (2 %) 2,2'-(ethylenedioxy)diethanethiol (2 %) and water (1 %) in TFA. After cleavage and deprotection of the side chains, the solution was concentrated and the peptide was precipitated with diethyl ether (4  $^{\circ}\text{C}$ ). The resulting whitish powder was purified by RP-HPLC giving a white solid as a trifluoroacetate salt in 12 % yield (7.3 mg, 4.9  $\mu\text{mol}$ )

**HPLC:** retention time = 3.70 min, purity = 0.98,  $\lambda_{\text{max}}$  = 222, 280 nm

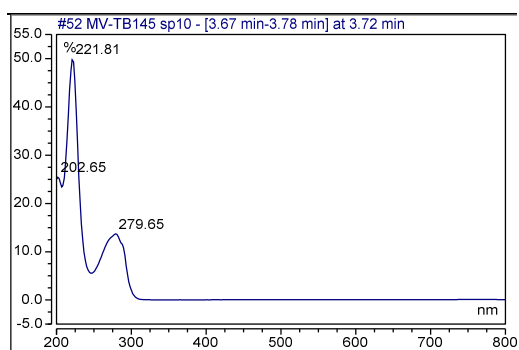
**LRMS:**  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  = 1415.7 (calcd. for  $\text{C}_{67}\text{H}_{100}\text{N}_{17}\text{O}_{15}\text{S}$ : 1414.7)

**HRMS:**  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  = 1414.73010 (calcd. for  $\text{C}_{67}\text{H}_{100}\text{N}_{17}\text{O}_{15}\text{S}$ : 1414.73000)

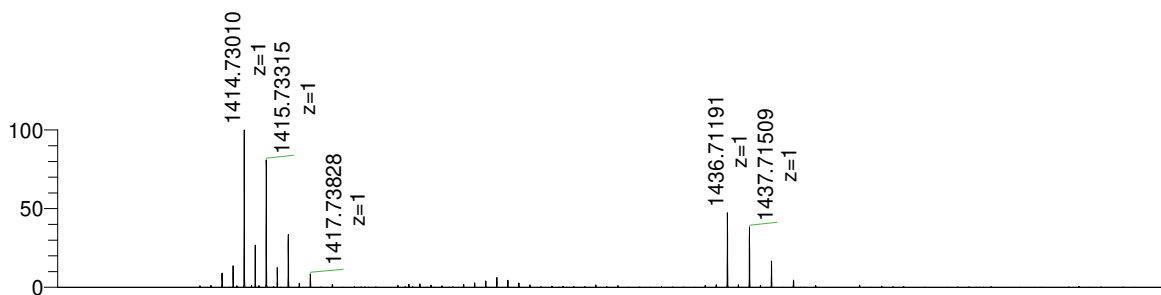
HPLC chromatogram:



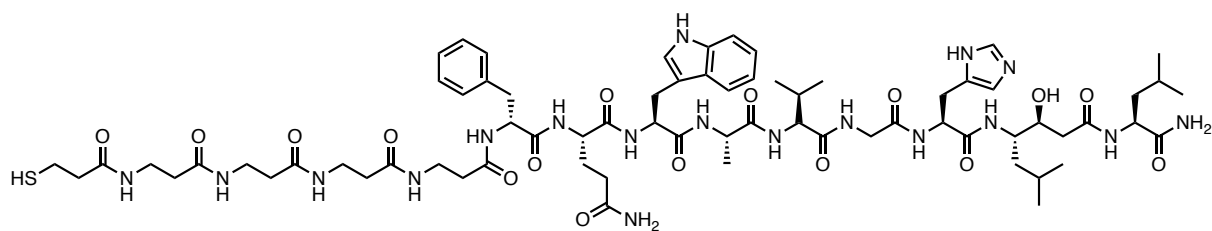
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*JMV594-(βAla)<sub>4</sub>-mercaptopropionyl, 30*



The synthesis of **30** was carried out on a Fmoc-Rink Amide AM resin (83 mg, 0.48 mmol/g, 75-150  $\mu\text{m}$ , Iris Biotech) with an automated peptide synthesizer Liberty Blue (CEM). Amino acids were activated with Oxyma Pure and DIC. Fmoc protected amino acids were deprotected with 20 % v/v peptide grade piperidine (Iris Biotech) solution in peptide grade DMF (Carlo Erba). The amino acid sequence of JMV594 (D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu) was extended with **24** as a linker (added manually through HATU/DIPEA activation).

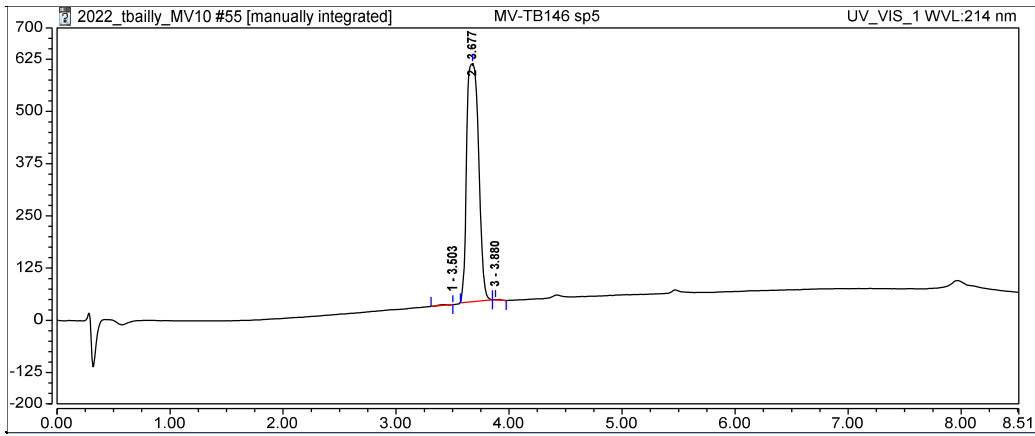
The resin was cleaved using a solution of triisopropylsilane (2 %) 2,2'-(ethylenedioxy)diethanethiol (2 %) and water (1 %) in TFA. After cleavage and deprotection of the side chains, the solution was concentrated and the peptide was precipitated with diethyl ether (4 °C). The resulting whitish powder was purified by RP-HPLC giving a white solid as a trifluoroacetate salt in 12 % yield (7.3 mg, 4.9  $\mu\text{mol}$ ).

**HPLC:** *retention time* = 3.68 min, *purity* = > 0.99,  $\lambda_{\text{max}}$  = 221, 280 nm

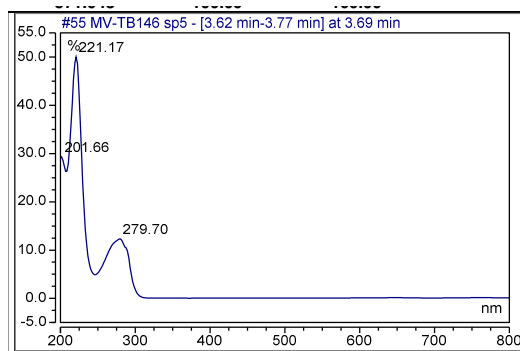
**LRMS:**  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  = 1486.7 (calcd. for  $\text{C}_{70}\text{H}_{105}\text{N}_{18}\text{O}_{16}\text{S}$ : 1485.8)

**HRMS:**  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  = 1485.76721 (calcd. for  $\text{C}_{67}\text{H}_{100}\text{N}_{17}\text{O}_{15}\text{S}$ : 1485.76712)

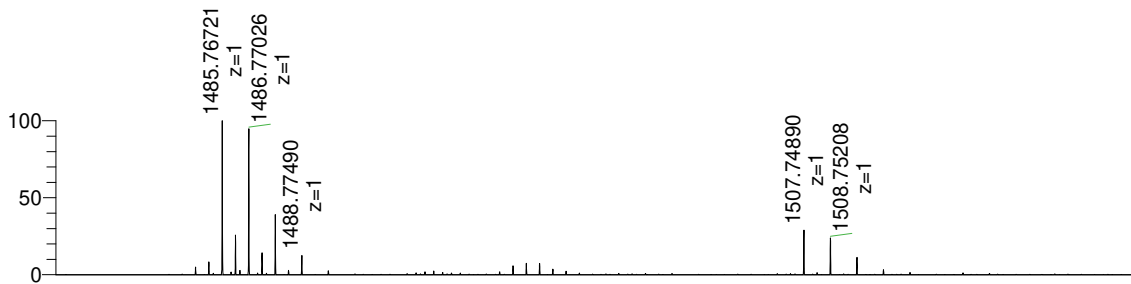
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:

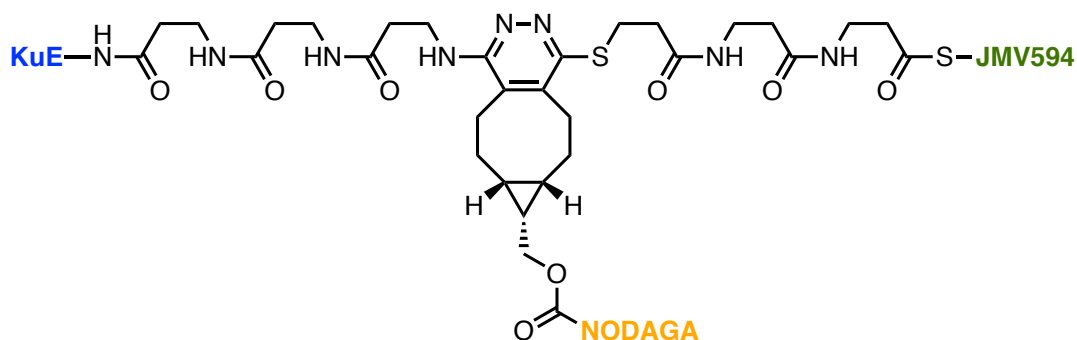


HRMS spectrum:





**NODAGA-HBL2, 31**



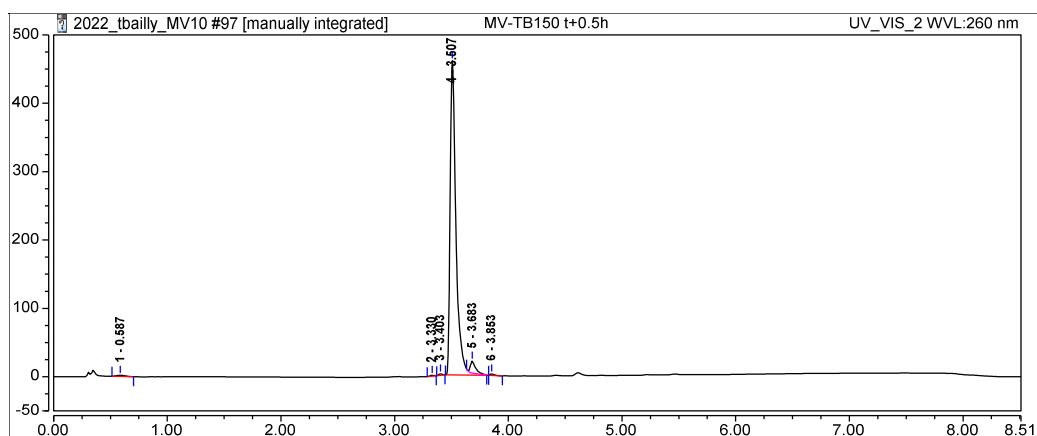
DIEA (2.35  $\mu\text{L}$ , 13.5  $\mu\text{mol}$ ) was added to a solution of dichlorotetrazine (0.34 mg, 2.3  $\mu\text{mol}$ ) and **25** (2.1 mg, 2.4  $\mu\text{mol}$ ). The color of the crude went from light orange to dark orange upon addition of the base indicating the reaction is complete instantaneously (monitored by HPLC-MS). **28** (3.6 mg, 2.4  $\mu\text{mol}$ ) was then added to the crude that was left to stir at 80  $^{\circ}\text{C}$  for 3 h. NODAGA-BCN (2.68 mg, 4.5  $\mu\text{mol}$ ) was added to the reaction mixture and left to stir overnight at 37  $^{\circ}\text{C}$ . After completion of the reaction (HPLC-MS) the crude was directly purified by reversed-phase semi-preparative RP-HPLC. The resulting white powder was then dissolved in a solution of triisopropylsilane (2 %) 2,2'-(ethylenedioxy)diethanethiol (2 %) and water (1 %) in TFA that was stirred for 30 min at rt. The solution was concentrated and the peptide was precipitated with diethyl ether (4  $^{\circ}\text{C}$ ). The resulting whitish powder was purified by RP-HPLC giving a white solid as a trifluoroacetate salt in 21 % yield (1.56 mg, 0.51  $\mu\text{mol}$ ).

**HPLC:** retention time = 3.51 min, purity = 0.95,  $\lambda_{\text{max}}$  = 220, 260 nm

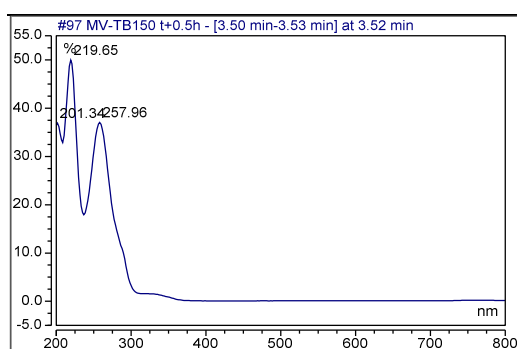
**LRMS:**  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$   $m/z$  = 1261.4 (calcd. for  $\text{C}_{115}\text{H}_{173}\text{N}_{29}\text{O}_{33}\text{S}$ : 1260.1)

**HRMS:**  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$   $m/z$  = 1260.12329 (calcd. for  $\text{C}_{115}\text{H}_{173}\text{N}_{29}\text{O}_{33}\text{S}$ : 1260.12302)

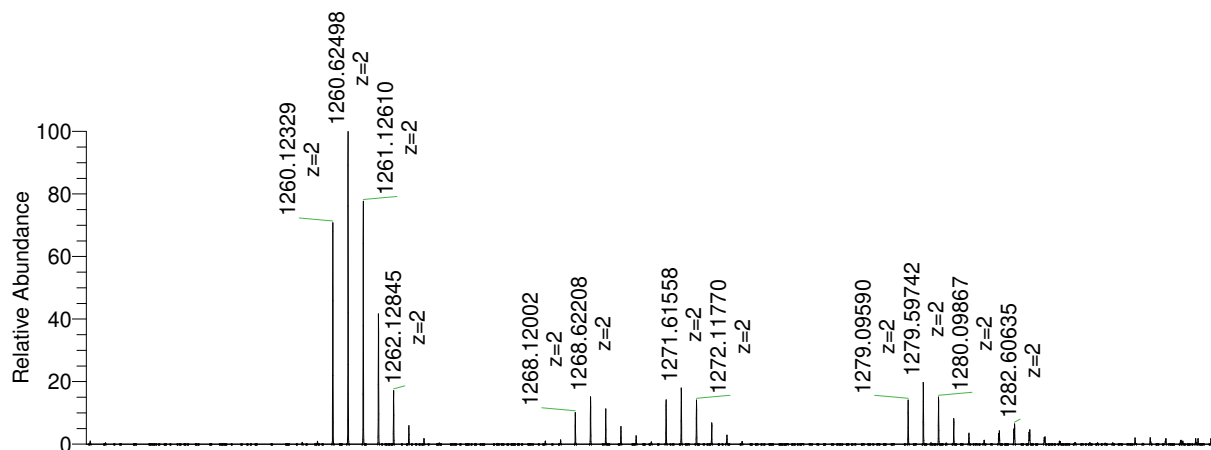
HPLC chromatogram:



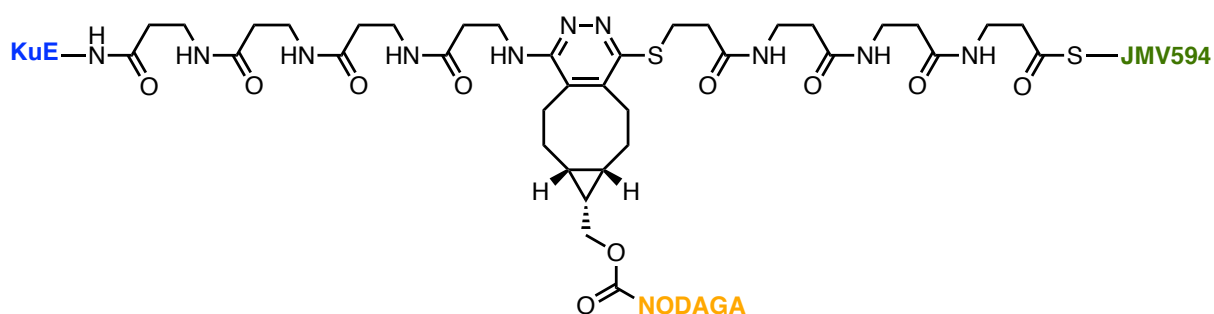
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



**NODAGA-HBL2, 32**



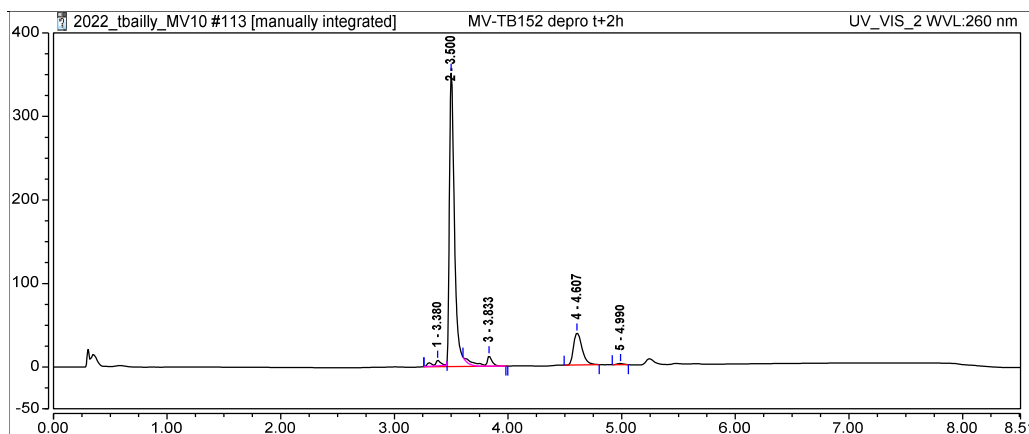
DIEA (3.12  $\mu\text{L}$ , 17.9  $\mu\text{mol}$ ) was added to a solution of dichlorotetrazine (0.45 mg, 3.0  $\mu\text{mol}$ ) and **26** (3.0 mg, 3.5  $\mu\text{mol}$ ). The color of the crude went from light orange to dark orange upon addition of the base indicating the reaction is complete instantaneously (monitored by HPLC-MS). **29** (5.0 mg, 3.4  $\mu\text{mol}$ ) was then added to the crude that was left to stir at 80  $^{\circ}\text{C}$  for 3 h. NODAGA-BCN (3.55 mg, 5.9  $\mu\text{mol}$ ) was added to the reaction mixture and left to stir overnight at 37  $^{\circ}\text{C}$ . After completion of the reaction (HPLC-MS) the crude was directly purified by reversed-phase semi-preparative RP-HPLC. The resulting white powder was then dissolved in a solution of triisopropylsilane (2 %) 2,2'-(ethylenedioxy)diethanethiol (2 %) and water (1 %) in TFA that was stirred for 30 min at rt. The solution was concentrated and the peptide was precipitated with diethyl ether (4  $^{\circ}\text{C}$ ). The resulting whitish powder was purified by RP-HPLC giving a white solid as a trifluoroacetate salt in 28 % yield (2.8 mg, 0.95  $\mu\text{mol}$ ).

**HPLC:** *retention time* = 3.50 min, *purity* = 0.80,  $\lambda_{\text{max}}$  = 220, 258 nm

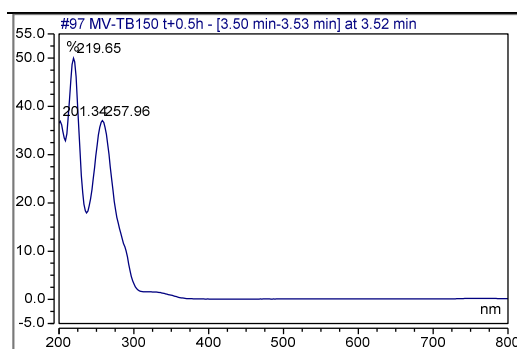
**LRMS:**  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$   $m/z$  = 1332.7 (calcd. for  $\text{C}_{121}\text{H}_{183}\text{N}_{31}\text{O}_{35}\text{S}$ : 1331.2)

**HRMS:**  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$   $m/z$  = 1331.16060 (calcd. for  $\text{C}_{121}\text{H}_{183}\text{N}_{31}\text{O}_{35}\text{S}$ : 1331.16013)

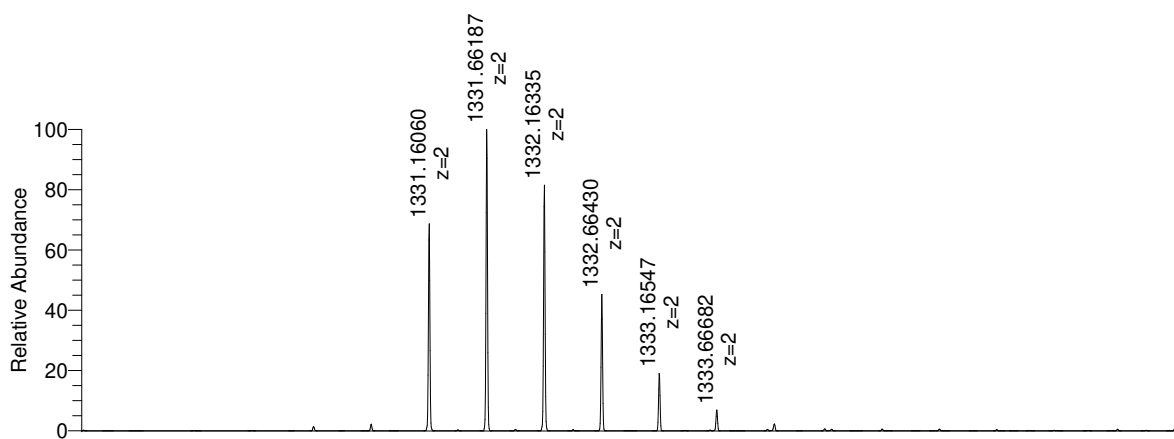
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:

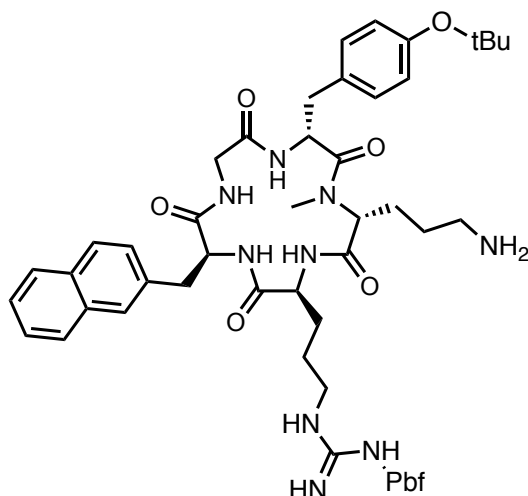


HRMS spectrum:



## 2. Chapter II – compounds 34 to 56

### [N-Me-D-Arg<sup>2</sup>]FC131, **34**



**34** was synthesized according to *Demmer et al.* on a 2-chlorotrityl chloride resin (1.0 g, 95-200  $\mu\text{m}$ , 1.60 mmol/g). The loading was performed by the addition of Fmoc-Gly-OH (178 mg, 0.60 mmol) and DIPEA (261  $\mu\text{L}$ , 1.5 mmol) in anhydrous DCM (2 mL) to the resin for 1h30 at room temperature. The remaining reactive sites were capped using a mixture of methanol and DIPEA (5:1 v/v) for 15 minutes. The final loading was 0.277 mmol/g (determined by measuring the absorbance at 301 nm of the deprotection solution). All amino acids were coupled according to this procedure: amino acid (2 eq) and HATU (2 eq) were dissolved in DMF (approx. 2 mL). DIPEA (4 eq) was added to the solution which was directly added to the resin. The suspension was stirred for 2 h at room temperature. Completion of the reaction was checked by a TNBS colorimetric test.

The methylation of the D-Orn residue was adapted from *Chatterjee et al.* The resin was first treated with NsCl (307 mg, 1.39 mmol) and 2,6-lutidine (273  $\mu\text{L}$ , 2.77 mmol) in DMF (2 mL) for 15 min. After rinsing with DMF, the resin was treated again with this solution for 10 min. After the nosylation, the obtained sulfonamide was methylated through a Mitsunobu reaction. The resin was treated with a solution of triphenylphosphine (363 mg, 1.38 mmol), methanol (112  $\mu\text{L}$ , 2.77 mmol) in dry THF (2 mL) for 2 minutes. A solution of DIAD (273  $\mu\text{L}$ , 2.77 mmol) in dry THF (1 mL) was then added portion-wise to the resin.

The Nosyl cleavage was performed by adding a solution of thiophenol (10 eq) and DBU (5 eq) in DMF (2 mL) to the resin. The procedure was repeated twice for 5 min.

The final Fmoc-deprotection was carried out with piperidine (20%) in DMF (3  $\times$  2 mL, 3  $\times$  5 min). An elongation yield of 71% (0.196 mmol) was obtained according to the absorbance at 301 nm of the final Fmoc-deprotection solution.

The cleavage of the peptide from the resin was achieved using a solution of hexafluoroisopropanol (20%) in DCM (3  $\times$  2 mL, 3  $\times$  20 min). The solvents were evaporated under reduced pressure to obtain the peptide as a brownish solid.

The cyclisation was also performed according to the protocol of *Chatterjee et al. (2012)*. NaHCO<sub>3</sub> (247 mg, 2.94 mmol) and DPPA (207 μL, 0.59 mmol) were added to a solution of the previously described peptide (0.196 mmol, 0.1 mM) in DMF (196 mL). The reaction mixture was left to stir overnight at room temperature. The crude was concentrated under vacuum and the product was precipitated upon addition of brine (4°C).

The resulting powder was treated by a solution of hydroxylamine (4 M) and imidazole (2.5 M) in DMF (1 mL) for 3 h in order to remove the Dde protecting group. The crude was concentrated under vacuum and purified by RP-HPLC yielding **9** as a white solid (46 mg, 0.035 mmol) in 13% yield.

#### Alternative synthesis:

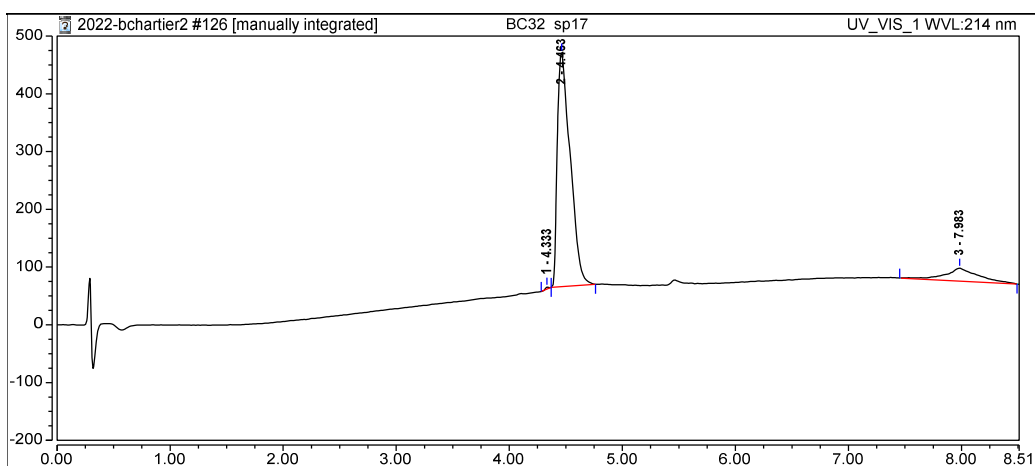
The alternative protocol to synthesize the cyclic peptide **34** is performed in the same manner as the previously described version except that in place of the on-resin methylation step, the *N*-methylated orthogonally ornithine **42** is directly incorporated by SPPS (1.1 eq, HATU, rt, 2 h). This approach allowed us to obtain **34** in 35 % yield.

**HPLC:** retention time = 4.46 min, purity = 0.94,  $\lambda_{max}$  = 222, 298 nm

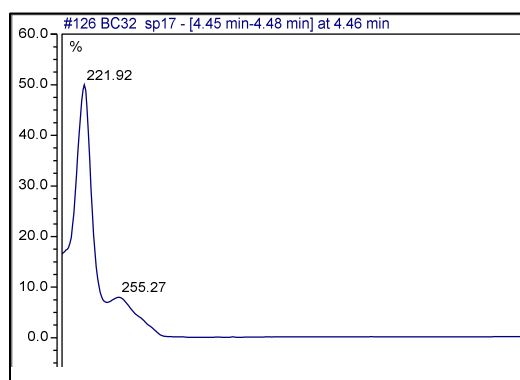
**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 1010.8 (calcd. for C<sub>53</sub>H<sub>72</sub>N<sub>9</sub>O<sub>9</sub>S: 1010.5)

**HRMS:** [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 1010.51768 (calcd. for C<sub>53</sub>H<sub>72</sub>N<sub>9</sub>O<sub>9</sub>S : 1010.51682)

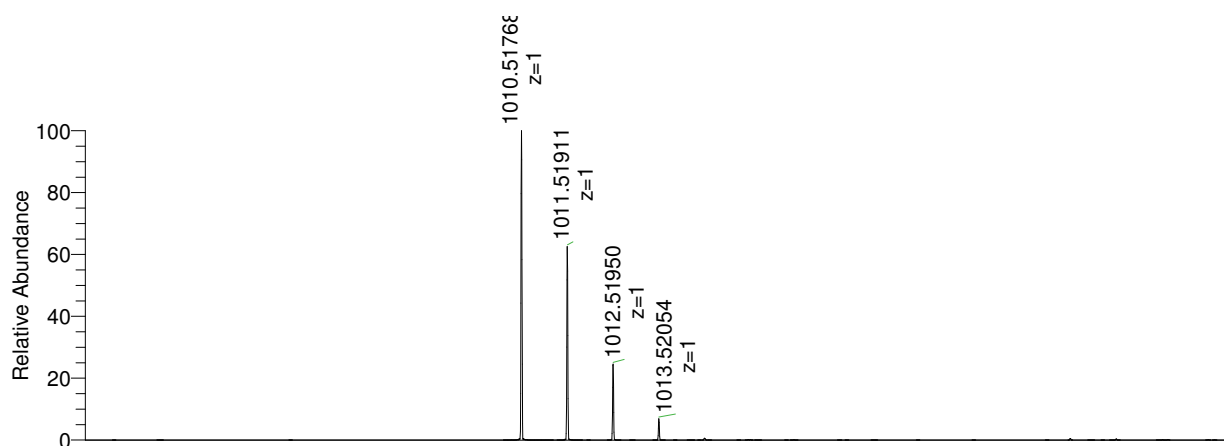
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:



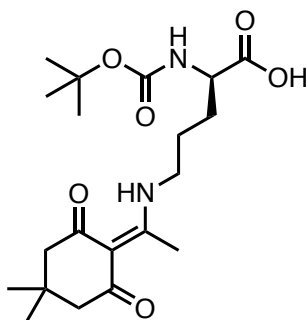
HRMS spectrum:







*NH(Boc)-D-Orn(Dde)-OH, 35*



Dde-OH (307 mg, 1.67 mmol) was added to a solution of Boc-D-Orn-OH (299 mg, 1.29 mmol) in ethanol (12 mL). The reaction mixture was stirred at 95 °C until completion of the reaction (21 h, monitored by LC-MS). Ethanol was evaporated under reduced pressure and the resulting yellow oil was purified by normal-phase flash chromatography to give **35** as a white amorphous solid (502 mg, 1,26 mmol) in 98 % yield.

**HPLC:** *retention time* = 4.00 min, *purity* = 0.92,  $\lambda_{max}$  = 258, 298 nm

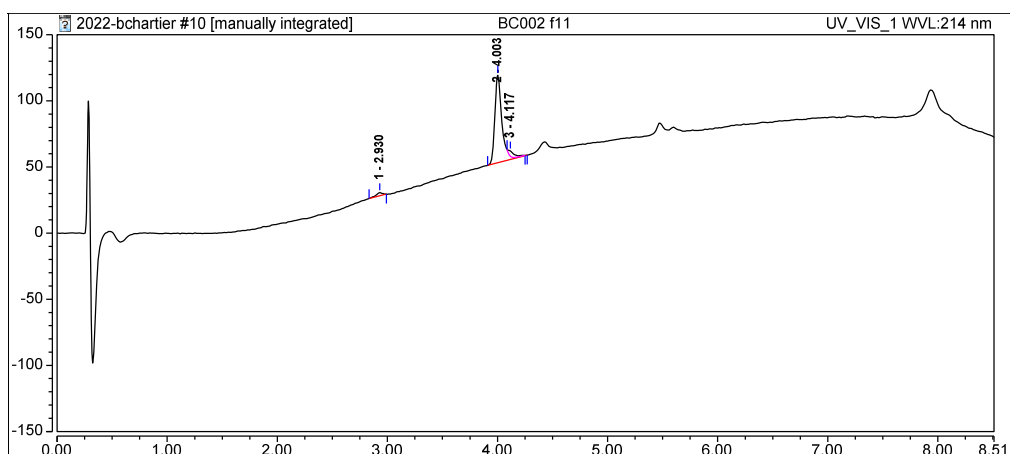
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K)  $\delta$  = 13.31 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 5.43 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.36 (q, J = 6.4 Hz, 1H), 3.53 – 3.28 (m, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.36 (s, 4H), 2.06 – 1.68 (m, 4H), 1.43 (s, 9H), 1.01 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C RMN** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K)  $\delta$  = 198.2, 155.9, 80.1, 52.8, 52.5, 43.3, 30.2, 28.4, 28.3, 25.1, 18.3

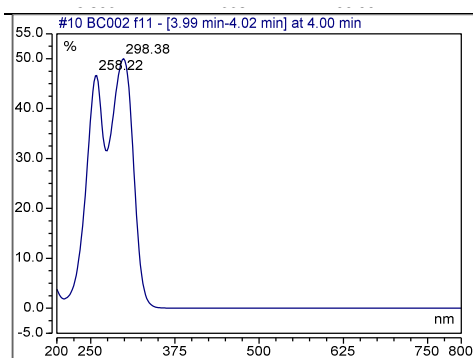
**LRMS:** [M + H]<sup>+</sup> *m/z* = 397.4 (calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> 397.2)

**HRMS:** [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 397.23319 (calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> 397.23337)

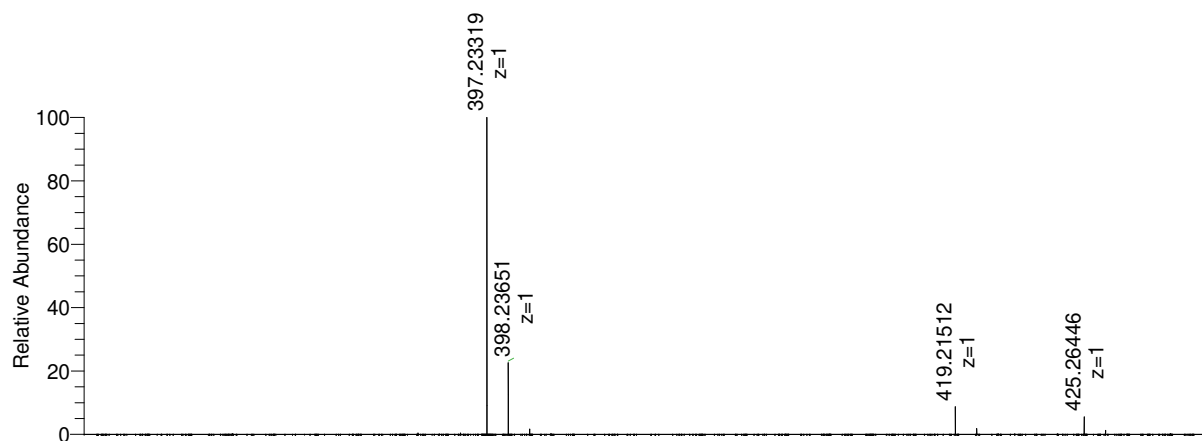
HPLC chromatogram:



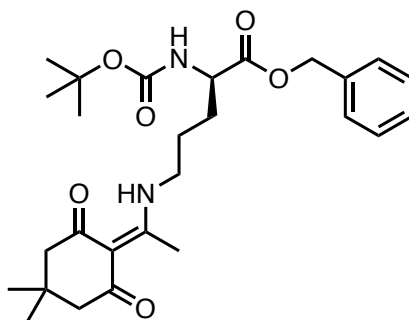
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*NH(Boc)-D-Orn(Dde)-OBn*, **36**



NEt<sub>3</sub> (0.30 mL, 2.21 mmol) and BnBr (0.40 mL, 3.32 mmol) was added to a solution of **35** (219 mg, 0.55 mmol) in DCM (10 mL). The reaction mixture was stirred at rt until completion of the reaction (22 h, monitored by TLC and LC-MS). DCM was evaporated under reduced pressure and the resulting yellow oil was purified by normal phase flash chromatography to give **36** as a yellow oil (261 mg, 0.54 mmol) in 97 % yield.

**HPLC:** retention time = 4.99 min, purity = 0.95,  $\lambda_{max}$  = 257, 299 nm

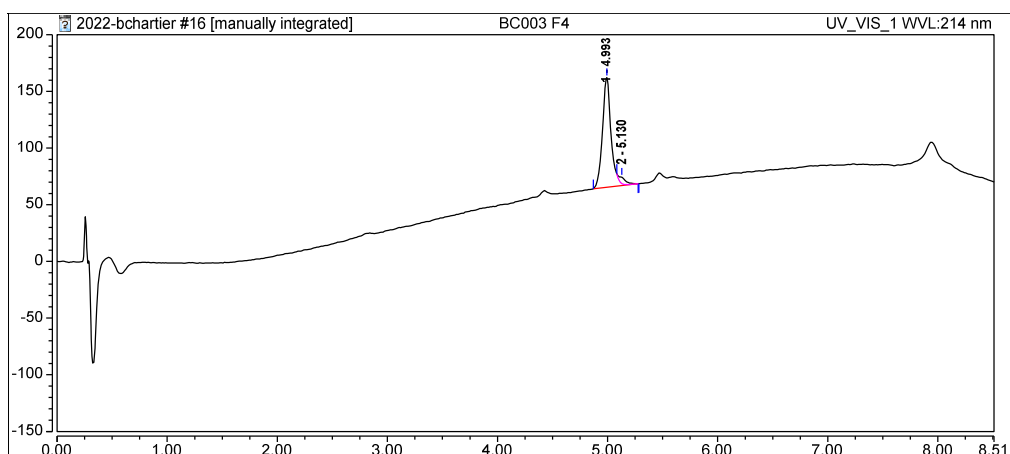
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K)  $\delta$  = 13.45 (s, 1H), 7.40 – 7.29 (m, 5H), 5.24 – 5.07 (m, 3H), 4.37 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 3.41 – 3.29 (m, 2H), 2.50 (s, 3H), 2.35 (s, 4H), 1.91 (t, J = 4.7 Hz, 2H), 1.73 (m, 2H), 1.42 (s, 9H), 1.02 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C RMN** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K) :  $\delta$  = 198.1, 173.7, 172.2, 155.5, 135.3, 128.8, 128.7, 128.5, 108.0, 80.3, 67.4, 53.6, 52.9, 42.9, 42.0, 30.2, 30.2, 28.5, 28.4, 28.4, 25.2, 21.2, 17.98, 1.13.

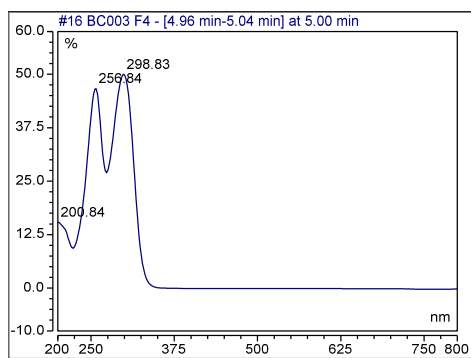
**LRMS:** [M + H]<sup>+</sup>  $m/z$  = 487.6 (calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>39</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: 487.3)

**HRMS:** [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  = 487.28013 (calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>39</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: 487.28026)

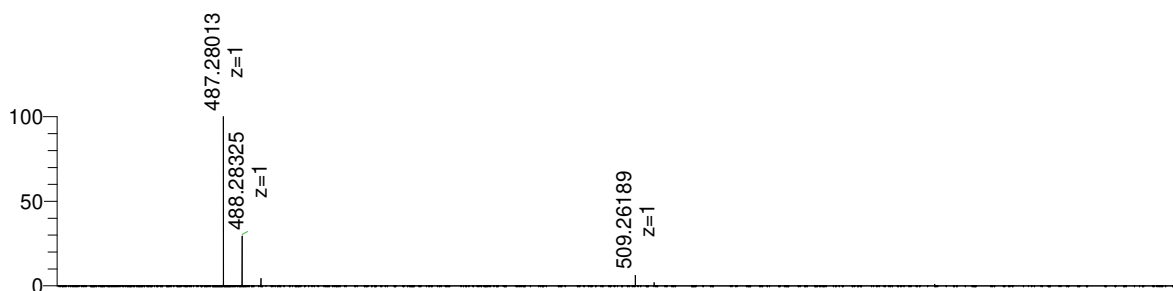
HPLC chromatogram:



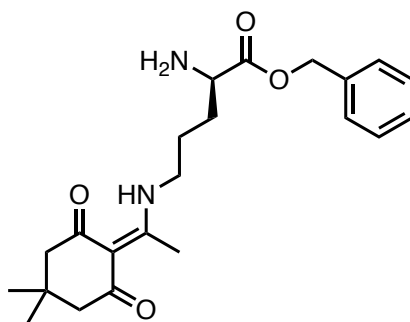
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*D*-Orn(*Dde*)-OBn, **37**



TFA (2 mL) was added to a solution of **36** (261 mg, 0.54 mmol) in DCM (2 mL). The reaction was stirred at rt until completion of the reaction (1 h, monitored by LC-MS). DCM and TFA were evaporated under reduced pressure. The resulting oil was poured in 15 mL DCM and the solution was washed with NaHCO<sub>3</sub> sat (3 × 5 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> filtered the solution through a filter paper. The DCM was evaporated under reduced pressure. The resulting yellow oil **37** (174 mg, 0.45 mmol) was obtained in 83 % yield and used without further purification.

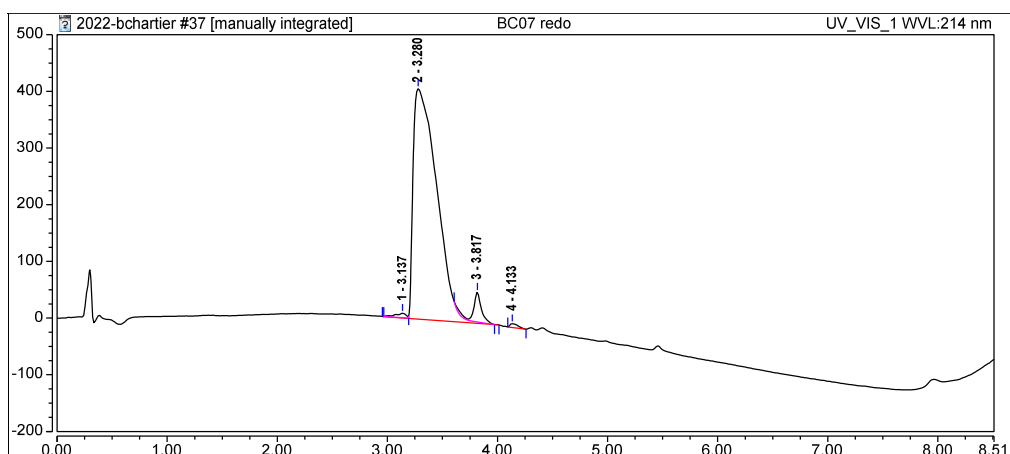
**HPLC:** *retention time* = 3.28 min, *purity* = 0.94,  $\lambda_{max}$  = 259, 300 nm

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K)  $\delta$  = 13.45 (s, 1H), 7.42 – 7.28 (m, 5H), 5.22 – 5.11 (m, 2H), 3.52 (m, 1H), 3.38 (m, 2H), 2.51 (s, 3H), 2.35 (s, 4H), 2.16 (s, 2H), 1.91 – 1.61 (m, 5H), 1.26 (m, 1H), 1.02 (s, 6H).

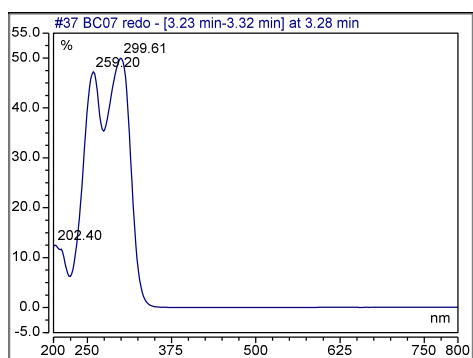
**LRMS:** [M + H]<sup>+</sup> *m/z* = 387.4 (calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: 387.2)

**HRMS:** [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 387.22779 (calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: 387.22783)

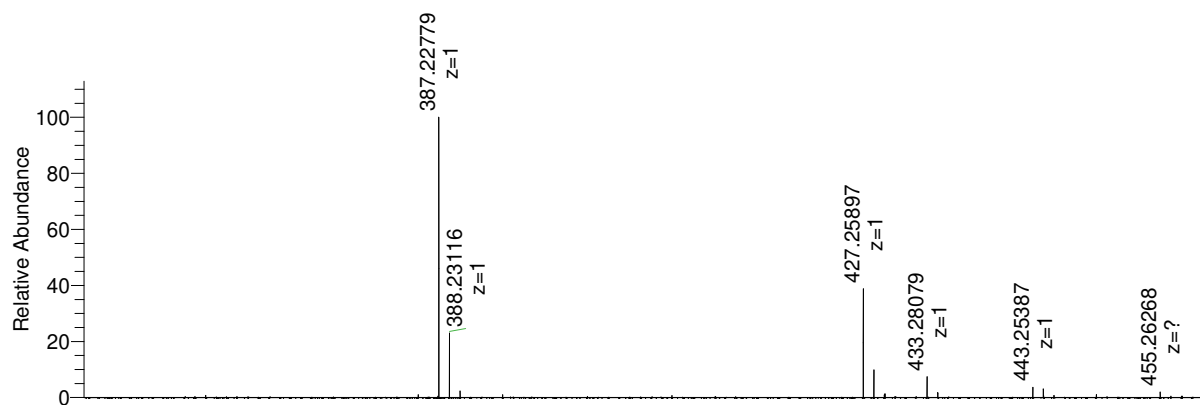
HPLC chromatogram:



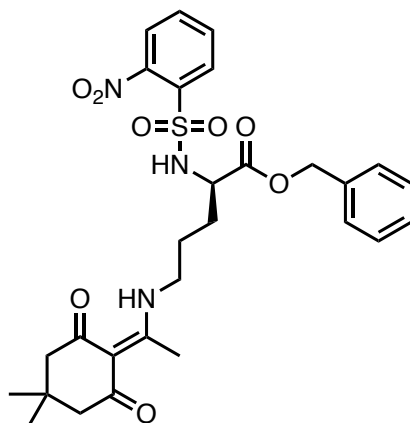
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*NH(Ns)-D-Orn(Dde)-OBn, 38*



DIPEA (0.15 mL, 0.85 mmol) were added to a solution of **37** (164 mg, 0.42 mmol) and NsCl (95 mg, 0.42 mmol) in DMF (15 mL). The reaction mixture was stirred at rt until completion of the reaction (1.5 h, monitored by LC-MS). DMF was evaporated under reduced pressure and the resulting yellow oil was purified by normal phase flash chromatography to give **38** as a yellow oil (231 mg, 0.40 mmol) in 95 % yield.

**HPLC:** retention time = 4.95 min, purity = > 0.99,  $\lambda_{max}$  = 256, 299 nm

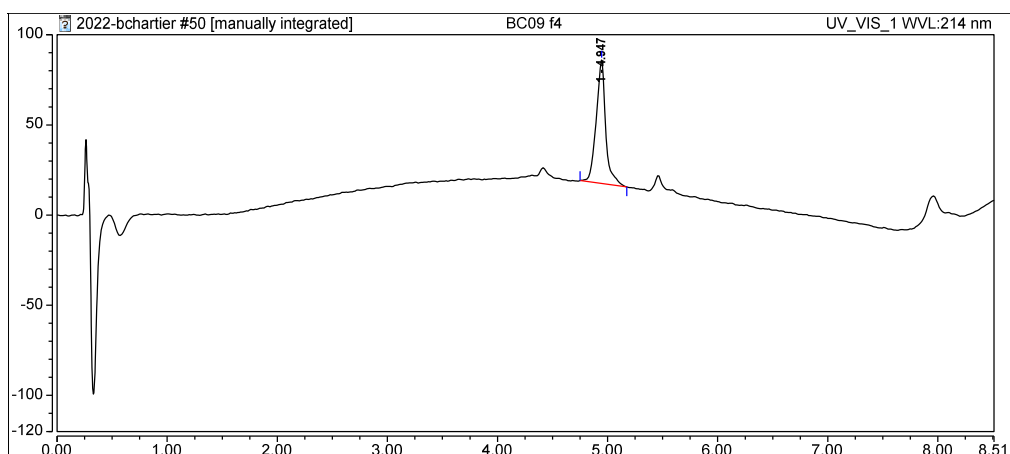
**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K):  $\delta$  = 13.51 (s, 1H), 8.02 – 7.97 (m, 1H), 7.80 (dd, J = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 7.67 – 7.56 (m, 2H), 7.37 – 7.27 (m, 3H), 7.16 – 7.13 (m, 1H), 4.91 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 4.24 – 4.16 (m, 1H), 3.47 – 3.35 (m, 2H), 2.95 (s, 1H), 2.88 (s, 1H), 2.53 (s, 2H), 2.37 (s, 4H), 2.01 (dd, J = 13.0, 6.5, 4.5 Hz, 1H), 1.83 (qq, J = 10.1, 6.1 Hz, 2H), 1.25 (t, J = 2.5 Hz, 1H), 1.03 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K) :  $\delta$  = 198.1, 173.9, 170.4, 162.7, 147.7, 134.6, 133.9, 133.8, 133.0, 130.4, 128.9, 128.8, 128.7, 128.6, 125.8, 108.1, 67.8, 56.4, 53.6, 52.9, 42.6, 36.6, 31.6, 30.6, 30.2, 28.4, 25.0, 18.0.

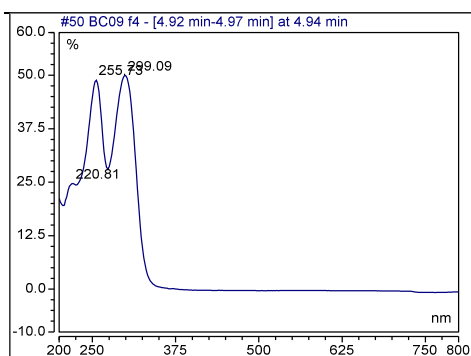
**LRMS:** [M + H]<sup>+</sup>  $m/z$  = 572.6 (calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S: 572.2)

**HRMS:** [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  = 572.20603 (calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S: 572.20611)

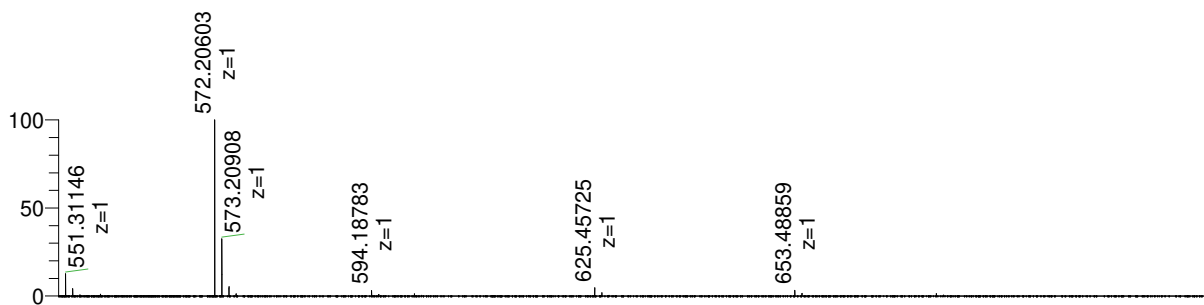
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:

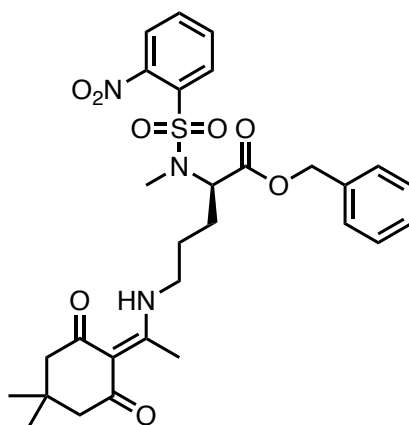


HRMS spectrum:





*N*(Me)(Ns)-*D*-Orn(Dde)-OBn, **39**



DIAD (0.299 mL, 1.52 mmol) and anhydrous MeOH (0.061 mL, 1.52 mmol) were added to a solution of **38** (669 mg, 1.17 mmol) and PPh<sub>3</sub> (399 mg, 1.52 mmol) in anhydrous THF (40 mL). The reaction was stirred at rt until completion of the reaction (1 h monitored by LC-MS). The THF was evaporated under reduced pressure and the resulting yellow oil was purified by normal phase chromatography to give **39** as a white solid (488 mg, 0.83 mmol) in a 71 % yield.

**HPLC:** retention time = 5.133 min, purity = 0.87,  $\lambda_{max}$  = 255, 298 nm

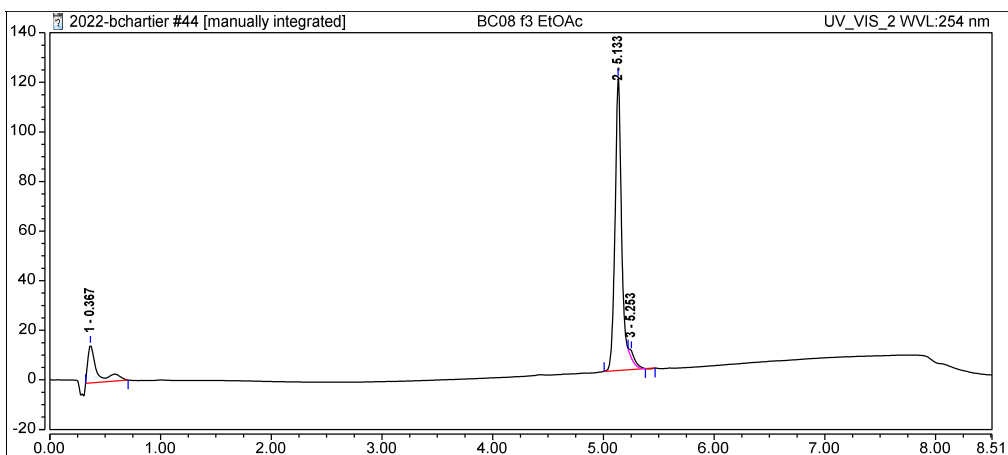
**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K):  $\delta$  = 1.03 (s, 6H), 1.85 (m, 3H), 2.12 (m, 1H), 2.37 (s, 4H), 2.55 (s, 3H), 2.96 (s, 3H), 3.47 (m, 2H), 4.74 (m, 1H), 4.99 (m, 2H), 7.19 (m, 2H), 7.32 (m, 3H), 7.50 (m, 1H), 7.58 (m, 2H), 7.98 (m, 1H), 13.52 (s, 1H);

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K):  $\delta$  = 198.1, 174.0, 170.0, 148.0, 135.0, 133.7, 132.4, 131.6, 131.0, 128.7, 128.7, 128.6, 124.3, 108.0, 67.6, 59.1, 53.6, 52.1, 42.5, 30.6, 30.2, 28.40, 26.36, 25.7, 22.1, 18.1.

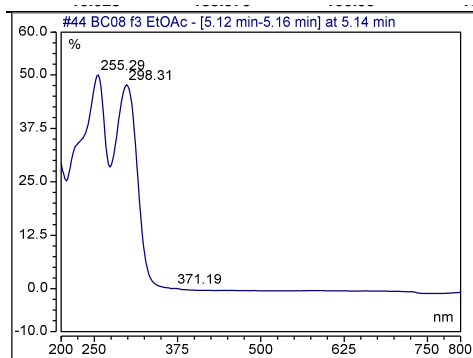
**LRMS:** [M + H]<sup>+</sup>  $m/z$  = 586.6 (calcd. for C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S: 586.2)

**HRMS:** [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  = 586.22187 (calcd. for C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S: 586.22176)

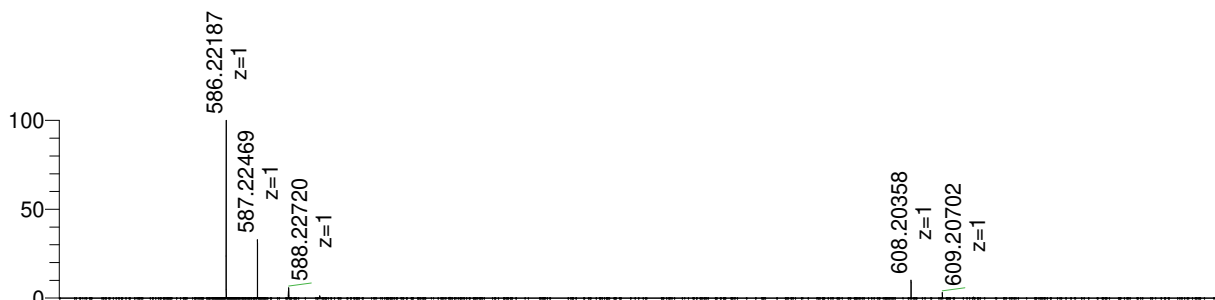
HPLC chromatogram:



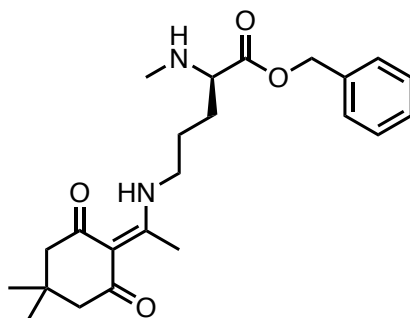
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*NH(Me)-D-Orn(Dde)-OBn, 40*



Thiophenol (0.214 mL, 2.08 mmol) and Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (679 mg, 2.08 mmol) were added to a solution of **39** (488 mg, 0.83 mmol) in MeCN (35 mL). The reaction was stirred at 50 °C until completion of the reaction (1.5 h monitored by LC- MS). The crude was filtered on paper and the MeCN was evaporated under reduced pressure. The resulting crude was dissolved in DCM and then filtered on paper to remove last traces of salts. The DCM was evaporated under reduced pressure and the resulting yellow oil was then purified by normal phase chromatography to give **40** as a colorless oil (293 mg, 0.73 mmol) in 87 % yield.

**HPLC:** *retention time* = 3.60 min, *purity* = 0.96,  $\lambda_{max}$  = 258, 299 nm

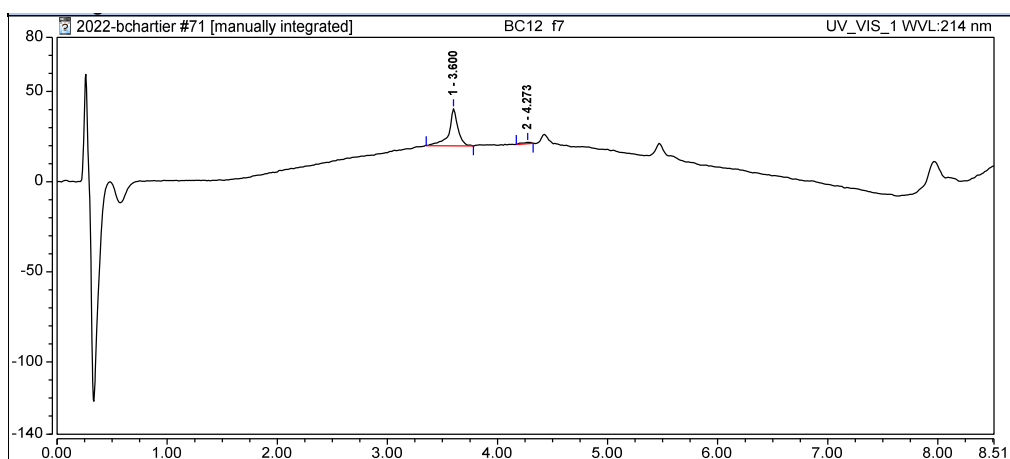
**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K):  $\delta$  = 1.02 (s, 6H), 1.73 (m, 4H), 2.02 (s, 1H), 2.35 (s, 4H), 2.36 (s, 3H), 2.50 (s, 3H), 3.21 (m 1H), 3.36 (m 2H), 5.18 (m, 2H), 7.35 (m, 5H), 13.4 (s, 1H);

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K):  $\delta$  = 174.4, 173.6, 135.7, 128.8, 128.6, 128.6, 108.0, 66.9, 62.7, 53.5, 43.1, 34.7, 30.2, 30.2, 28.4, 25.7, 17.9.

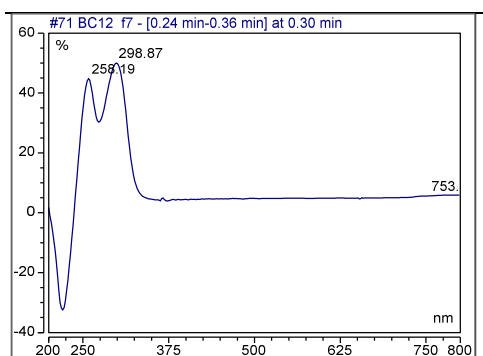
**LRMS:** [M + H]<sup>+</sup> *m/z* = 401.2 (calcd. for C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 401.2)

**HRMS:** [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 401.24344 (calcd. for C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 401.24348)

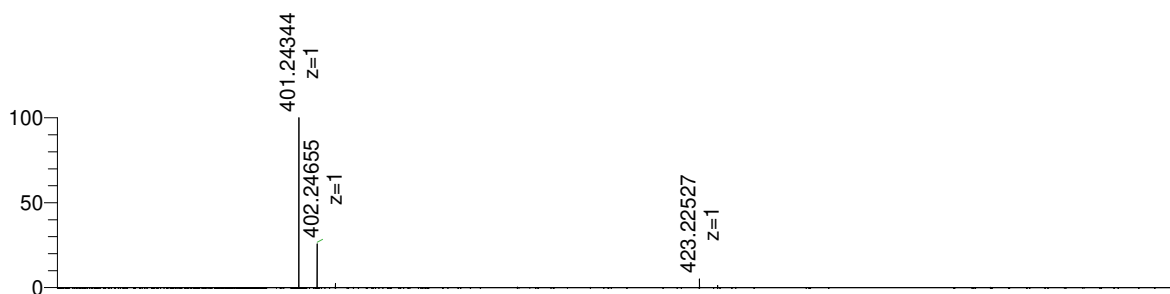
HPLC chromatogram:



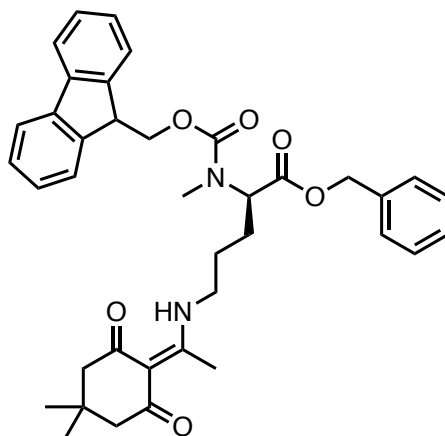
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*N*(Fmoc)(Me)-D-Orn(Dde)-OBn, **41**



DIPEA (0.209 mL, 1.23 mmol) was added to a solution of **40** (247 mg, 0.61 mmol) and Fmoc-Cl (239 mg, 0.92 mmol) in DMF (20 mL). The reaction was stirred at rt until completion of the reaction (0.5 h monitored by LC-MS). DMF was evaporated under reduced pressure, the resulting yellow oil was then dissolved in DCM (20 mL) and the organic layer was washed with a 1 M HCl solution (3 × 10 mL). The organic layer was then dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and dried under reduced pressure. The resulting yellow oil was then purified by normal phase chromatography to give **41** as a yellow oil (340 mg, 0.61 mmol) in 88 % yield.

**HPLC:** retention time = 3.67 min, purity = 0.93,  $\lambda_{max}$  = 260, 300 nm

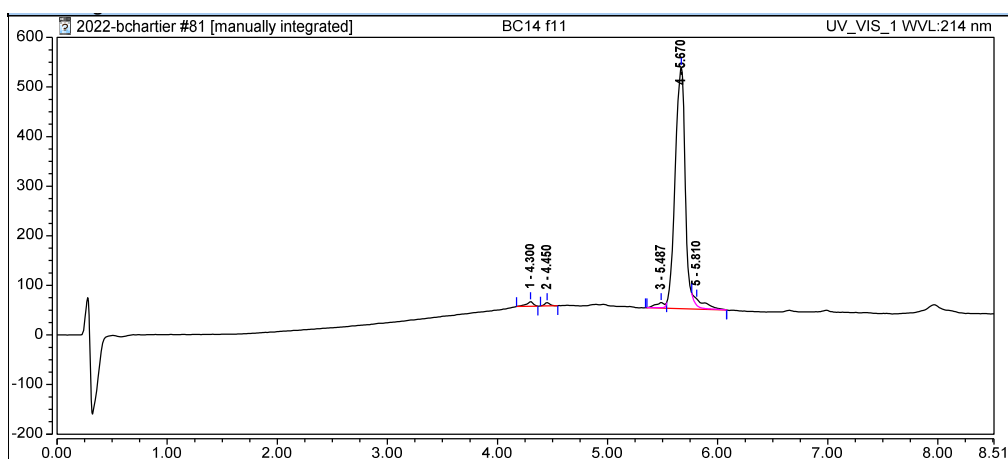
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 298K):  $\delta$  = 0.94 (s, 6H), 1.47 (m, 2H), 1.79 (m, 1H), 1.93 (m, 1H), 2.27 (s, 4H), 2.46 (s, 2H), 2.70 (s, 3H), 3.28 (m 1H), 3.43 (m, 4H), 4.41 (m, 2H), 4.66 (m, 1H), 5.02 (s, 1H), 5.13 (m, 1H), 7.31 (m, 9H), 7.61 (m, 2H), 7.86 (m, 2H), 13.25 (m, 1H);

**<sup>13</sup>C RMN** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K):  $\delta$  = 198.1, 173.8, 170.8, 157.1, 144.1, 143.9, 141.5, 135.5, 128.8, 128.6, 128.3, 128.3, 127.9, 127.2, 125.1, 125.1, 124.7, 120.1, 120.1, 108.00, 68.0, 67.2, 58.5, 58.2, 53.6, 52.9, 47.4, 42.9, 42.8, 36.6, 31.6, 30.6, 30.2, 28.4, 26.3, 26.0, 25.8, 18.1.

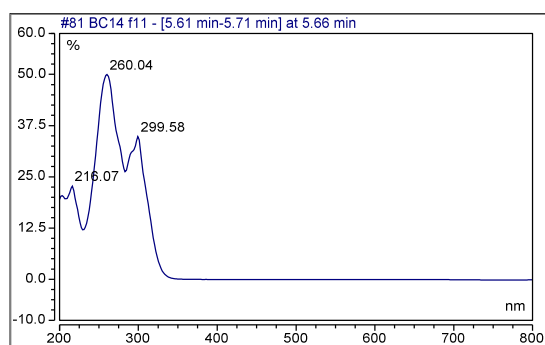
**LRMS:** [M + H]<sup>+</sup>  $m/z$  = 623.8 (calcd. for C<sub>38</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: 623.3)

**HRMS:** [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  = 623.31163 (calcd. for C<sub>38</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: 623.31156)

HPCL chromatogram:



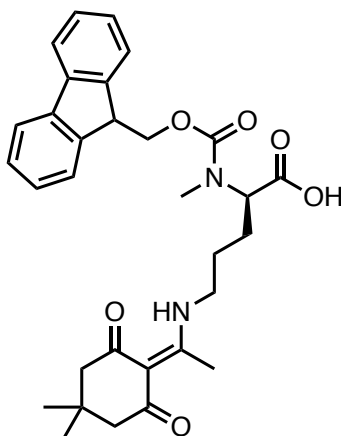
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*N*(Fmoc)(Me)-D-Orn(Dde)-OH, **42**



A solution of **41** (296 mg, 0.47 mmol) and Pd/C (90 mg) in THF (7 mL) was loaded in a round bottom flask loaded with 1 bar of H<sub>2</sub>. The reaction was stirred at rt until completion of the reaction (15 h, monitored by LC-MS). The crude was filtered on Buchner over a pad of Dicalite and the THF was then evaporated under reduced pressure. The resulting colorless oil was then purified by normal phase chromatography to give a colorless solid after lyophilization (199 mg, 0.37 mmol) in 78 % yield.

**HPLC:** retention time = 4.83 min, purity = > 0.99,  $\lambda_{max}$  = 260, 299 nm

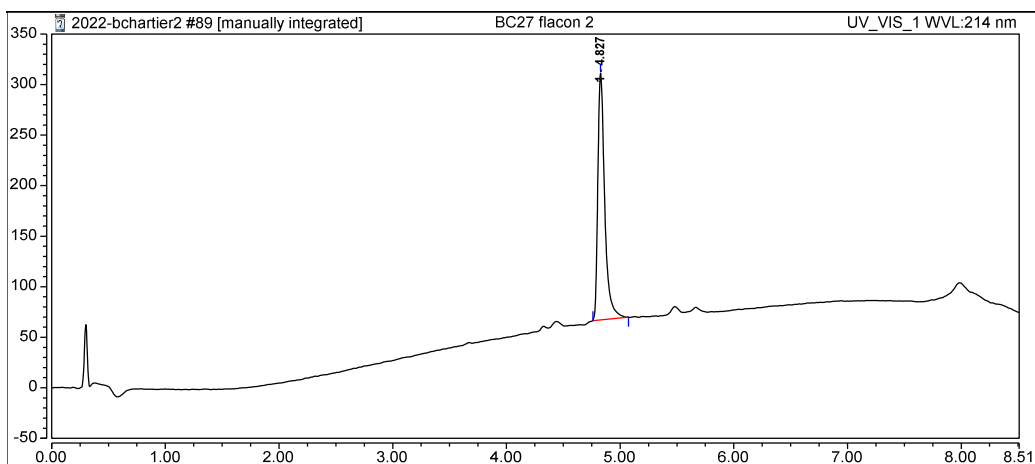
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 298K):  $\delta$  = 13.27 (d, J = 13.5 Hz, 1H), 12.87 (s, 1H), 7.93 – 7.83 (m, 2H), 7.64 (dt, J = 13.8, 7.4 Hz, 2H), 7.46 – 7.35 (m, 2H), 7.35 – 7.25 (m, 2H), 5.76 (s, 1H), 4.60 – 4.20 (m, 4H), 3.35 (s, 5H), 2.71 (s, 3H), 2.47 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 2.28 (s, 4H), 1.98 – 1.36 (m, 4H), 1.31 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 1.24 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 0.95 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 298K):  $\delta$  = 172.8, 172.2, 156.1, 143.8, 143.7, 140.8, 127.6, 127.1, 125.0, 125.0, 120.1, 106.9, 66.7, 57.9, 54.9, 52.3, 46.8, 42.1, 30.3, 29.7, 27.8, 25.5, 25.4, 17.3.

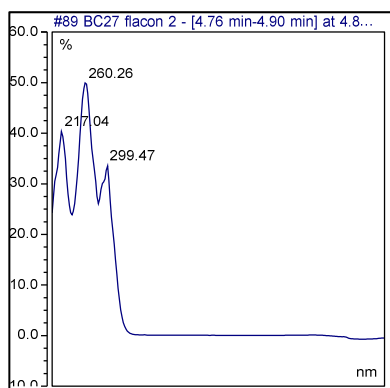
**LRMS:** [M + H]<sup>+</sup> *m/z* = 533.6 (calcd. for C<sub>31</sub>H<sub>37</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: 533.2)

**HRMS:** [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 533.26452 (calcd. for C<sub>31</sub>H<sub>37</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: 533.26461)

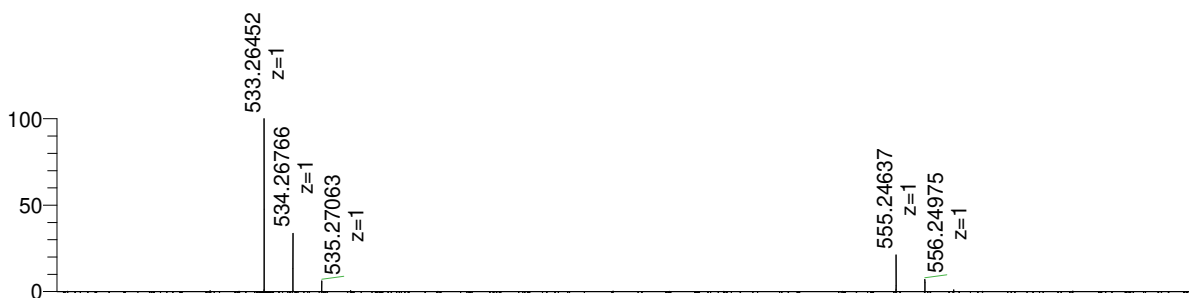
HPCL chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:

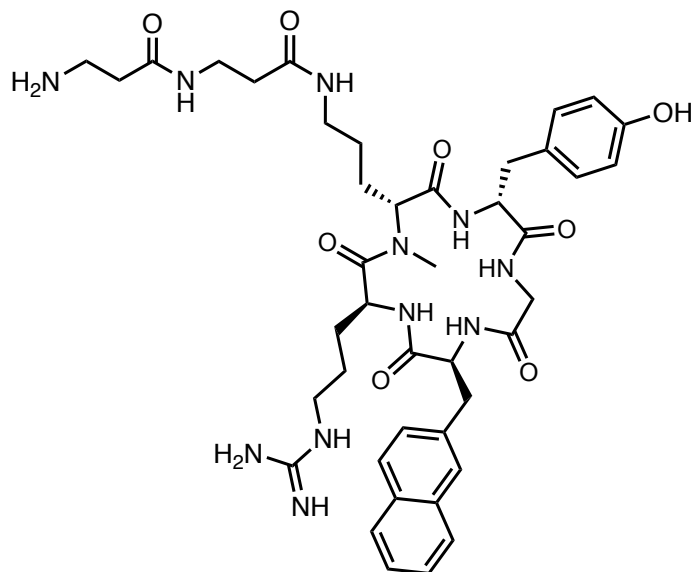


HRMS spectrum:





**[N-Me-D-Arg<sup>2</sup>]FC131-(βAla)<sub>2</sub>, **43****



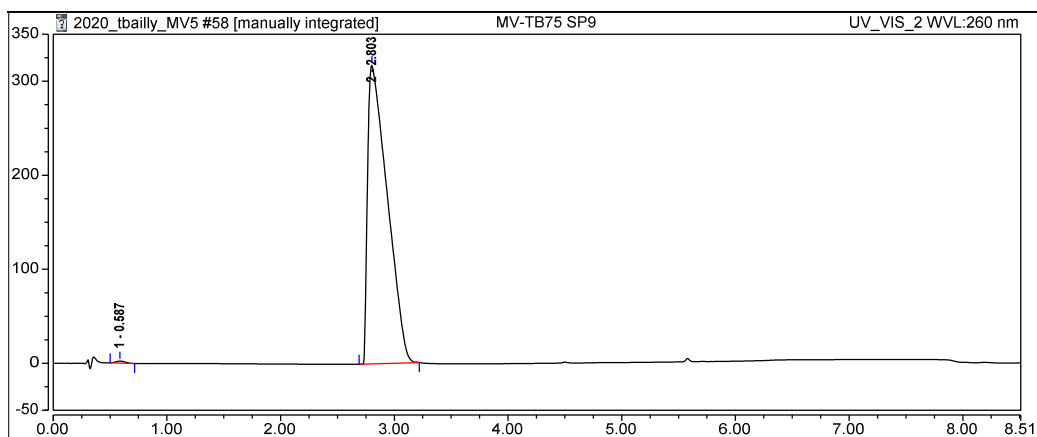
HATU (13 mg, 0.033 mmol) and **1** (10 mg, 0.040 mmol) were added to a solution of **34** (18 mg, 0.015 mmol) in DMF (1 mL). After addition of DIEA (17  $\mu$ L, 0.096 mmol), the solution was left to stir for 2 h at rt. DMF was evaporated under reduced pressure. The resulting yellow oil was dissolved in DCM (1 mL) and washed with ultrapure water (18.2 M $\Omega$ .cm, 3  $\times$  500  $\mu$ L). After the evaporation of DCM under vacuum, the crude was treated for half an hour with a solution of triisopropylsilane (2 %) 2,2'-(ethylenedioxy)diethanethiol (2 %) and water (1 %) in TFA. It was then purified by RP-HPLC giving **43** as a white solid (6 mg, 0.006 mmol) in 40 % yield.

**HPLC:** retention time = 2.80 min, purity = > 0.99,  $\lambda_{max}$  = 224, 275 nm

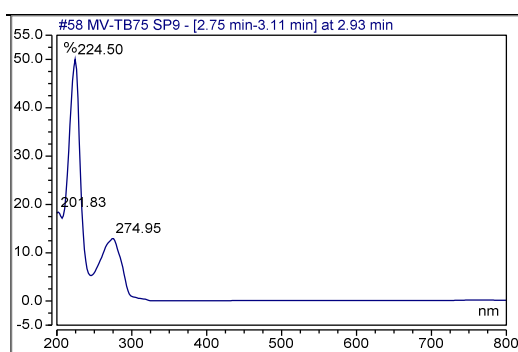
**LRMS:** [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  = 842.7 (calcd. for C<sub>42</sub>H<sub>56</sub>N<sub>11</sub>O<sub>8</sub>: 842.4)

**HRMS:** [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  = 844.44769 (calcd. for C<sub>42</sub>H<sub>58</sub>N<sub>11</sub>O<sub>8</sub>: 844.44643)

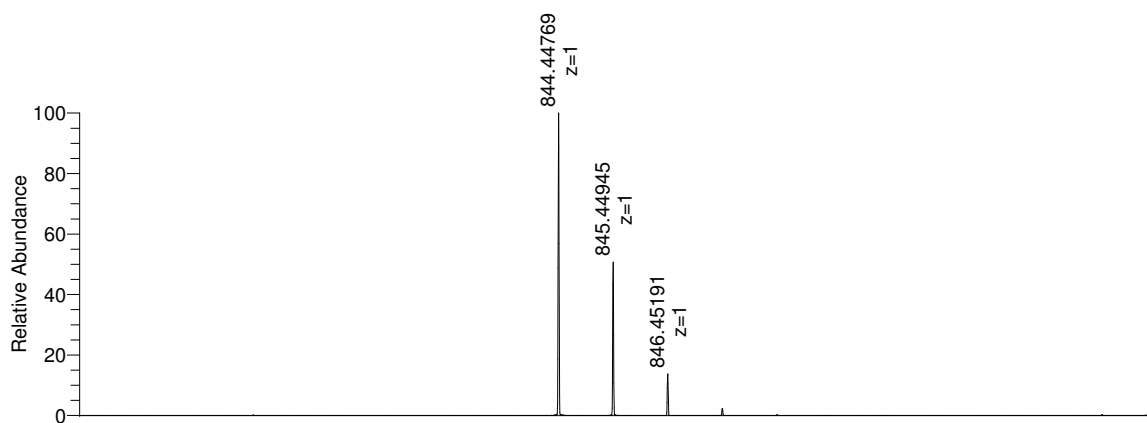
HPLC chromatogram:



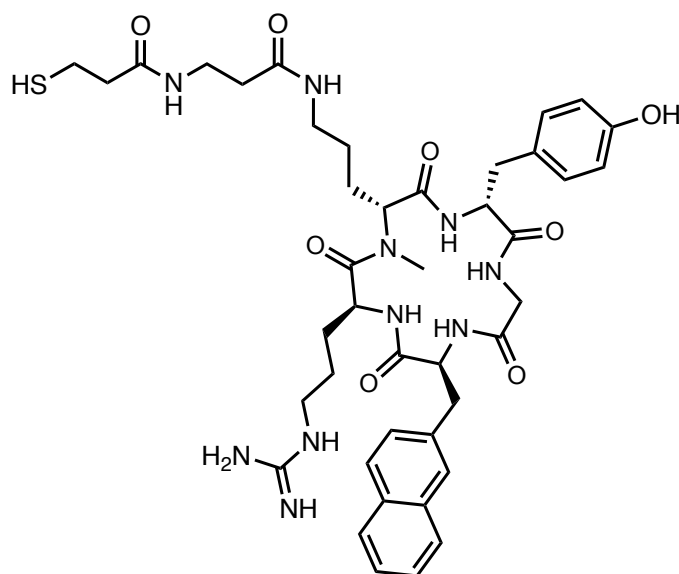
UV-vis absorption spectrum :



HRMS spectrum :



*[N-Me-D-Arg<sup>2</sup>]FC131-(βAla)-mercaptopropionyl, 44*



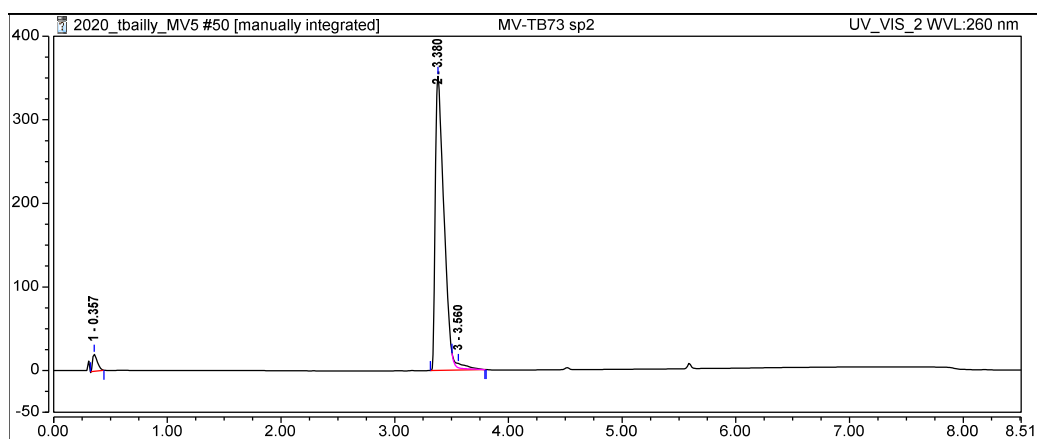
HATU (18 mg, 0.047 mmol) and **3** (20 mg, 0.048 mmol) were added to a solution of **34** (25 mg, 0.020 mmol) in DMF (1 mL). After addition of DIPEA (17  $\mu$ L, 0.096 mmol) the yellow crude was left to stir for 2 h at rt. DMF was evaporated under reduced pressure. The resulting yellow oil was dissolved in DCM (1 mL) and washed with ultrapure water (18.2 M $\Omega$ .cm, 3  $\times$  500  $\mu$ L). After the evaporation of DCM under vacuum, the crude was treated for half an hour by a solution of triisopropylsilane (2 %) 2,2'-(ethylenedioxy)diethanethiol (2 %) and water (1 %) in TFA. It was then purified by RP-HPLC giving **44** as a white solid (7 mg, 0.006 mmol) in 30 % yield.

**HPLC:** retention time = 3.38 min, purity = 0.95,  $\lambda_{max}$  = 225, 275 nm

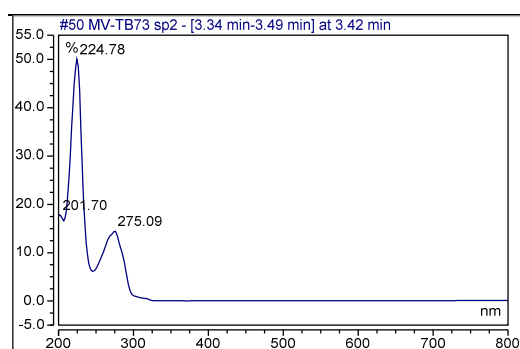
**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup> m/z : 861.7 (calcd. for C<sub>42</sub>H<sub>57</sub>N<sub>10</sub>O<sub>8</sub>S: 861.4)

**HRMS:** [M+Na]<sup>+</sup> m/z = 883.38984 (calcd. for C<sub>42</sub>H<sub>56</sub>N<sub>10</sub>O<sub>8</sub>SNa: 883.38955)

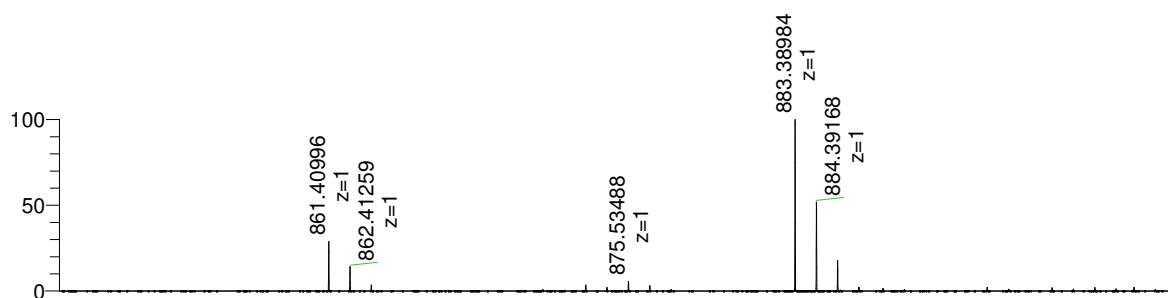
HPLC chromatogram:



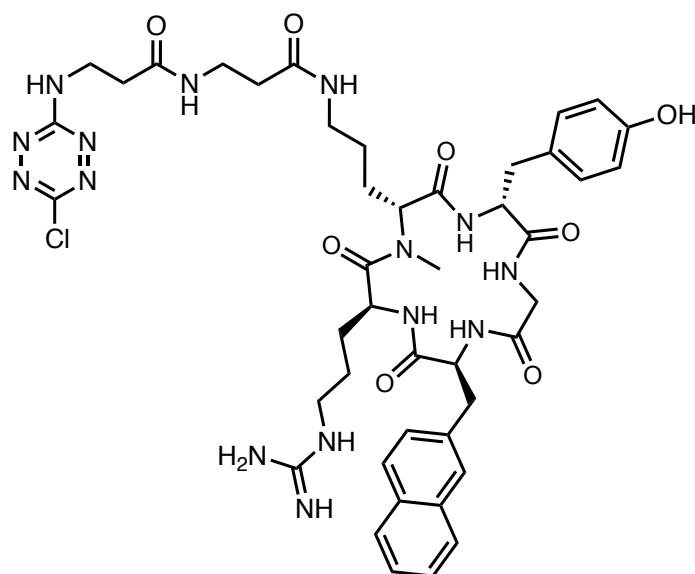
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*[N-Me-D-Arg<sup>2</sup>]FC131-(βAla)<sub>2</sub>-Tz-Cl, 45*



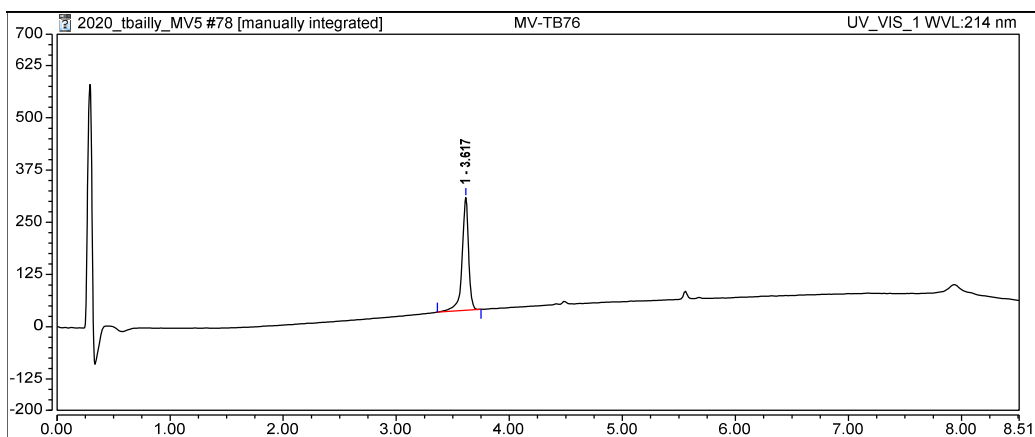
Dichlorotetrazine (9.4 mg, 0.025 mmol) was added to a solution of **43** (11 mg, 0.013 mmol) and DIPEA (5.7  $\mu$ L, 0.033 mmol) and left to stir at room temperature for 10 minutes. The crude was purified by RP-HPLC yielding to **45** as an orange powder (6.8 mg, 0.007 mmol) in 54 % yield.

**HPLC:** *retention time* = 3.62 min, *purity* = > 0.99,  $\lambda_{max}$  = 222, 251, 399, 498 nm

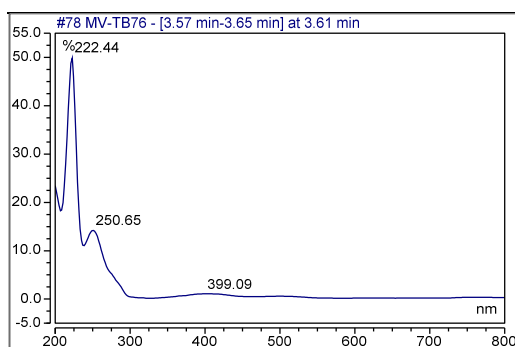
**LRMS:**  $[M+H]^+$  *m/z* : 958.7 (calcd. for C<sub>44</sub>H<sub>57</sub>ClN<sub>15</sub>O<sub>8</sub>: 958.4)

**HRMS:**  $[M+H]^+$  *m/z* : 958.42271 (calcd. for C<sub>44</sub>H<sub>57</sub>ClN<sub>15</sub>O<sub>8</sub>: 958.41976)

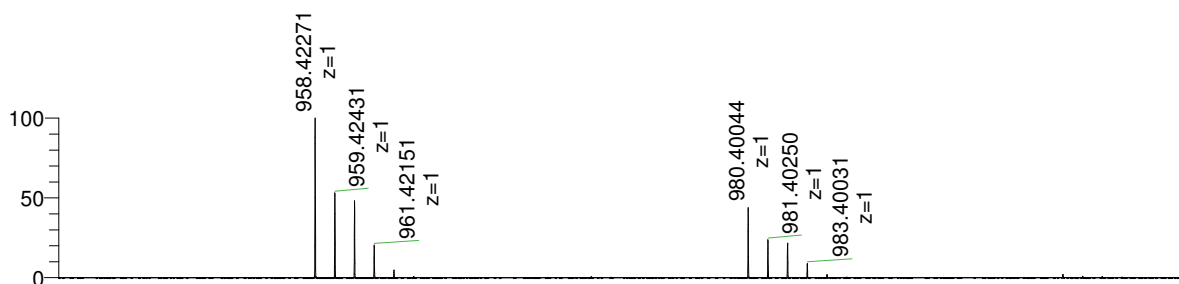
HPLC chromatogram:



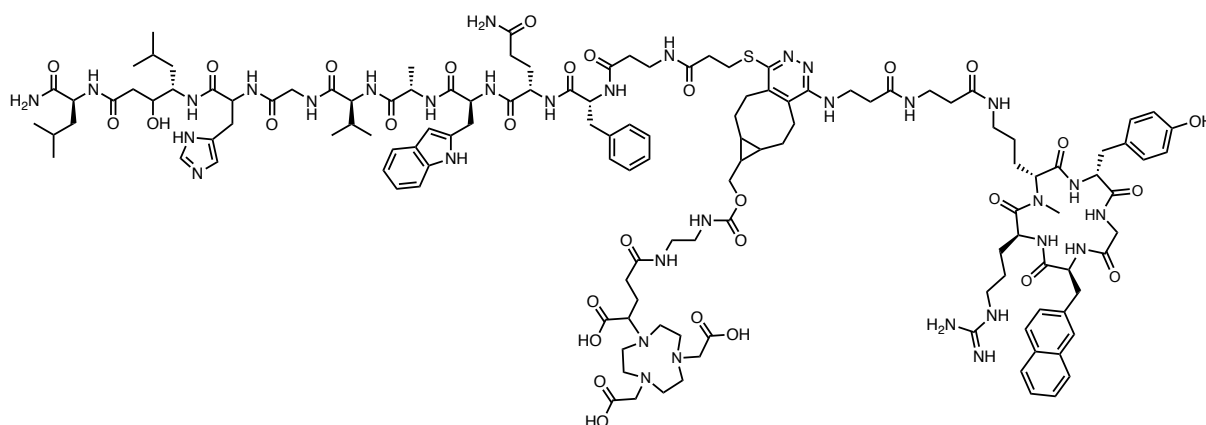
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



**(FC131-pdz-JMV594)NODAGA, 46**



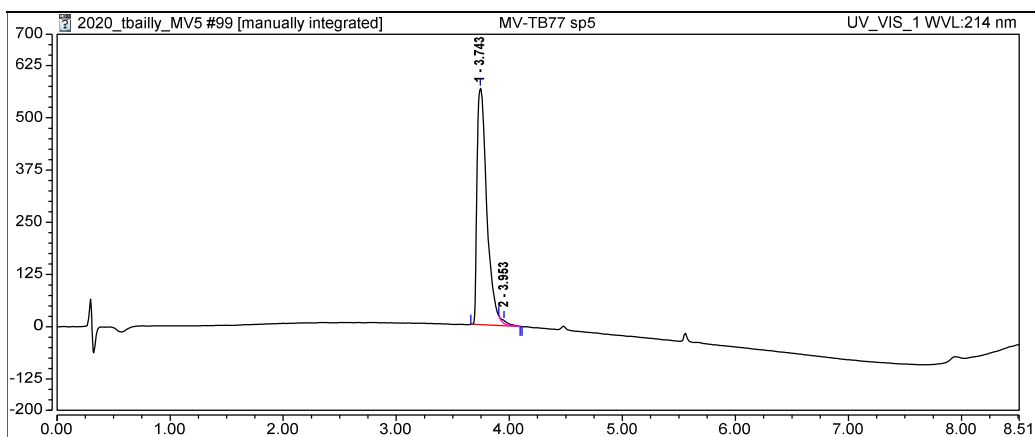
**6** (7.8 mg, 4.7  $\mu\text{mol}$ ) and DIEA (3.5  $\mu\text{L}$ , 20.3  $\mu\text{mol}$ ) were added to a solution of **45** (6.5 mg, 6.1  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (100  $\mu\text{L}$ ). The reaction was stirred at 80  $^{\circ}\text{C}$  for 3 h (after completion of the reaction, monitored by HPLC-MS) and BCN-NODAGA (4.0 mg, 6.7  $\mu\text{mol}$ ) was added to the reaction mixture that was left to stir for 24 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ . The crude was directly purified by RP-HPLC to give the desired compound **46** as a white amorphous solid (6.0 mg, 1.9  $\mu\text{mol}$ ) in 40 % yield.

**HPLC:** retention time = 3.74 min, purity = 0.99,  $\lambda_{\text{max}}$  = 222, 259 nm

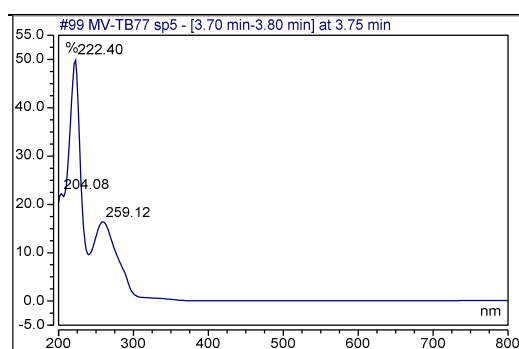
**LRMS:**  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ :  $m/z$  = 921.2 (calcd. for  $\text{C}_{133}\text{H}_{190}\text{N}_{33}\text{O}_{30}\text{S}$ : 920.8)

**HRMS:**  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$   $m/z$  = 1380.20206 (calcd. for  $\text{C}_{133}\text{H}_{189}\text{N}_{33}\text{O}_{30}\text{S}$ : 1380.19939)

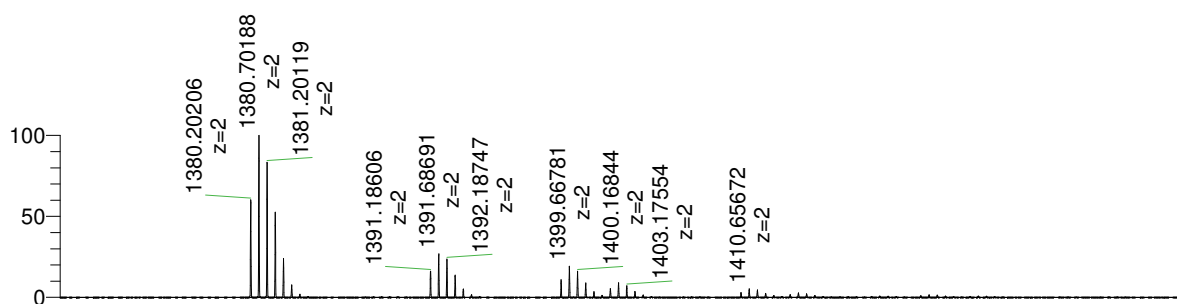
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:

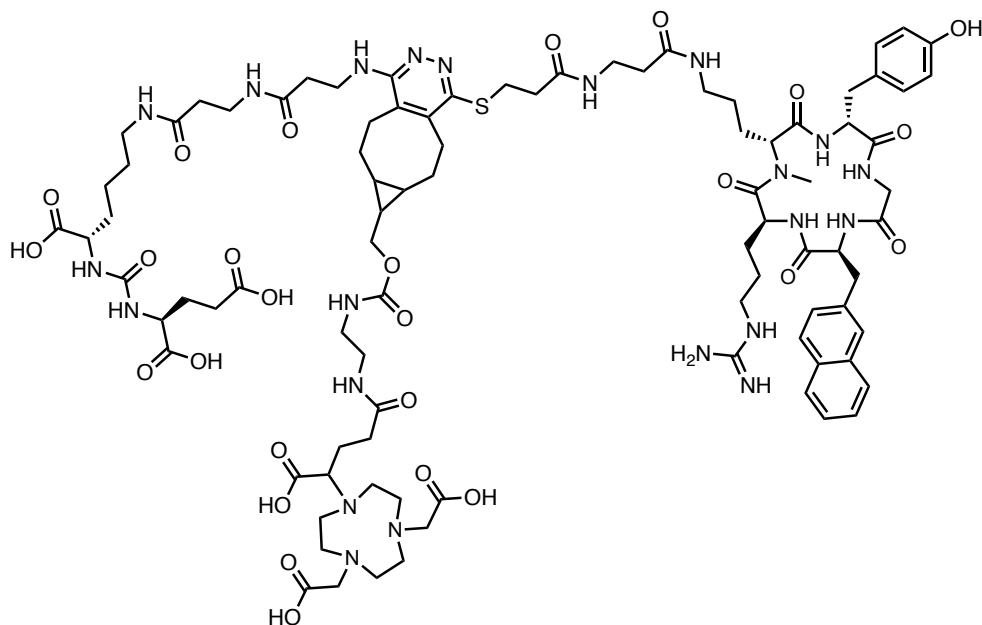


HRMS spectrum:





*(KuE-pdz-FC131)NODAGA, 47*



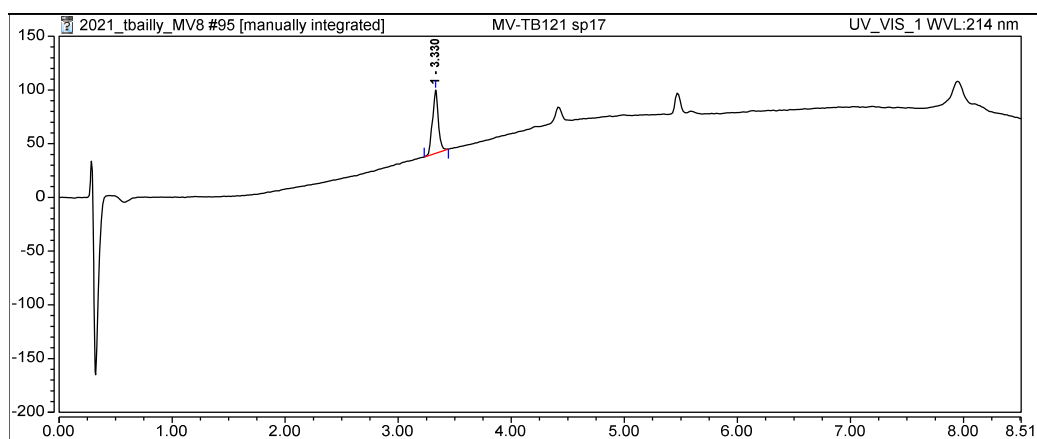
**44** (0.4 mg, 0.37  $\mu\text{mol}$ ) and DIEA (0.3  $\mu\text{L}$ , 1.3  $\mu\text{mol}$ ) were added to a solution of **11** (0.7 mg, 0.9  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (0.1 mL). The reaction was stirred at 80  $^{\circ}\text{C}$  for 3 h (after completion of the reaction, monitored by HPLC-MS) and BCN-NODAGA (0.8 mg, 1.4  $\mu\text{mol}$ ) was added to the reaction mixture that was left to stir for 24 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ . The crude was directly purified by RP-HPLC to give the tBu-protected product as a white amorphous solid. The latter was then dissolved in a mixture of TFA:TIS:DODT:Water (95:2:2:1) and stirred for 1 h at room temperature. Diethyl ether (4  $^{\circ}\text{C}$ ) was added to the reaction mixture resulting in the precipitation of the desired compound. The white solid was washed with cold diethyl ether and dried under vacuum to provide **47** (0.18 mg, 0.08  $\mu\text{mol}$ ) in 22 % yield.

**HPLC:** retention time = 3.33 min, purity = > 0.99,  $\lambda_{\text{max}}$  = 221, 258 nm

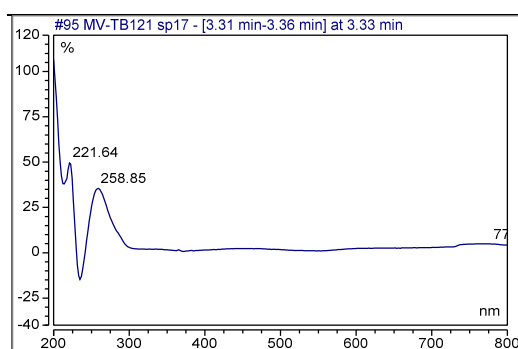
**LRMS:**  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  :  $m/z$  = 984.0 (calcd. for  $\text{C}_{90}\text{H}_{130}\text{N}_{22}\text{O}_{26}\text{S}$  : 983.5)

**HRMS:**  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  :  $m/z$  = 983.46023 (calcd. for  $\text{C}_{90}\text{H}_{130}\text{N}_{22}\text{O}_{26}\text{S}$  : 983.46182)

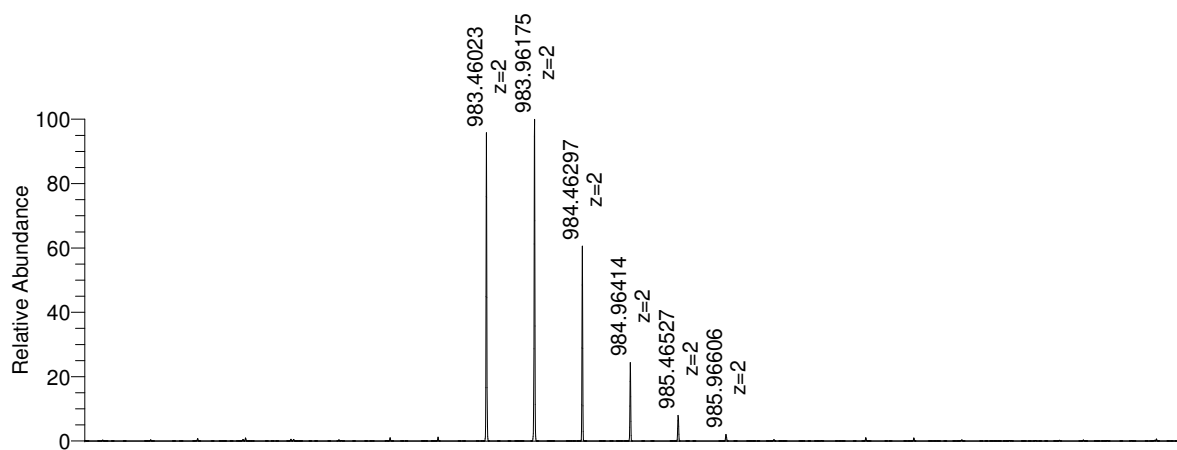
HPLC chromatogram:



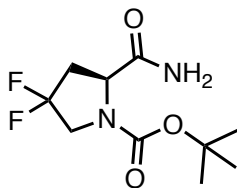
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*tert-butyl (S)-2-carbamoyl-4,4-difluoropyrrolidine-1-carboxylate*, **48**  
(CAS 426844-50-0)

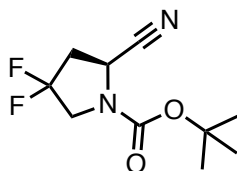


*N*-Boc-4,4-difluoro-L-proline (450 mg, 1.79 mmol), EDC (450 mg, 2.35 mmol) and HOBt (360 mg, 2.35 mmol) were dissolved in MeCN (6 mL). The reaction mixture was stirred for 1 h and NH<sub>3</sub> 25 % in water (0.1 mL) was added to the solution. The reaction mixture was stirred for 3 days. MeCN (5 mL) was added to the crude and the precipitate was filtered. The resulting solution was concentrated under reduced pressure and purified by normal phase chromatography to give **48** as a white solid (402 mg, 1.79 mmol) in 90 % yield.

<sup>1</sup>H NMR: (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 298K): δ = 7.48 (d, J = 20.1 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 29.5 Hz, 1H), 4.26 (ddd, J = 15.0, 9.1, 5.1 Hz, 1H), 3.73 (ddt, J = 23.9, 16.8, 12.5 Hz, 2H), 2.78 (tt, J = 21.9, 10.7 Hz, 1H), 2.31 (qd, J = 15.1, 5.4 Hz, 1H), 1.39 (d, J = 20.7 Hz, 9H).

<sup>13</sup>C NMR: (126 MHz, DMSO) δ 172.8, 153.4, 129.6 – 125.0, 80.2, 58.1, 53.3, 38.9, 28.4.

*tert-butyl (S)-2-cyano-4,4-difluoropyrrolidine-1-carboxylate*, **49** (CAS 483366-14-9)

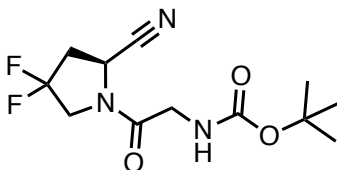


**48** (2.52 mg, 10.1 μmol) and Burgess reagent (2.88 mg, 12.1 μmol) were solubilized in anhydrous DCM (25 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature until completion of the reaction (3 h monitored by TLC). The crude was concentrated under reduced pressure and purified by normal phase chromatography to give **49** as a white solid (2.20 mg, 9.5 μmol) in 94% yield.

<sup>1</sup>H NMR: (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K): δ = 4.88 – 4.47 (m, 1H), 3.73 (q, J = 11.5 Hz, 2H), 2.79 – 2.53 (m, 2H), 1.44 (d, J = 10.1 Hz, 9H).

<sup>13</sup>C NMR: (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K) δ 117.1, 83.0, 52.4, 52.1, 45.0, 44.7, 39.1, 38.9, 38.5, 28.2.

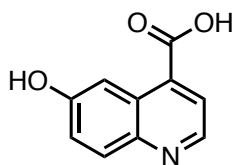
*tert-butyl* (S)-(2-(2-cyano-4,4-difluoropyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)carbamate, **50** (CAS 1448440-50-3)



**49** (175 mg, 0.75 mmol) was added to a solution of 2 M HCl (6 mL) and MeCN (1 mL). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. An additional 2 M HCl (3 mL) was added to the reaction mixture and stirred overnight at room temperature. The aqueous phase was then washed EtOAc (3 × 15 mL). 1 M NaOH was added until reaching pH 10. The aqueous phase was then extracted with EtOAc (3 × 15 mL). The organic layer was finally washed with brine (3 × 10 mL) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The organic layer was filtered and concentrated under reduced pressure to give the desired amine. *N*-Boc-protected Glycine (158 mg, 0.90 mmol) and HBTU (343 mg, 0.90 mmol) were solubilized in DMF (2 mL) and DIPEA (0.384 mL, 2.26 mmol) and stirred for 30 minutes. The solution was then poured on the amine and stirred at room temperature until completion of the reaction (2 h monitored by LC-MS). DMF was removed under reduced pressure and the crude was directly purified by RP-HPLC to give **50** as a white solid (191 mg, 0.66 mmol) in 87 % yield.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K): δ = 5.45 – 5.29 (m, 1H), 4.96 (t, J = 6.5 Hz, 1H), 4.02 – 3.75 (m, 4H), 2.81 – 2.68 (m, 2H), 1.44 (s, 9H).

*6-hydroxyquinoline-4-carboxylic acid, 51 (CAS 4312-44-1)*



6-methoxyquinoline-4-carboxylic acid (1.17 g, 5.76 mmol) was dissolved in a solution of HBr 48 % in water (30 mL). The reaction mixture was stirred on reflux overnight. After the reaction mixture cooled down to rt, a solution of NaOH 16 M (16 mL) was added to the crude. A solution of NaOH 6 M was then added until precipitation of the product (pH 5 to 7). The precipitate was finally filtered and dried under vacuum to give a yellowish mixture of sodium and bromine salts (1.45 g, 5.35 mmol) in 93 % yield (estimated with ionic chromatography).

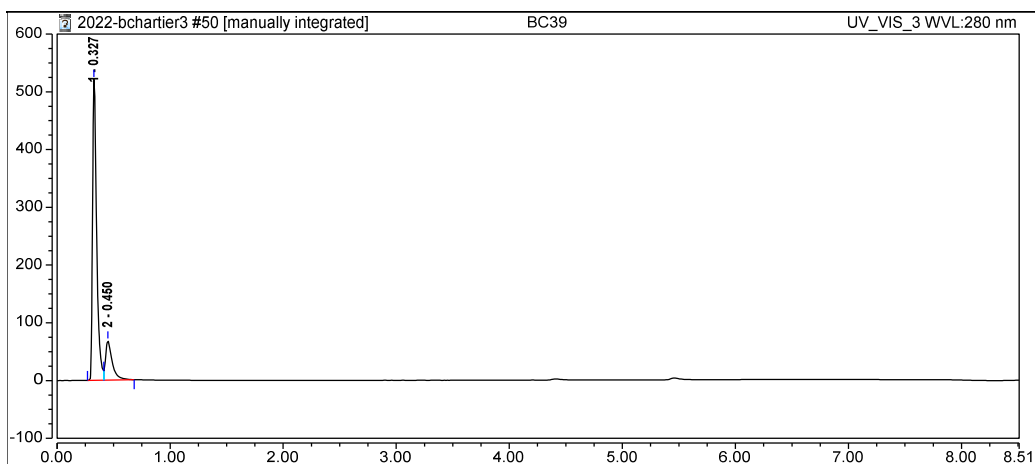
**HPLC:** *retention time* = 0.33 min, *purity* = > 0.88,  $\lambda_{max}$  = 247, 254, 316 nm

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 298K):  $\delta$  = 13.66 (s, 1H), 10.25 (s, 1H), 8.78 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 8.06 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.84 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 7.38 (dd, J = 9.1, 2.7 Hz, 1H).

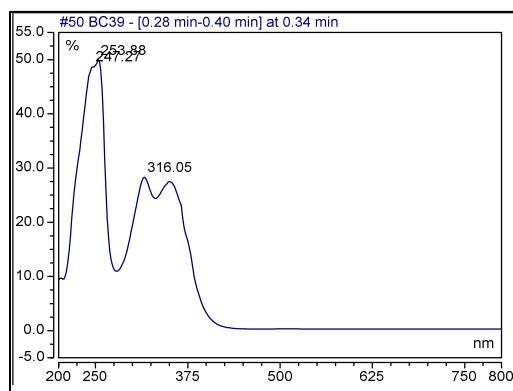
**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 298K)  $\delta$  = 167.8, 156.9, 146.5, 144.1, 133.4, 131.2, 126.2, 122.3, 122.3, 106.5.

**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup>: *m/z* = 190.3 (calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>3</sub> : 190.0)

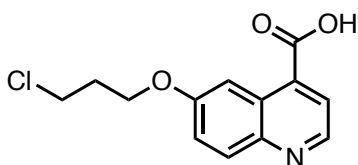
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:



*6-(3-chloropropoxy)quinoline-4-carboxylic acid, 52 (CAS 2370952-95-5)*



3-Bromo-propan-1-ol (0.051 mL, 0.56 mmol) and Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (464 mg, 1.42 mmol) were added to a solution of **51** (100 mg, 0.28 mmol) in DMF (3 mL). The reaction was stirred at 60 °C overnight and the crude was concentrated under reduced pressure. MeCN (6 mL) was added to the dried crude and the solution was filtered to remove the cesium carbonate. An aqueous solution of 6 M NaOH was then added until the solution became clear (pH 9 to 10). The pH was then brought back to pH 6 thanks to HCl 1 M. The product was then extracted with EtOAc (3 × 10 mL). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and purified by normal phase chromatography yielding to **52** as a white solid (18 mg, 0.055 mmol) in 15 % yield.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 298K): δ = 8.87 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 8.20 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 7.51 (dd, J = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 4.24 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.86 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.27 (p, J = 6.3 Hz, 2H).

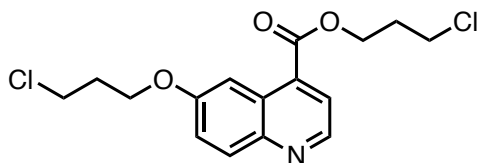
<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 298K) δ = 167.7, 157.4, 147.6, 144.9, 134.1, 131.2, 125.9, 122.6, 122.1, 104.5, 64.7, 42.0, 31.6.

LRMS: [M+H]<sup>+</sup>: m/z = 266.2 (calcd. for C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>ClNO<sub>3</sub> : 266.7)





*3-chloropropyl 6-(3-chloropropoxy)quinoline-4-carboxylate*, **53** (CAS 2605221-47-2)

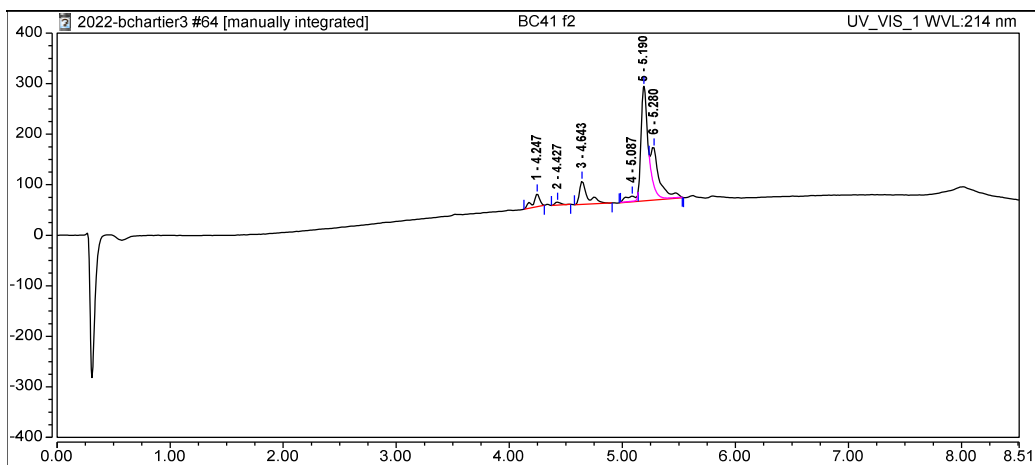


3-Bromo-propan-1-ol (1.457 mL, 14.7 mmol) and  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (4.5 g, 14.5 mmol) were added to a solution of **51** (1.3 g, 4.9 mmol) in DMF (60 mL). The reaction was stirred at 60°C overnight. The crude was concentrated under reduced pressure. MeCN (100 mL) was then added to the crude and filtered on paper. The resulting solution was concentrated under reduced pressure and purified by normal phase flash chromatography to yield a yellowish oil (1.25 g, 3.66 mmol, 75%).

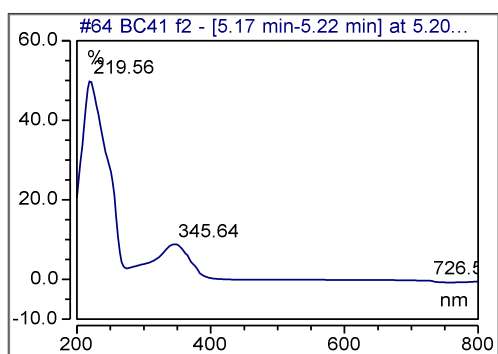
**HPLC:** *retention time* = 5.19 min, *purity* = 0.56,  $\lambda_{max}$  = 220, 346 nm

**LRMS:**  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :  $m/z$  = 342.3 (calcd. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{NO}_3$  : 342.2)

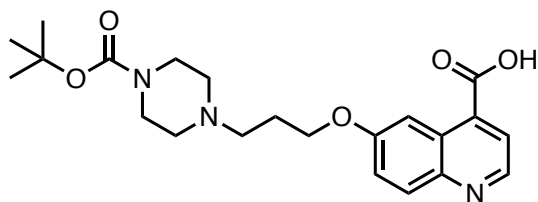
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:



**6-(3-(4-(tert-butoxycarbonyl)piperazin-1-yl)propoxy)quinoline-4-carboxylic acid, **54** (CAS 2370952-96-6)**



*N*-Boc-piperazine (1710 mg, 9.17 mmol) and KI (500 mg, 3.04 mmol) were added to a solution of **53** (1255 mg, 3.67 mmol) in DMF (30 mL). The solution was stirred 3 h at 60 °C and cooled to rt. DMF was evaporated under reduced pressure and the resulting crude was dissolved in MeCN (50 mL). An aqueous solution of NaOH 6 M (10 mL) was then added to the reaction mixture and stirred at room temperature for 1 h. The solution finally then neutralized with an aqueous solution of HCl 1 M and the solvents were removed under reduced pressure. The crude was purified by RP-HPLC to give the desired product **54** (1306 mg, 3.14 mmol) in 86 % yield.

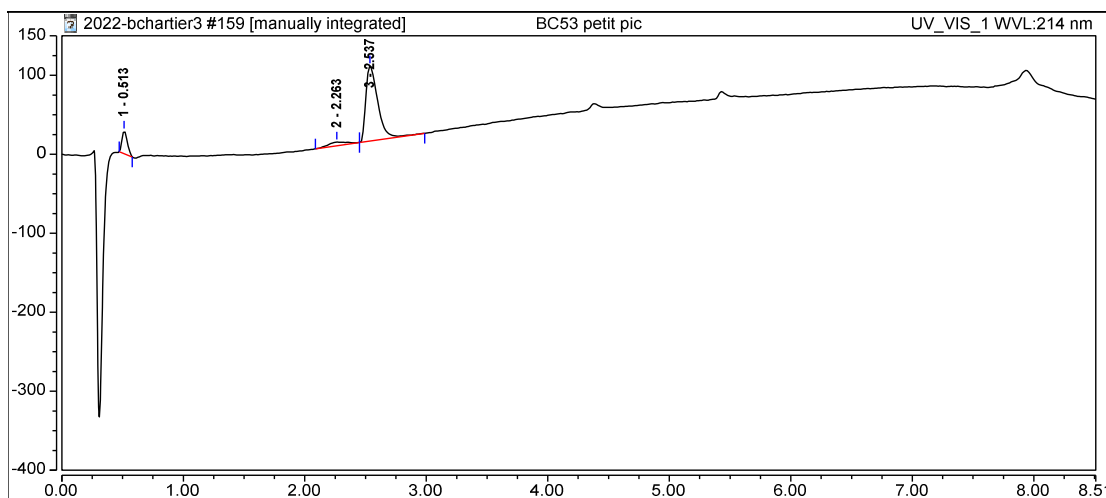
**HPLC:** retention time = 2.26 min, purity = 0.83,  $\lambda_{max}$  = 247, 316 nm

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 298K):  $\delta$  = 13.79 (s, 1H), 9.66 (s, 1H), 8.89 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 8.19 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 8.06 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 7.51 (dd, *J* = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 4.22 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 4.04 (s, 2H), 3.61 – 3.48 (m, 2H), 3.35 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 2.28 – 2.19 (m, 2H), 1.42 (d, *J* = 4.7 Hz, 9H).

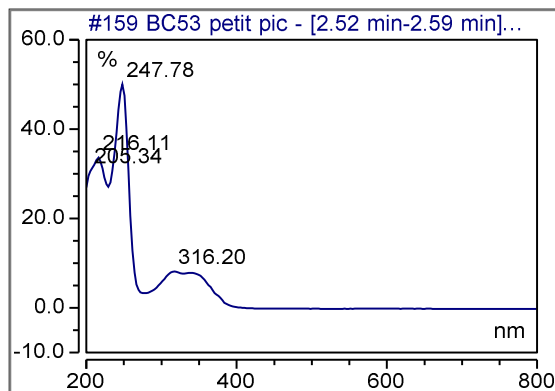
**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 298K)  $\delta$  = 168.0, 157.8, 153.7, 148.2, 131.7, 126.3, 80.4, 65.6, 53.7, 51.3, 28.4, 23.8.

**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup>: *m/z* = 416.5 (calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> : 416.5)

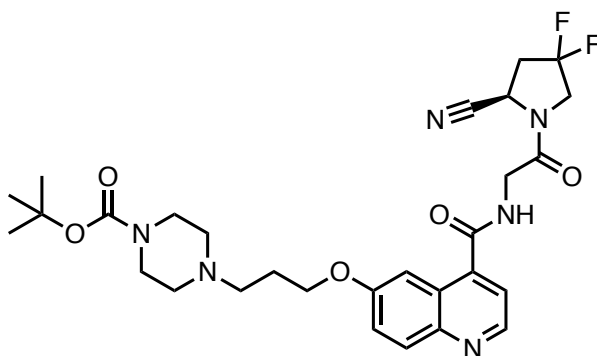
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:



*tert*-butyl (S)-4-(3-((4-((2-(2-cyano-4,4-difluoropyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)carbamoyl)quinolin-6-yl)oxy)propyl)piperazine-1-carboxylate, **55** (CAS 2370952-97-7)



PTSA mono hydrate (975 mg, 4.7 mmol) was added to a cooled (0°C) solution of **50** (930 mg, 3.2 mmol) in MeCN (10 mL). The mixture was slowly warmed to rt and stirred for 24 h. The crude was concentrated under reduced. A solution of HBTU (1230 mg, 3.2 mmol), **54** (1335 mg, 3.2 mmol) and DIEA (2.7 mL, 16.0 mmol) in DMF (20 mL) was directly added to the residue. The reaction mixture was stirred for 3 h. The solvents were evaporated under reduced pressure and the resulting mixture was purified by RP-HPLC to give a greenish powder after freeze-drying (960 mg, 1.6 mmol) **55** in 50 % yield.

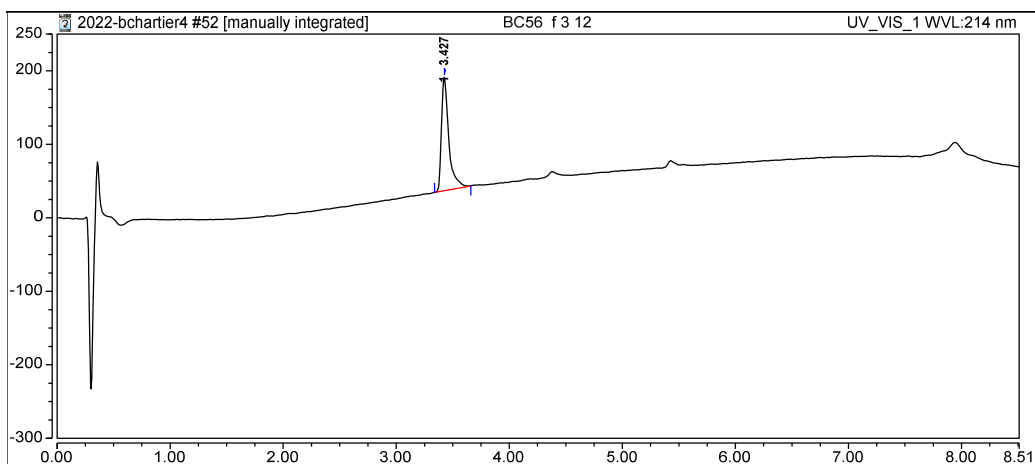
**HPLC:** retention time = 3.43 min, purity = > 0.99,  $\lambda_{max}$  = 222, 334 nm

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 298K):  $\delta$  = 9.04 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.24 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.85 (dd, *J* = 9.6, 2.3 Hz, 1H), 4.84 (t, *J* = 6 Hz, 1H), 4.46-4.36 (m, 4H), 4.26 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H), 3.83 (m, 1H), 3.67 (m, 3H), 3.47 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 3.27 (br, 2H), 3.11 (t, *J* = 11.5 Hz), 2.37 (m, 4H), 2.22 (m, 2H), 1.46 (s, 9H).

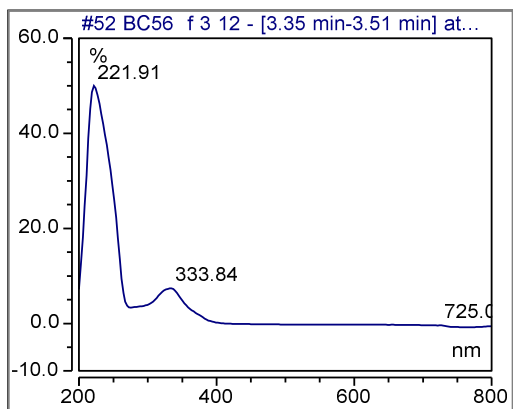
**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 168.6, 168.0, 159.4, 155.5, 147.7, 141.8, 135.1, 128.2, 127.5, 123.1, 120.0, 119.1, 104.7, 82.9, 66.0, 54.3, 51.5, 47.0, 46.3, 42.3, 29.4, 27.4, 24.7, 23.1.

**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup>: *m/z* = 586.6 (calcd. for C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>F<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub> : 587.3)

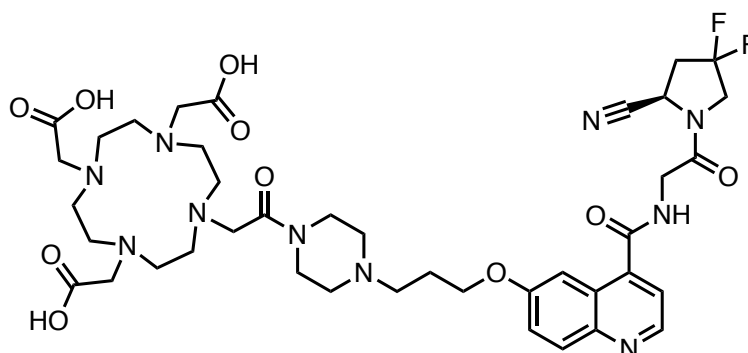
HPLC chromatogram:



UV-vis spectrum:



**FAP1-04, 56 (CAS 2374782-02-0)**



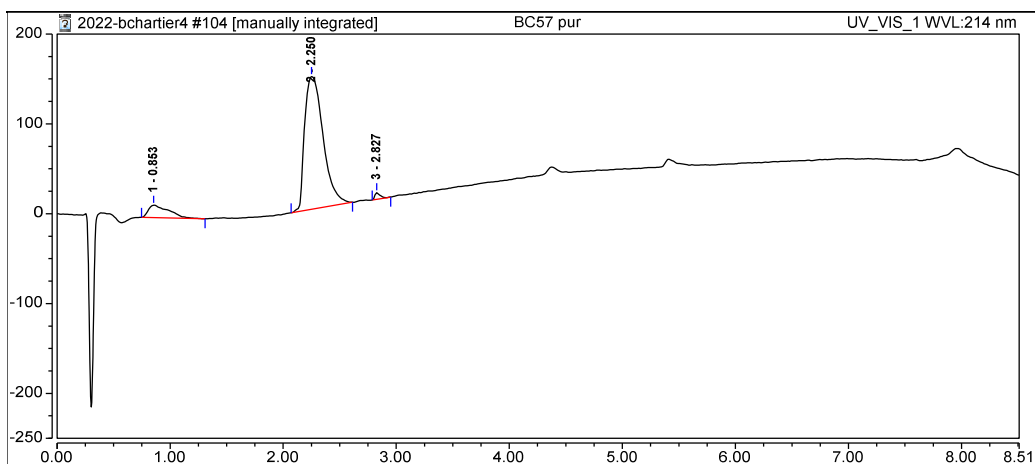
PTSA (24 mg, 0.12 mmol) was added to a solution of **55** (30 mg, 0.05 mmol) in acetonitrile (10 mL). The reaction mixture was stirred at 45 °C until completion of the deprotection (followed-up by HPLC-MS, 15 h). Acetonitrile was evaporated under reduced pressure and the resulting oil was redissolved in DMF (1 mL) to which were added DOTA-NHS (46 mg, 0.06 mmol) and DIEA (36  $\mu$ L, 0.20 mmol). The resulting solution was stirred for 3 h at rt and directly purified by RP-HPLC to give the desired radiotracer precursor FAP1-04 (**56**) in 52 % yield (25.5 mg, 0.026 mmol)

**HPLC:** *retention time* = 2.25 min, *purity* = 0.90,  $\lambda_{max}$  = 204, 217, 249 nm

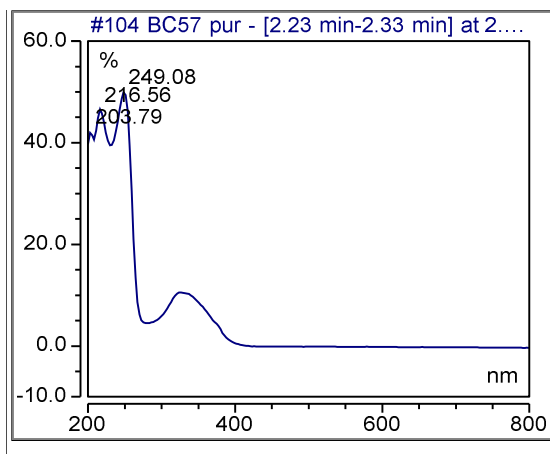
**LRMS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z$  = 873.9 (calcd. for  $C_{40}H_{54}F_2N_{10}O_{10}$  : 873.4)

**HRMS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z$  = 873.40511 (calcd. for  $C_{40}H_{54}F_2N_{10}O_{10}$  : 873.40652)

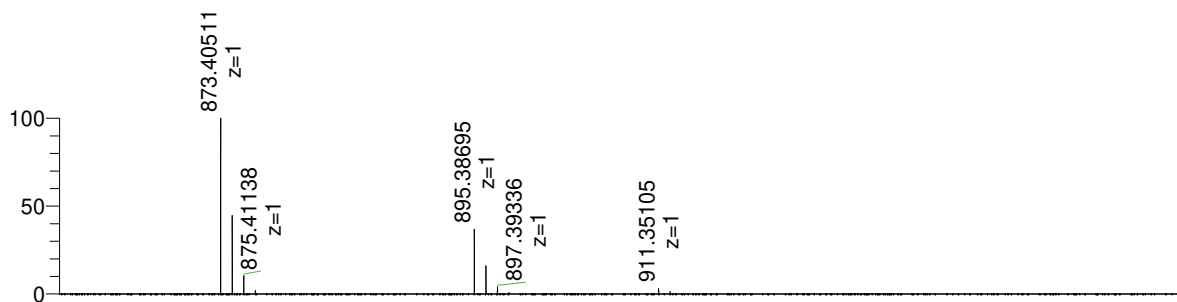
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:



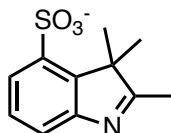
HRMS spectrum:





### 3. Chapter III – Compounds **57A** to **66**

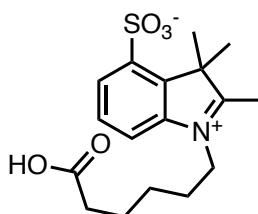
*1-(5-Carboxypentyl)-2,3,3-trimethylindoleninium-5-sulfonate*, **57A** (CAS 146368-08-3) and *1-Ethyl-2,3,3-trimethylindoleninium-5-sulfonate*, **57B** (CAS 146368-07-2)



4-hydrazinobenzenesulfonic acid (10 g, 50.8 mmol) was mixed with 3-methyl-2-butanone (16.5 mL, 153.2 mmol) and AcOH (28 mL). The resulting reaction mixture was stirred under reflux for 3 h. After cooling to rt, the reaction mixture was stored at 4 °C until a pink solid precipitated (ca. 1 h). It was triturated with cyclohexane until a free pink powder was obtained (ca. 4 × 100 mL), filtered and finally washed with Et<sub>2</sub>O. After overnight drying (under vacuum), the recovered product (13.06 g) was converted to its potassium salt by stirring its solution in MeOH (25 mL) with a 1.0 M KOH solution in iPrOH (3.06 g in 50 mL) for 15 min. The alkaline solution turned yellow and the corresponding potassium salt precipitated as beige solid. It was filtered off, washed with Et<sub>2</sub>O (2 × 100 mL) and dried under vacuum overnight to give 2,3,3-trimethylindoleninium-5-sulfonate in 78 % yield (10.6 g, 38.2 mmol).

Analytical data were found to be identical to literature data (Mujumdar *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 4 (1993), 105-111).

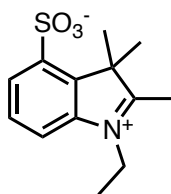
#### 1-(5-Carboxypentyl)-2,3,3-trimethylindoleninium-5-sulfonate, **57A**



A suspension of 2,3,3-trimethylindoleninium-5-sulfonate, potassium salt (2 g, 7.2 mmol, 1 equiv.) and 6-bromohexanoic acid (2.11 g, 10.8 mmol, 1.5 equiv.) in 1,2-dichlorobenzene (20 mL) was stirred at 130 °C for 3 days. Thereafter, the reaction mixture was cooled to rt and 1,2-dichlorobenzene was removed by decantation. The black solid was crushed using a mortar/rammer, triturated with iPrOH (3 × 50 mL), filtered, washed with Et<sub>2</sub>O and finally dried under vacuum to give **57A** as a dark pink solid in quantitative yield (2.5 g, 7.1 mmol).

Analytical data were found to be identical to literature data (Mujumdar *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 4 (1993), 105-111).

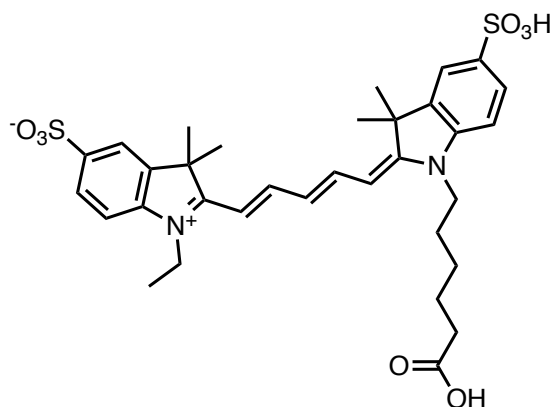
1-Ethyl-2,3,3-trimethylindoleninium-5-sulfonate, **57B**



A suspension of 2,3,3-trimethylindoleninium-5-sulfonate, potassium salt (4 g, 14.4 mmol) in a large excess of EtI (29 mL, 363.6 mmol, 25.2 equiv.) was heated under reflux for 4 days. Thereafter, the reaction mixture was cooled to rt and filtered to remove excess of EtI. The hygroscopic pink solid was triturated with acetone (2 × 100 mL) to remove KI, filtered, washed with Et<sub>2</sub>O and finally dried under vacuum to give **57B** (3.85 g, 14.4 mmol) in quantitative yield.

Analytical data were found to be identical to literature data (Mujumdar *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 4 (1993), 105-111).

*Sulfoindocyanine dye 5.0, 57 (CAS 146368-11-8)*



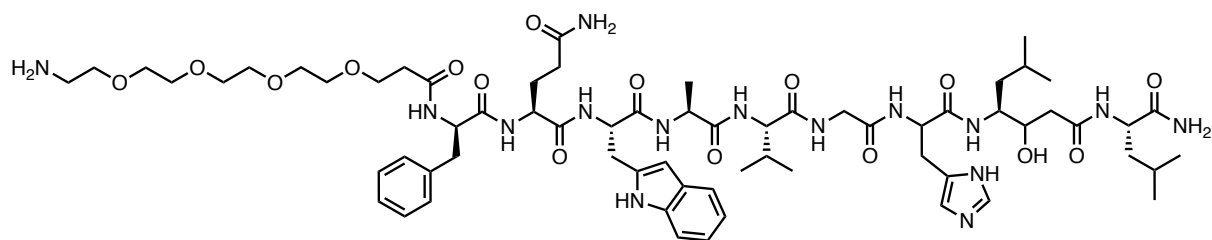
**57B** (1.24 g, 3.7 mmol, 1 equiv.) was dissolved in AcOH (20 mL). Then, malonaldehyde dianilide hydrochloride (0.97 g, 3.7 mmol, 1 equiv.) and Ac<sub>2</sub>O (20 mL) were sequentially added. The resulting reaction mixture was stirred under reflux for 30 min. The completion of the reaction was monitored by recording UV-vis absorption spectra in MeOH, which showed that as the reaction progressed the absorption maximum at 384 nm declined almost to the vanishing point and the absorption at 454 nm (corresponding to hemicyanine intermediate) rose correspondingly. Thereafter, the mixture was evaporated under vacuum. The resulting dark oily residue was used in the next step without purification.

**57A** (1.58 g, 4.5 mmol, 1.2 equiv.) and hemicyanine intermediate were dissolved in a mixture of AcOH (20 mL) and pyridine (20 mL). The resulting solution was heated under reflux for 30 min and quickly turned dark turquoise blue. The completion of the reaction was monitored by recording UV-vis absorption spectra in MeOH, which showed that as the reaction progressed the absorption maximum at 454 nm declined almost to the vanishing point and the absorption of cyanine dye at 648 nm rose correspondingly. Thereafter, the mixture was cooled with an ice-water bath and then evaporated to dryness under high vacuum with heating above 40 °C. The resulting dark-blue oily residue was triturated twice with Et<sub>2</sub>O (2 × 50 mL) and finally freeze-dried. Half of the crude batch was dissolved in 0.1% aq. TFA (25 mL) and purified by flash-column chromatography on SiO<sub>2</sub>@C<sub>18</sub> (70 g, bed size: 40 × 90 mm) with a step gradient of MeCN in 0.1% aq. TFA from 0% to 15%. The product was lyophilized to give TFA salt of **57** as dark blue amorphous powder in 12% yield (160 mg, 0.23 mmol).

Analytical data were found to be identical to literature data (Mujumdar *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 4 (1993), 105-111).



**JMV594-PEG<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>, 58**



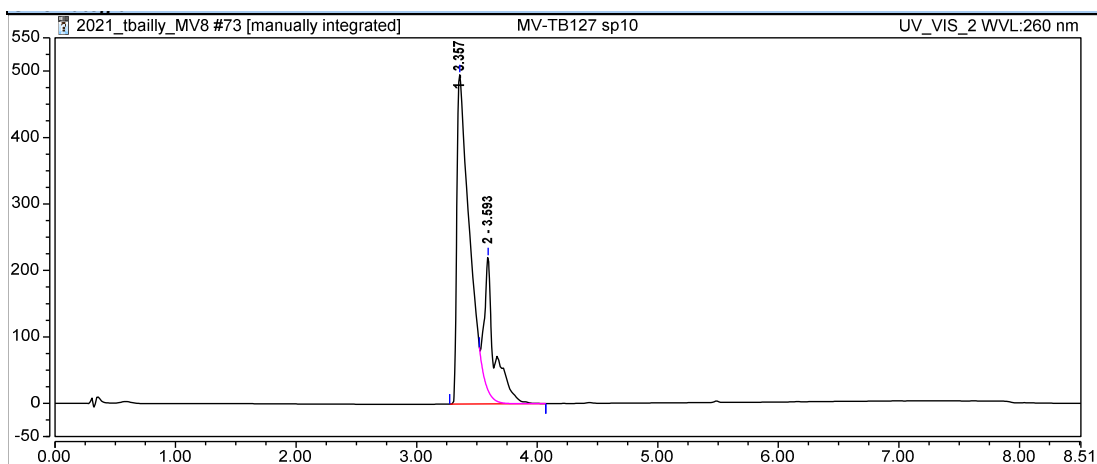
The synthesis of **58** was carried out on a Fmoc-Rink Amide AM resin (100 mg, 0.48 mmol/g, 75-150  $\mu\text{m}$ , Iris Biotech) with an automated peptide synthesizer Liberty Blue (CEM). Amino acids were activated with DIC/Oxyma Pure. Fmoc-protected amino acids were deprotected with 20% v/v peptide grade piperidine (Iris Biotech) solution in peptide grade DMF (Carlo Erba). The amino acid sequence of JMV594 (H-DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH<sub>2</sub>) was extended with Fmoc-PEG<sub>4</sub>-COOH (added to the sequence by manual coupling). After Fmoc deprotection by addition of 20% piperidine in DMF (3 x 3 min), the resin was thoroughly washed, swollen in DMF and drained. The linker (46.8 mg, 0.096 mmol) and HATU (36.5 mg, 0.096 mmol) were both dissolved in a minimum amount of DMF. DIEA (33  $\mu\text{L}$ ) was added to the solution, added on the resin and the mixture was stirred gently for 2 hours at rt. Excess reagents were eliminated by filtration and the peptide resin was washed successively with DMF. Completion of the reaction was determined by a standard TNBS test.

After final Fmoc-removal, the peptide was cleaved from the resin and deprotected using a solution of triisopropylsilane (2%) 2,2'-(ethylenedioxy)diethanethiol (2%) and water (1%) in TFA. After cleavage and deprotection of the side chains, the solution was concentrated and the peptide was precipitated with diethyl ether (4°C). The precipitate was purified by RP-HPLC giving a white solid in 34 % yield (22.5 mg, 0.017 mmol).

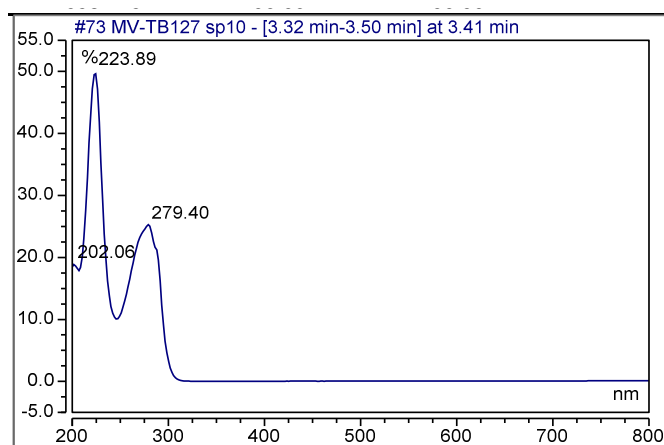
**HPLC:** retention time = 3.36 min, purity = 0.76,  $\lambda_{\text{max}}$  = 224, 279 nm

**LRMS:** [M+2H]<sup>2+</sup>: m/z = 681.4 (calcd. for C<sub>66</sub>H<sub>103</sub>N<sub>15</sub>O<sub>16</sub> : 680.8)

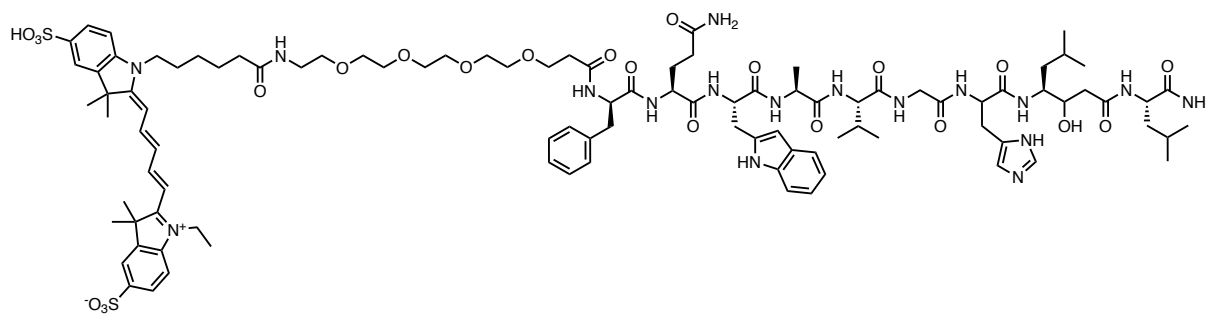
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:



**Cy5-PEG<sub>4</sub>-JMV594, **59****



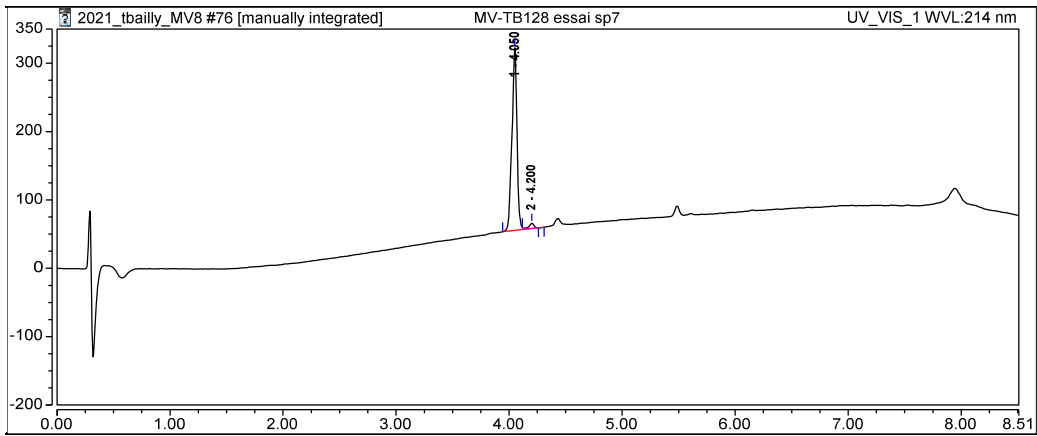
HATU (0.6 mg, 0.0015 mmol), **58** (2 mg, 0.0015 mmol) and DIEA (2  $\mu$ L) were added to a solution of **57** (1 mg, 0.0015 mmol) in DMF (0.2 mL). The solution was stirred at 25 °C for 1 h, the crude was purified by RP-HPLC to give **59** (2.35 mg, 0.0010 mmol) in 69 % yield.

**HPLC:** *retention time* = 4.05 min, *purity* = 0.97,  $\lambda_{max}$  = 648 nm

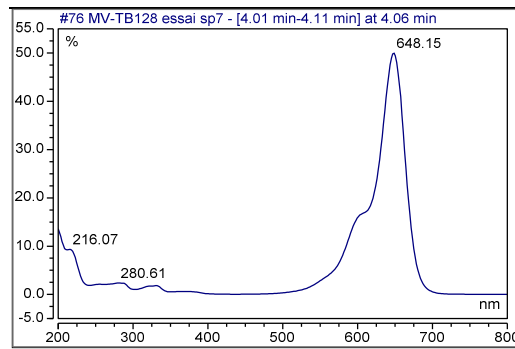
**LRMS:**  $[M+2H]^{2+}$ :  $m/z$  = 1000.6 (calcd. for C<sub>99</sub>H<sub>139</sub>N<sub>17</sub>O<sub>23</sub>S<sub>2</sub> : 1000.0)

**HRMS:**  $[M+2H]^{2+}$ :  $m/z$  = 999.98973 (calcd. for C<sub>99</sub>H<sub>139</sub>N<sub>17</sub>O<sub>23</sub>S<sub>2</sub> : 999.99083)

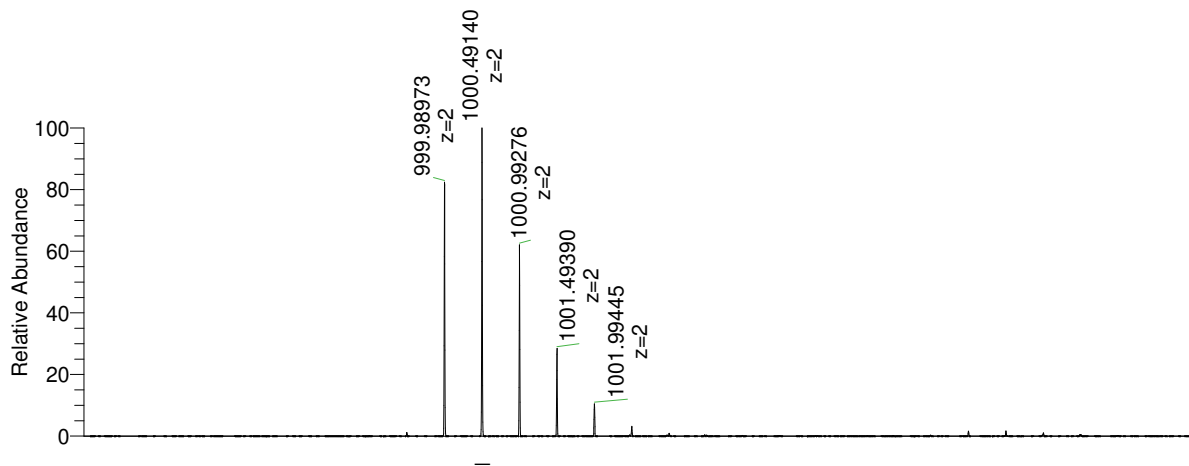
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum :

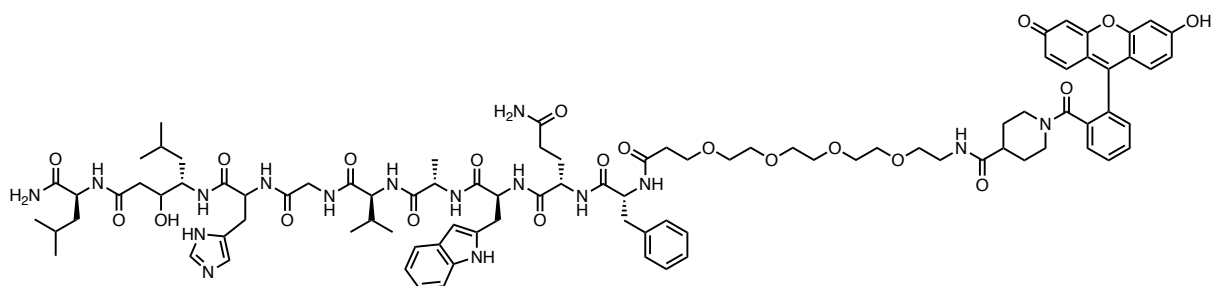


HRMS spectrum :





**JMV594-PEG<sub>4</sub>-Fluorescein, 60**



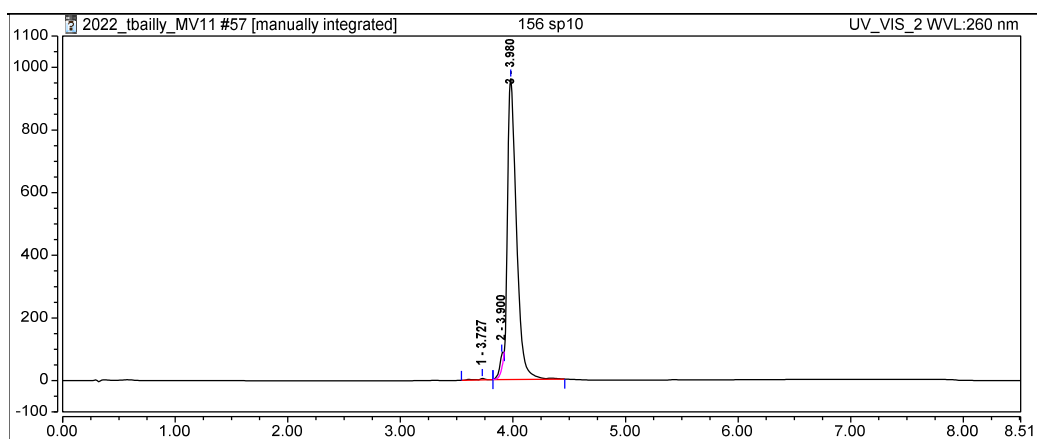
*N*-hydroxysuccinimide (3.5 mg, 0.03 mmol) and DIC (4.5  $\mu$ L, 0.03 mmol) were added to a solution of fluorescein isonipecotic acid (3.0 mg, 0.007 mmol) in DMF (0.5 mL). The solution was stirred at 50 °C. After the formation of the NHS-ester (monitored by HPLC-MS, 2 h), a solution of **58** (11.5 mg, 0.007 mmol) and DIEA (5.0  $\mu$ L) in water and acetonitrile (50:50, 1 mL) was added dropwise to the reaction mixture that was left to stir at rt for 10 h. The crude was then directly purified by RP-HPLC to give the desired product as an orange powder in 52 % yield (6.7 mg, 0.035 mmol).

**HPLC:** *retention time* = 3.98 min, *purity* = 0.98,  $\lambda_{max}$  = 230, 453 nm

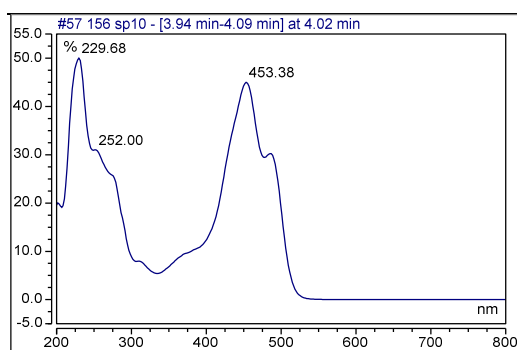
**LRMS:**  $[M+2H]^{2+}$ : *m/z* = 893.2 (calcd. for C<sub>92</sub>H<sub>122</sub>N<sub>16</sub>O<sub>21</sub> : 893.4)

**HRMS:**  $[M+2H]^{2+}$ : *m/z* = 893.44824 (calcd. for C<sub>92</sub>H<sub>122</sub>N<sub>16</sub>O<sub>21</sub> : 893.44797)

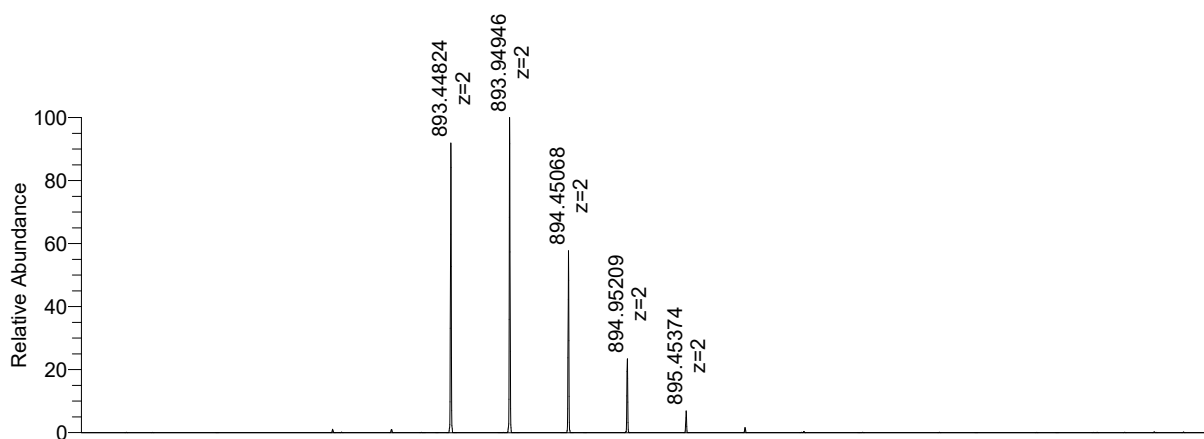
HPLC chromatogram:



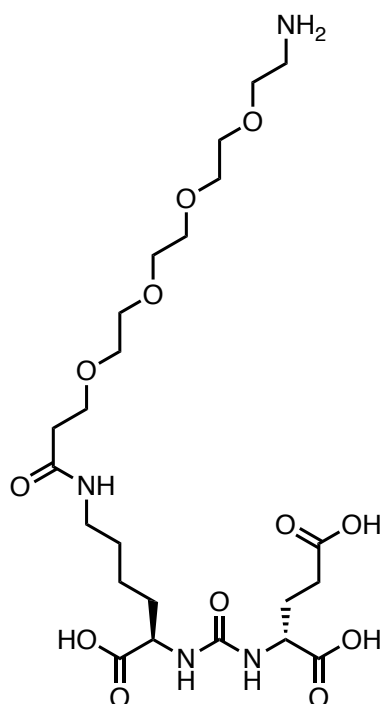
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*KuE*-PEG<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>, **61**

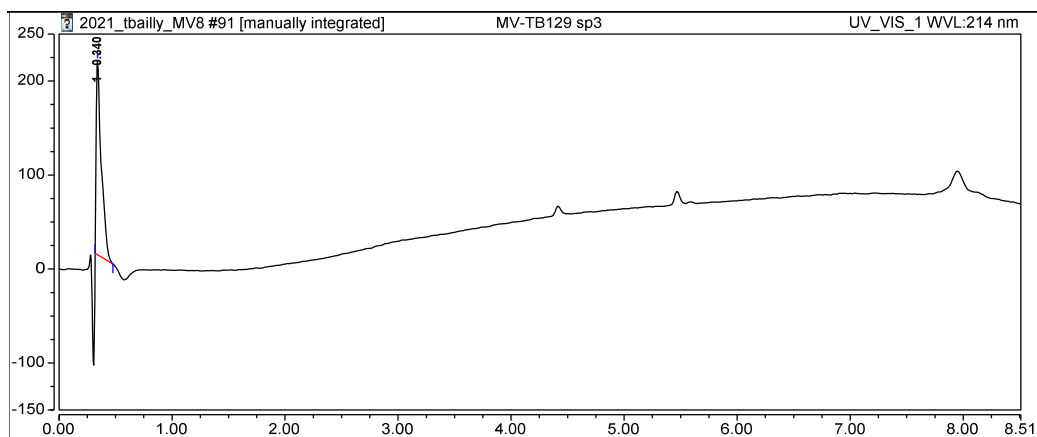


KuE(tBu)<sub>3</sub> (16 mg, 0.033 mmol) was added to a solution of Fmoc-PEG<sub>4</sub>-COOH (15.2 mg, 0.031 mmol) and HATU (15.2 mg, 0.031 mmol) in DMF (1 mL). DIPEA (18  $\mu$ L, 0.098 mmol) was added to the reaction mixture that was left to stir at room temperature. After completion of the reaction (follow-up by HPLC-MS, 1h), the crude was purified by RP-HPLC. Solvents were removed under reduced pressure. The resulting white solid was dissolved in TFA (1 mL) and stirred at rt until completion of the reaction (follow-up by HPLC-MS, 0.5h). The crude was diluted in ultrapure water (18.2 M $\Omega$ ) and lyophilized to give a white powder. The latter was then dissolved in DCM (2 mL) to which diethylamine (2 mL) was added. The solution was stirred at rt for 1 h. After evaporation of the solvents, the crude was finally purified by RP-HPLC to give the product as a yellowish oil (8 mg, 0.014 mmol) in 45 % yield.

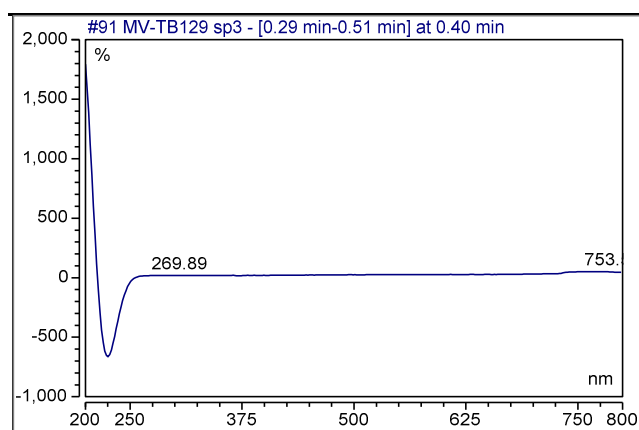
**HPLC:** *retention time* = 0.34 min, *purity* = > 0.99,  $\lambda_{max}$  = 200 nm

**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup>: *m/z* = 567.5 (calcd. for C<sub>23</sub>H<sub>43</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub> : 567.3)

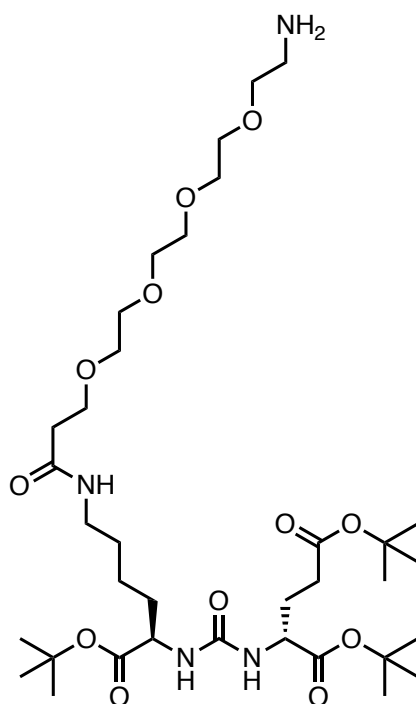
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:



*KuE(tBu)<sub>3</sub>-PEG<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>*, **62**



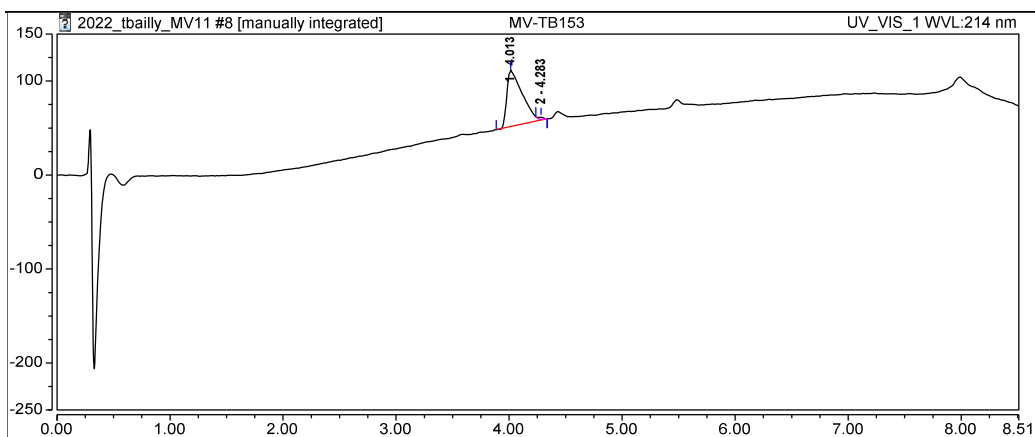
*KuE(tBu)<sub>3</sub>* (37 mg, 0.076 mmol) was added to a solution of Fmoc-PEG<sub>4</sub>-COOH (35 mg, 0.072 mmol) and HATU (27 mg, 0.072 mmol) in DMF (1 mL). DIEA (40  $\mu$ L, 0.228 mmol) was added to the reaction mixture that was left to stir at room temperature. After completion of the reaction (follow-up by HPLC-MS, 1h), the crude was purified by RP-HPLC and lyophilized to give a white powder. The latter was then dissolved in DCM (2 mL) to which diethylamine (2 mL) was added. The solution was stirred at rt until for 1 h. After evaporation of the solvents, the crude was finally purified by RP-HPLC to give the product as a white powder (40 mg, 0.054 mmol) in 75 % yield.

**HPLC:** *retention time* = 4.01 min, *purity* = 0.99,  $\lambda_{max}$  = 200 nm

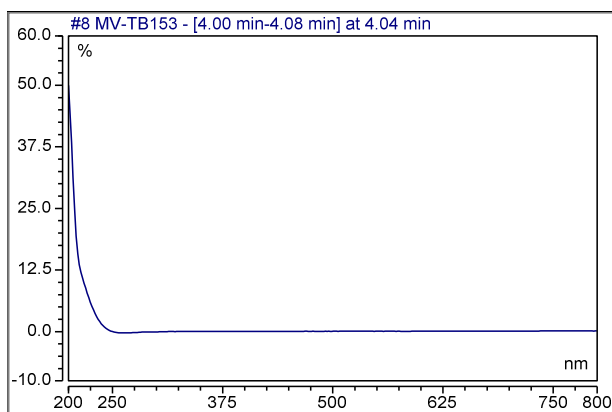
**LRMS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z$  = 736.0 (calcd. for C<sub>35</sub>H<sub>67</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub> : 735.5)

**HRMS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z$  = 735.47506 (calcd. for C<sub>35</sub>H<sub>67</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub> : 735.47500)

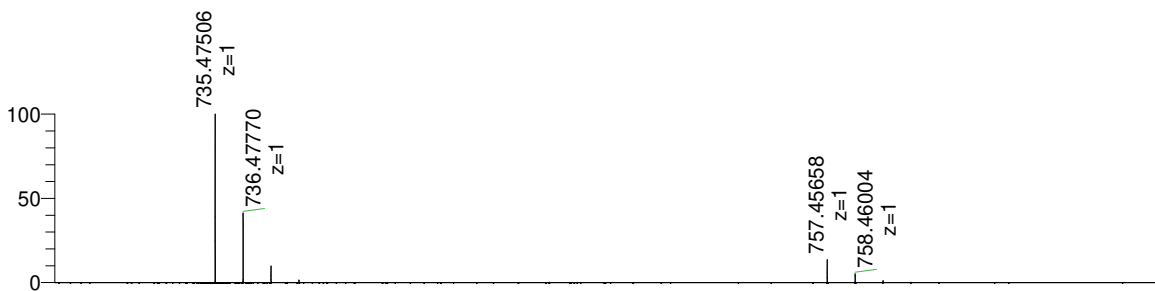
HPLC chromatogram:



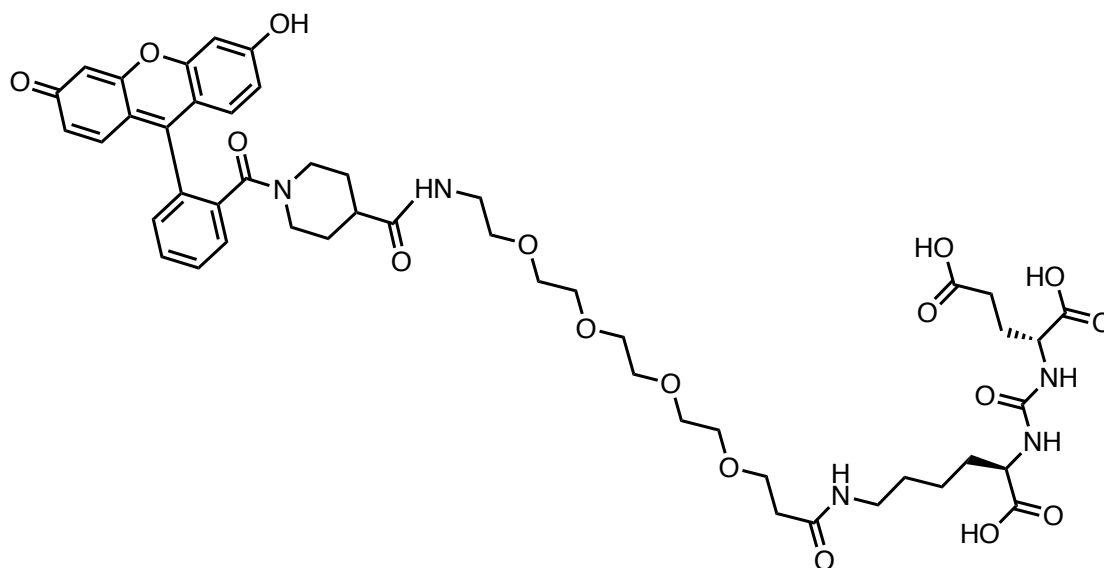
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*KuE-PEG<sub>4</sub>-Fluorescein, 63*



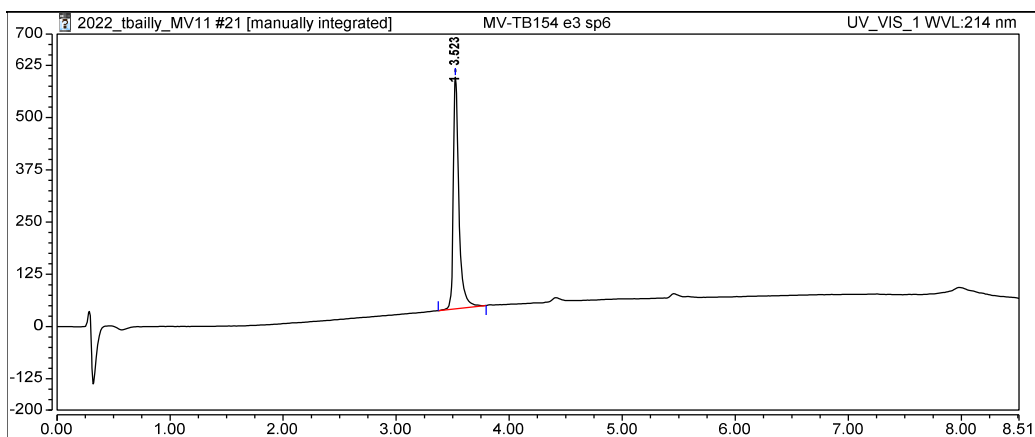
*N*-hydroxysuccinimide (17.5 mg, 0.152 mmol) and DIC (22.5  $\mu$ L, 0.146 mmol) were added to a solution of fluorescein isonipectic acid (15 mg, 0.034 mmol) in DMF (0.5 mL). The solution was stirred at 50  $^{\circ}$ C until complete formation of the NHS-ester (monitored by HPLC-MS, 2 h). A solution of **62** (24.9 mg, 0.034 mmol) and DIEA (5.0  $\mu$ L) in water and acetonitrile (50:50, 1 mL) was dropwisely added to the reaction mixture that was left to stir at rt for 10 h. The crude was then directly purified by RP-HPLC. The resulting orange powder was then stirred in TFA (1 mL) for 1 h at rt. After evaporation of the acid, the crude was purified by RP-HPLC to give the desired product as an orange powder in 14 % yield (5.2 mg, 0.048 mmol).

**HPLC:** retention time = 3.52 min, purity = > 0.99,  $\lambda_{max}$  = 231, 450 nm

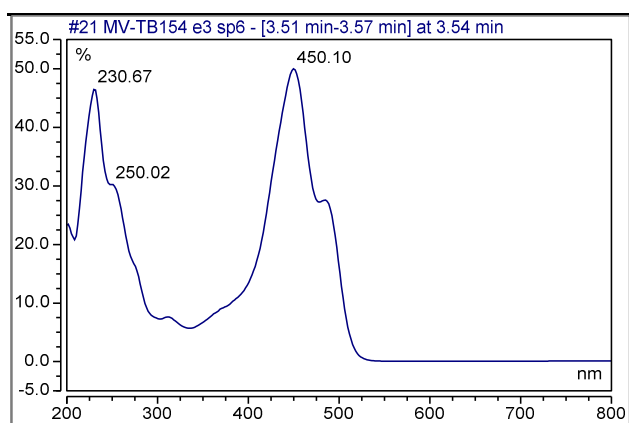
**LRMS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z$  = 993.0 (calcd. for  $C_{49}H_{62}N_5O_{17}$  : 992.4)

**HRMS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z$  = 992.41321 (calcd. for  $C_{49}H_{62}N_5O_{17}$  : 992.41352)

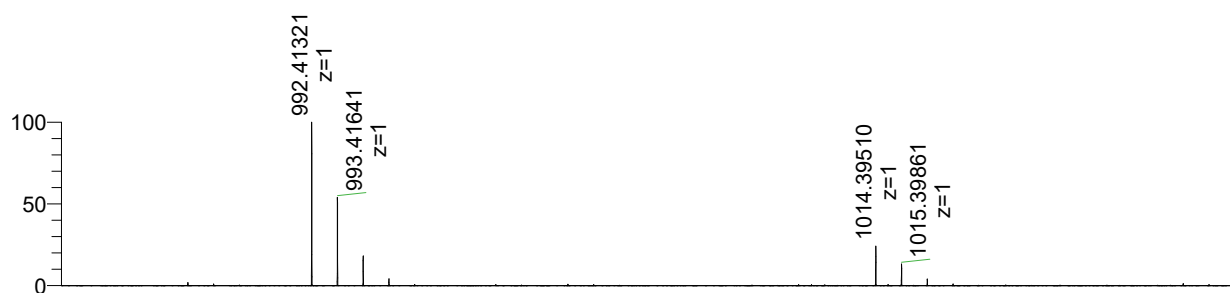
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:

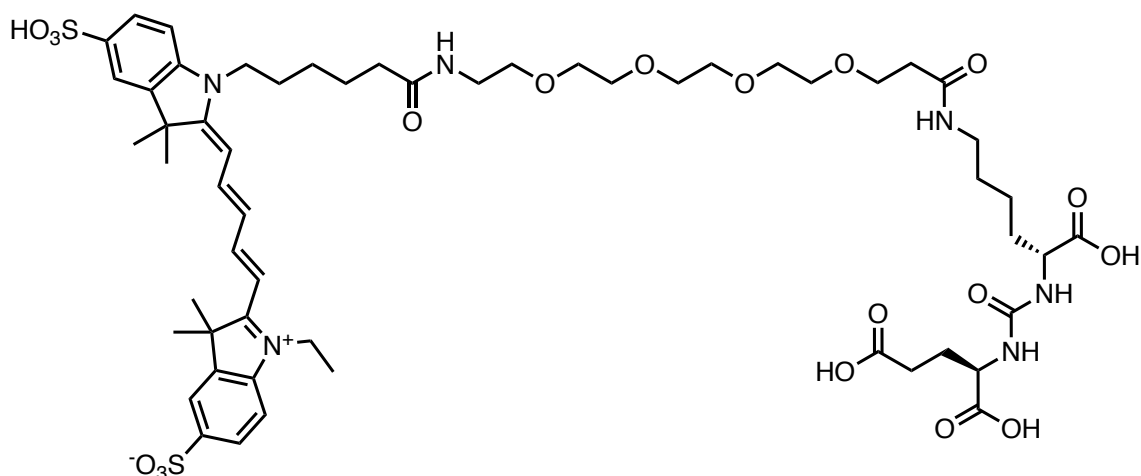


HRMS spectrum:





*KuE-PEG<sub>4</sub>-Fluorescein, 64*



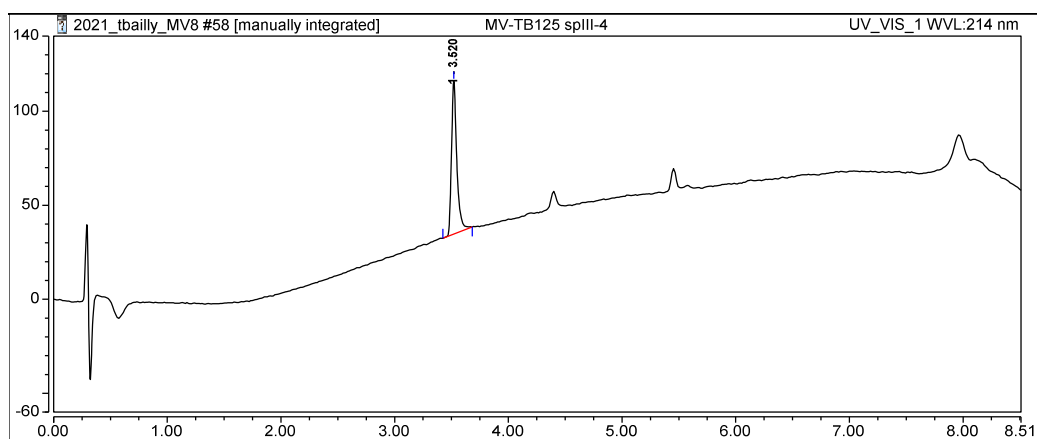
TSTU (5 mg, 0.008 mmol) was added to a solution of **57** (5 mg, 0.008 mmol) in DMF (1 mL). The reaction mixture was stirred until completion (follow-up by HPLC-MS, 1 h). **61** (3.6 mg, 0.006 mmol) was added to the reaction mixture that was stirred for 2 h at rt. The crude was then purified by RP-HPLC to give **64** (2.85 mg, 0.002 mmol) in 39% yield.

**HPLC:** *retention time* = 3.52 min, *purity* = > 0.99,  $\lambda_{max}$  = 647 nm

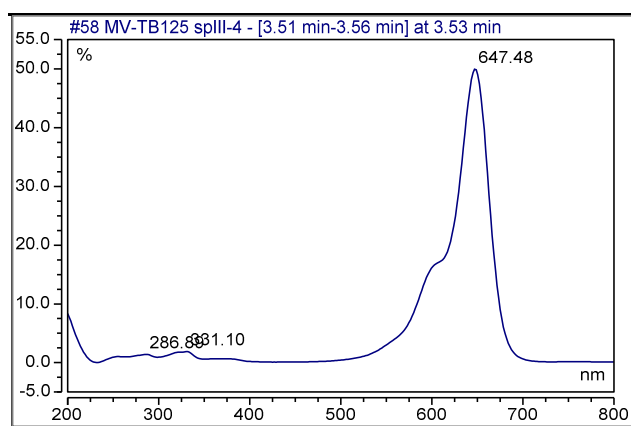
**LRMS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z$  = 1206.2 (calcd. for  $C_{51}H_{81}N_6O_{12}S_2$  : 1205.5)

**HRMS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z$  = 1205.49913 (calcd. for  $C_{51}H_{81}N_6O_{12}S_2$  : 1205.49924)

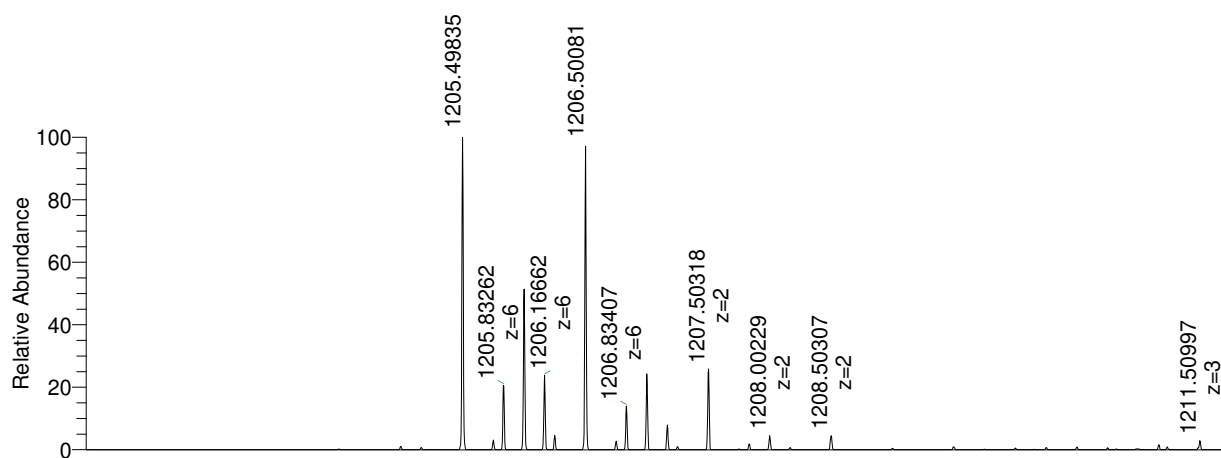
HPLC chromatogram:



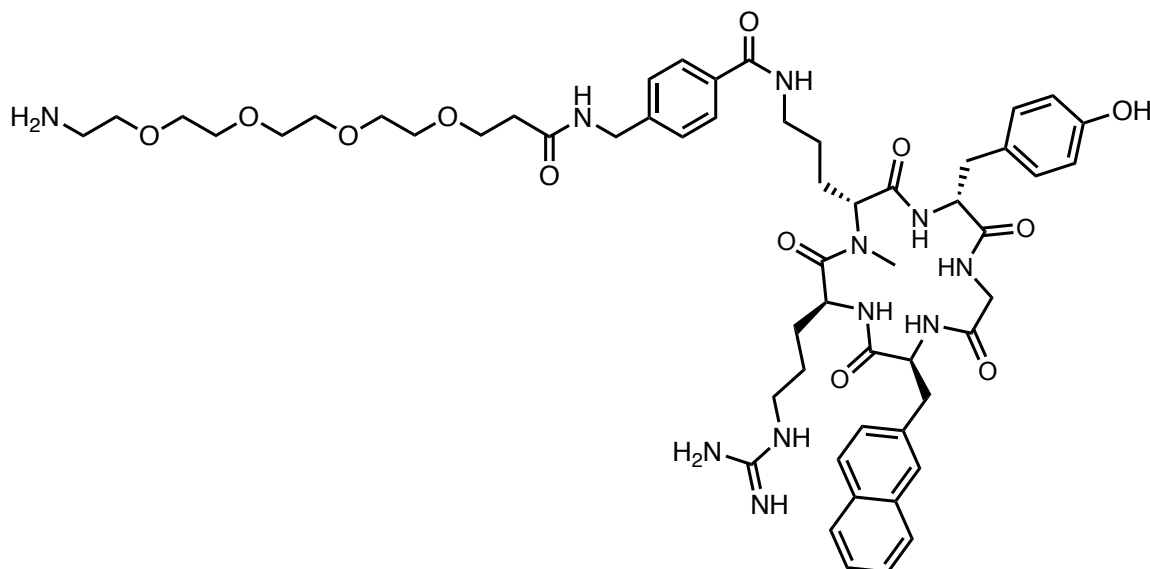
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*[N-Me-D-Orn<sup>2</sup>]FC131-PEG<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>, 65*



**34** (25 mg, 0.024 mmol) was added to a solution of 4-(Fmoc-aminomethyl)benzoic acid (11 mg, 0.029 mmol), DIEA (0.017 mL, 0.098 mmol) and HATU (10 mg, 0.027 mmol) in DMF (1.5 mL). The reaction mixture was stirred at rt until completion of the reaction (follow-up by HPLC-MS, 0.5 h). DMF was evaporated under reduced pressure, and the peptide was precipitated in cold water and used without further purification (21 mg, 0.015 mmol, 62 % yield).

**LRMS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 1366.6$  (calcd. for  $C_{76}H_{89}N_{10}O_{12}S$ : 1366.7)

The previously precipitated peptide (21 mg, 0.015 mmol) was solubilized in a solution of piperidine (25 % v/v in DMF) and stirred at rt until completion of the reaction (follow-up by HPLC-MS, 0.5 h). The crude was concentrated under reduced pressure and directly poured in a solution of Boc-PEG<sub>4</sub>-COOH (8.6 mg, 0.018 mmol), HATU (7.2 mg, 0.018 mmol) and DIEA (0.01 mL, 0.062 mmol) in DMF previously stirred at room temperature for 15 min. After 1 h, the peptide was precipitated in ether (4 °C, 3 × 15 mL). After lyophilisation the PEGylated product was obtained as a white solid (22.4 mg, 0.015 mmol) in 95% yield.

**HPLC:** retention time = 5.17 min,  $\lambda_{max} = 225$  nm

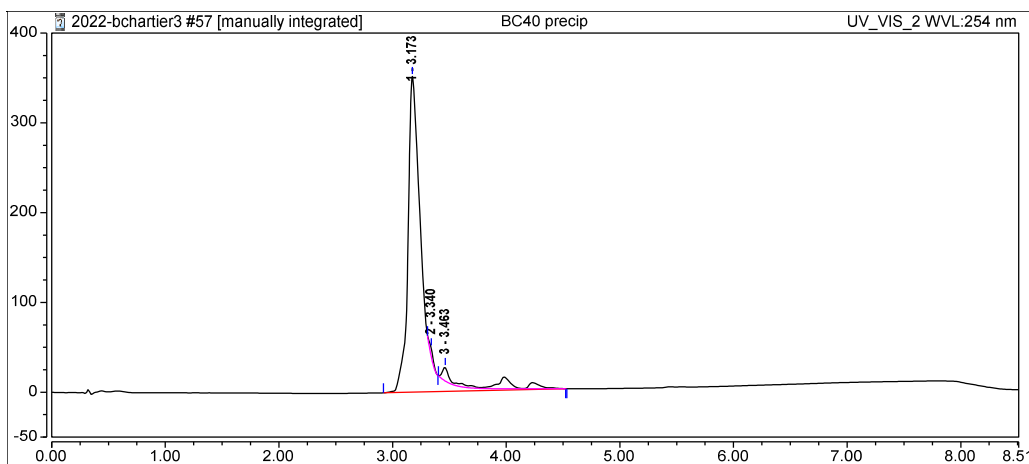
**LRMS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 1491.7$  (calcd. for  $C_{77}H_{108}N_{11}O_{17}S$ : 1491.8)

The protected peptide (22.4 mg, 0.015 mmol) was solubilized in a solution of TFA:TIS:H<sub>2</sub>O (48:1:1) and stirred until completion of the reaction (1h monitored by LC-MS). The volatiles were removed under a gentle flow of N<sub>2</sub> and the crude was dissolved in a minimum amount of DMF and precipitated with cold ether 3 times. **65** (16.3 mg, 0.013 mmol) was isolated as a white solid in 51% yield over 4 steps.

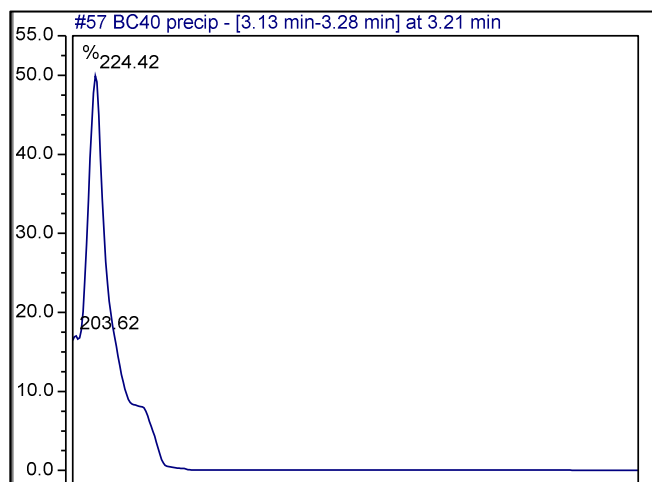
**HPLC:** retention time = 3.17 min, purity = 0.92,  $\lambda_{max} = 225$  nm

**LRMS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 541.3$   $[M+2H]^{2+}$  (calcd for  $C_{56}H_{55}N_{11}O_{12}$ : 540.8)

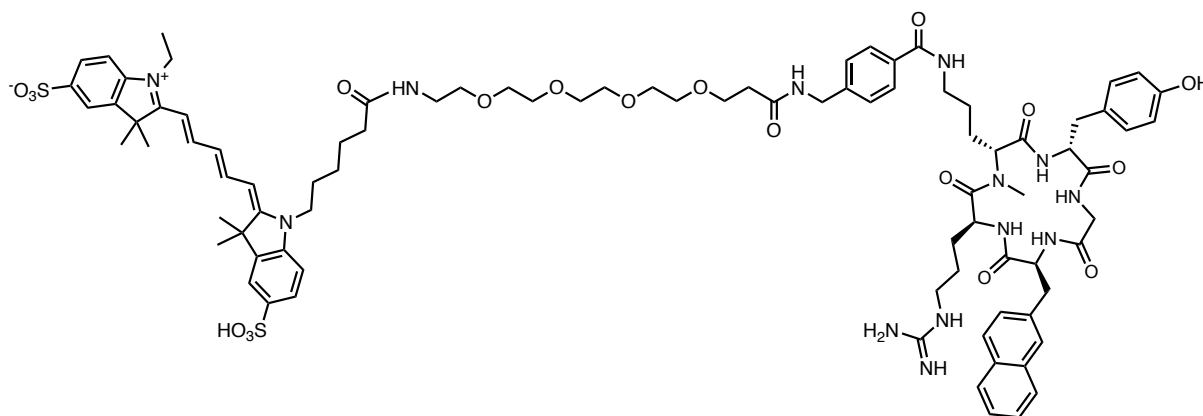
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:



**[N-Me-D-Orn<sup>2</sup>]FC131-PEG<sub>4</sub>-Cy5, 66**



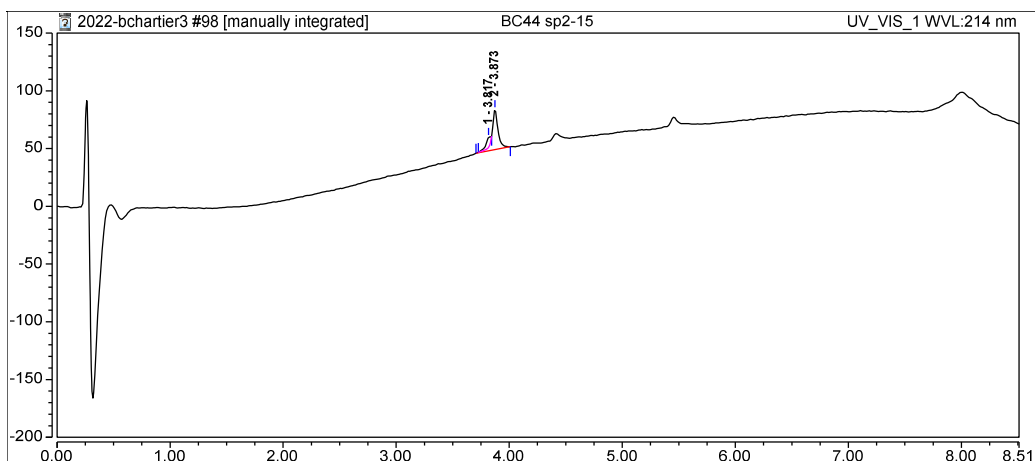
TSTU (4.3 mg, 0.014 mmol) and **57** (11.0 mg, 0.014 mmol) were dissolved in DMF (1 mL). DIEA was then added, and the reaction was stirred at room temperature until completion (follow-up by HPLC-MS, 2 h). The activated cyanine was directly used for the next reaction. **65** (14 mg, 0.013 mmol) was then added to the reaction mixture that was stirred at room temperature until completion of the reaction (follow-up by HPLC-MS, 1 h). The crude was directly purified by RP-HPLC and lyophilized to give the desired compound **66** as a deep blue powder (8.1 mg, 0.005 mmol) in 36 % yield.

**HPLC:** retention time = 3.87 min, purity = 0.85,  $\lambda_{max}$  = 648 nm

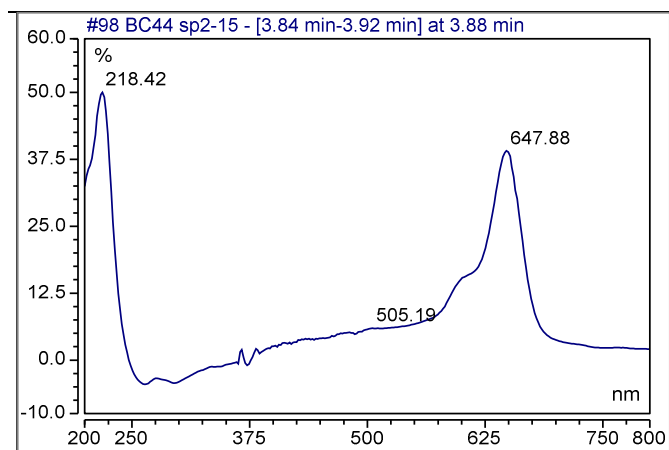
**LRMS:**  $[M+2H]^{2+}$ :  $m/z$  = 861.8 (calcd for C<sub>88</sub>H<sub>115</sub>N<sub>13</sub>O<sub>19</sub>S<sub>2</sub> 860.9)

**HRMS:**  $[M+H+Na]^{2+}$ :  $m/z$  = 871.88391 (calcd for C<sub>88</sub>H<sub>115</sub>N<sub>13</sub>O<sub>19</sub>S<sub>2</sub> 871.88410)

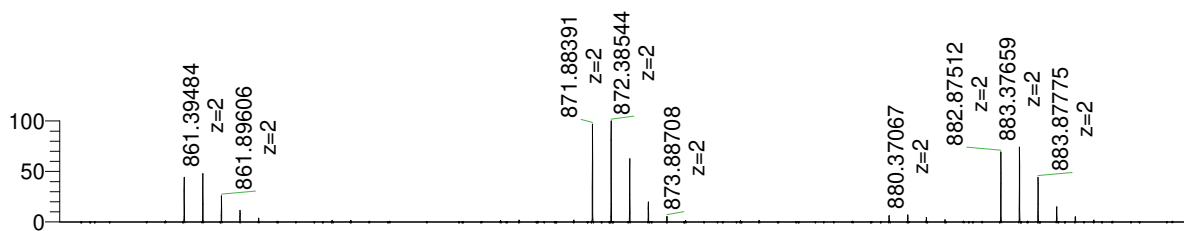
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:

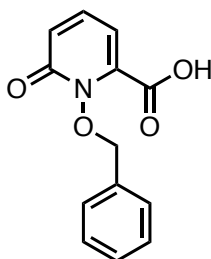


HRMS spectrum:



#### 4. Chapter IV – compounds **67** to **84**

*1-(benzyloxy)-6-oxo-1,6-dihydropyridine-2-carboxylic acid* (1,2-HOPOBn, **67**)



Acetic anhydride (23 mL) was mixed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (8 mL, 30 % in water) in an ice bath and stirred for 4 h until the formation of peracetic acid. The resulting solution was slowly added to a solution of 6-hydroxy-picolinic acid (5.155 g, 35.21 mmol) in a mixture of TFA (40 mL) and acetic acid (27.5 mL). The mixture was stirred for 1 h, slowly heated to 80 °C and kept at 80 °C for 10 h. A white precipitate formed. It was filtered, washed with cold methanol and dried in an oven. The solid was then dissolved in an aqueous solution of KOH 10 % and heated to 80 °C for 6 h. Concentrated HCl was added until a white solid precipitates. The product was filtered, washed with water and dried to 1,2-HOPO as a white powder in 65 % yield (3.53 g, 22.7 mmol).

**HPLC:** *retention time* = 0.84 min, *purity* = 0.98,  $\lambda_{\text{max}}$  = 226, 324 nm

**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup>: *m/z* = 156.1 (calcd for C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>NO<sub>4</sub>: 156.0)

**HRMS:** [M+H]<sup>+</sup>: *m/z* = 154.01405 (calcd for C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>NO<sub>4</sub>: 154.01458)

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ (ppm) 7.45 (dd, *J* = 9.0, 7.0 Hz, 1H), 6.72 (dd, *J* = 9.1, 1.7 Hz, 1H), 6.64 (dd, *J* = 7.0, 1.7 Hz, 1H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 161.8, 157.1, 138.9, 136.7, 120.3, 106.4

1,2-HOPO was solubilized in methanol (70 mL) and potassium carbonate (12.3 g, 88.1 mmol) and benzyl bromide (15.0 g, 87.3 mmol) were added to the solution. The mixture was stirred under reflux for 16 h. The reaction mixture was then cooled to room temperature and filtered. The filtrate was evaporated under reduced pressure. The resulting solid was solubilized in water and HCl (6 M) was added to the solution until precipitation of the product (pH = 2). After filtration, the solid was washed with cold dichloromethane. The resulting powder was dried in an oven to give **67** in 89 % yield as a white powder (4.95 g, 20.2 mmol).

**HPLC:** *retention time* = 0.84 min, *purity* = > 0.99,  $\lambda_{\text{max}}$  = 217, 306 nm

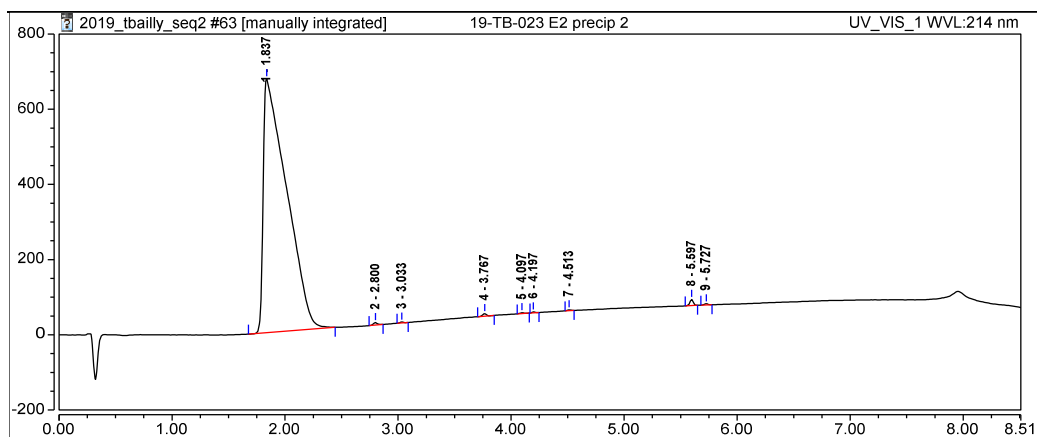
**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup>: *m/z* = 246.2 (calcd for C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>4</sub>: 246.1)

**HRMS:** [M+Na]<sup>+</sup>: *m/z* = 268.05755 (calcd for C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>NO<sub>4</sub>: 268.05803)

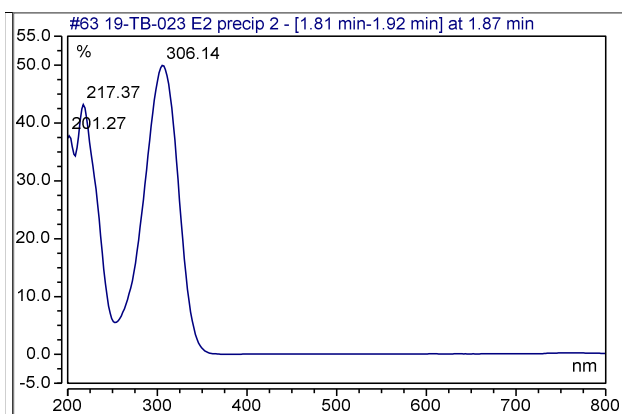
**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 7.52 - 7.45 (m, 3H), 7.41 (m, 3H), 6.73 (dd, *J* = 9.3, 1.7 Hz, 1H), 6.56 (dd, *J* = 6.8, 1.7 Hz, 1H), 5.28 (s, 2H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 161.7, 157.7, 140.5, 138.7, 133.9, 129.6, 129.1, 128.5, 124.1, 106.0, 77.9

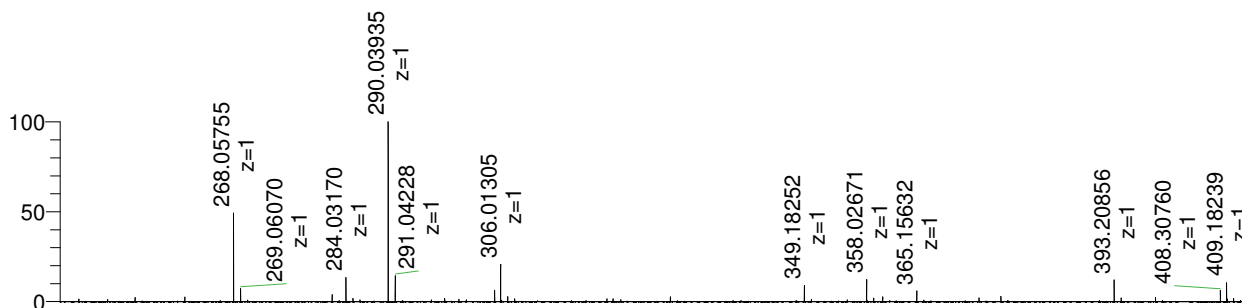
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:

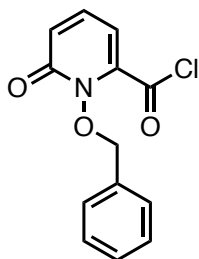


HRMS spectrum:





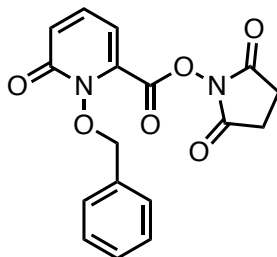
*1-(benzyloxy)-6-oxo-1,6-dihydropyridine-2-carbonyl chloride* (1,2-HOPOBn acyl chloride), **68**



Oxalyl chloride (1.5 mL, 2.18 g, 16.9 mmol) was carefully added to a suspension of **67** (2.09 g, 8.44 mmol) in toluene (50 mL) under argon atmosphere. After addition of a drop of DMF in the reaction mixture, a gas evolution was observed, and the reaction mixture was heated at 80 °C for 3 h. The mixture was purified through a SiO<sub>2</sub> plug, with THF as eluent, yielding **68** as a yellow oil in 31% yield (0.69 g, 2.6 mmol).



*2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 1-(benzyloxy)-6-oxo-1,6-dihydropyridine-2-carboxylate (HOPOBn-NHS), 69*

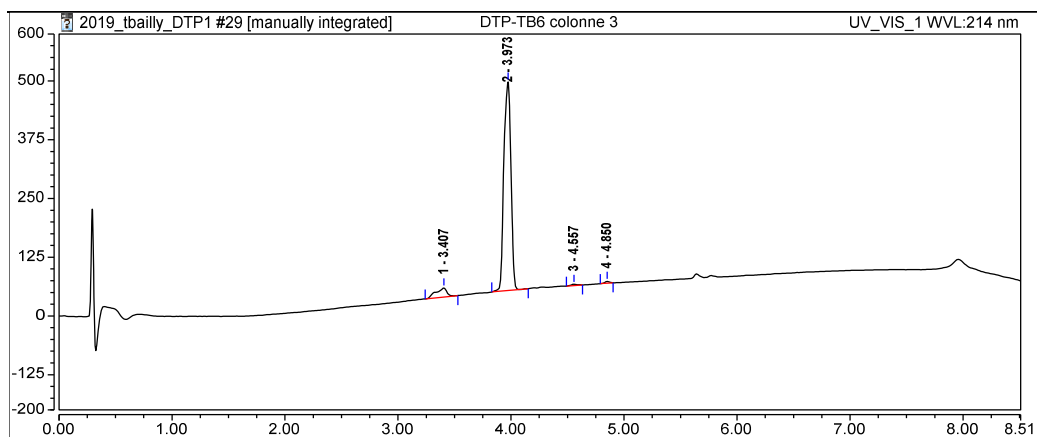


A solution of TSTU (405 mg, 1.34 mmol) in acetonitrile (6 mL) was added to a suspension of HOPOBn acid **2** (300 mg, 1.22 mmol) in acetonitrile (6 mL). The mixture became clear after addition of DIPEA (174 mg, 1.34 mmol, 0.234 mL). The reaction media was stirred at RT for 1 h. The product was purified by RP-HPLC (C18) yielding to **69** as a white powder in 35% yield (148 mg, 0.432 mmol).

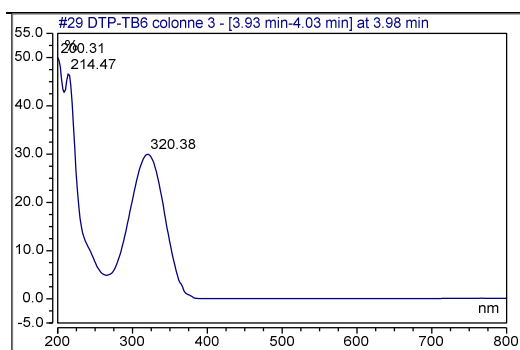
**HPLC:** *retention time* = 3.96 min, *purity* = 0.94,  $\lambda_{\text{max}}$  = 320 nm

**LRMS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z$  = 343.1 (calcd for  $C_{36}H_{73}N_8O_8$ : 343.1)

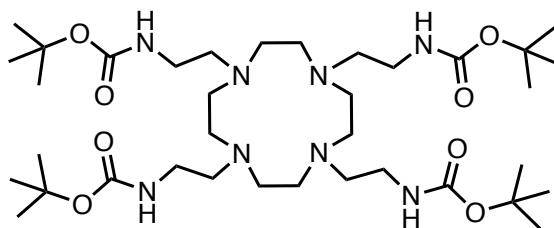
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:



*tetra-tert-butyl* ((1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl)tetrakis(ethane-2,1-diyl))tetracarbamate, (*N*-Boc protected TEA-cyclen), **70**



*N*-Boc-2-bromoethylamine (1.72 g, 7.68 mmol) was added to a solution of cyclen (0.30 g, 1.76 mmol) and potassium carbonate (1.93 g, 13.9 mmol) in acetonitrile (15 mL), and the solution was stirred at 65 °C for 7 h. The reaction was monitored by RP-HPLC-MS. After completion, the solvent was evaporated under reduced pressure and the product was purified by flash chromatography (SiO<sub>2</sub>, eluents: DCM/Methanol) to give **70** in 64% yield as a colorless oil (841 mg, 1.13 mmol)

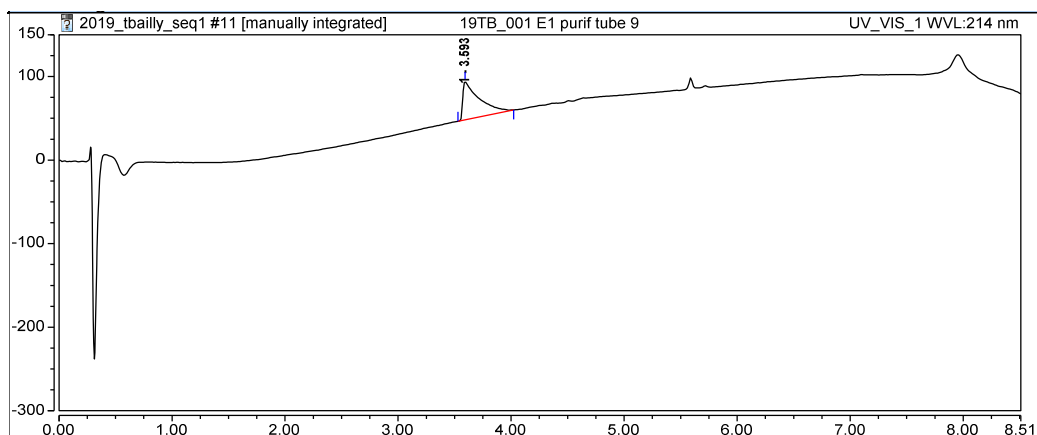
**HPLC:** *retention time* = 3.86 min, *purity* = > 0.99

**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup>: *m/z* = 745.5 (calcd for C<sub>36</sub>H<sub>73</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub>: 745.6)

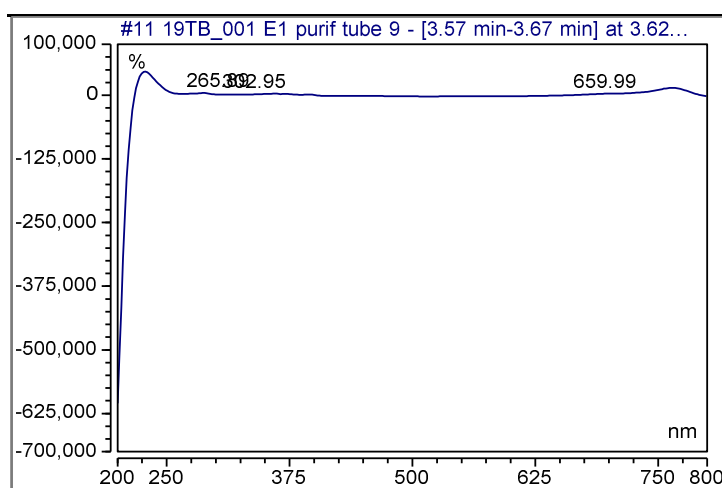
**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) 1.43 (s, 36H), 2.48 (s, 8H), 2.61 (s, 16H), 3.20 (m, 8H), 5.92 (m, 4H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) 155.9, 78.9, 54.4, 53.9, 54.4, 28.5

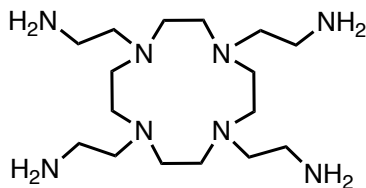
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:



**2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl)tetrakis(ethan-1-amine) (TEA cyclen), **71****



TFA (10 mL) was added to a solution of **70** (841 mg, 1.13 mmol) in DCM (10 mL). The solution was stirred at rt. After completion of the reaction (follow-up by HPLC-MS, 2 h), DCM and TFA were evaporated under reduced pressure and the product was lyophilized to give **71** as a TFA salt in 98% yield (1.27 g, 1.11 mmol).

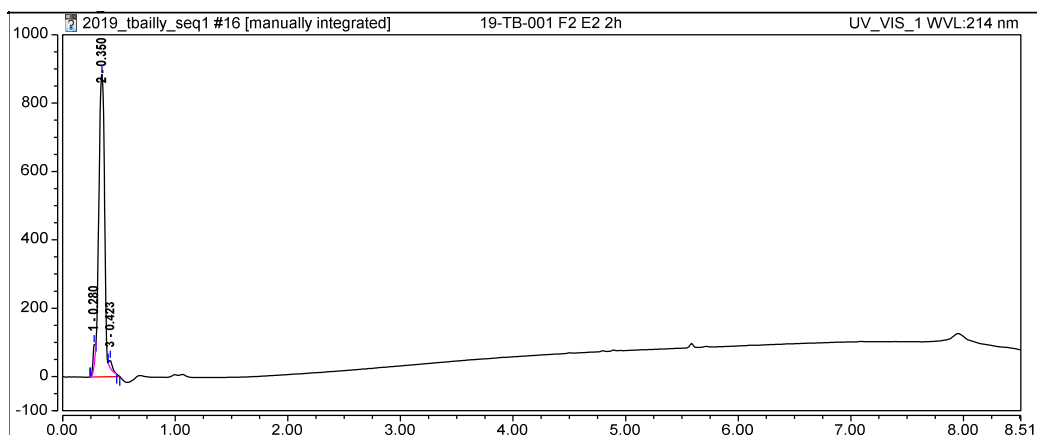
**HPLC:** *retention time* = 0.35 min, *purity* = 0.96,  $\lambda_{\text{max}}$  = 219 nm

**LRMS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z$  = 345.4 (calcd for  $C_{16}H_{41}N_8$ : 345.3)

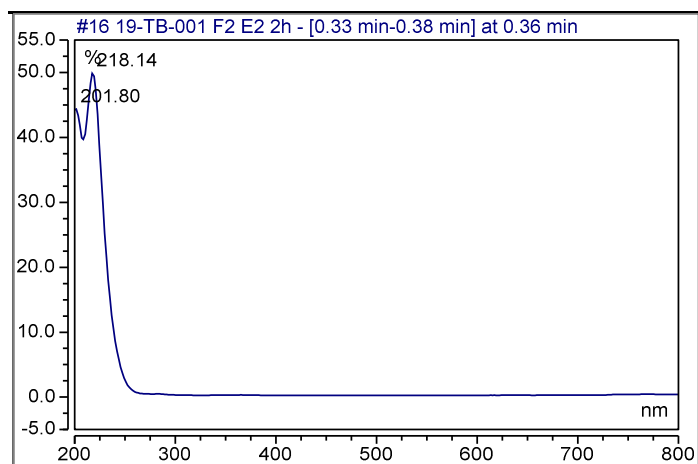
**$^1H$  NMR:** (500 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$ (ppm) 3.35 (s, 16H), 3.27 (s, 16H)

**$^{13}C$  NMR:** (126 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$ (ppm): 49.0, 48.2, 32.6

HPLC chromatogram:

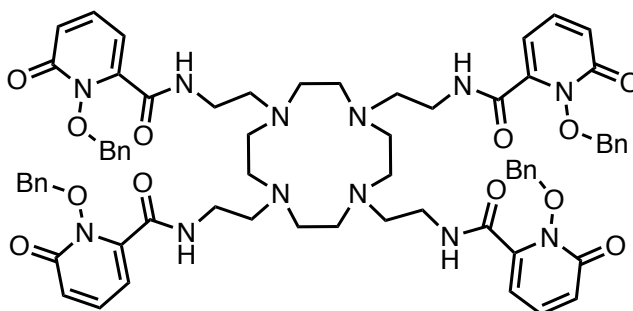


UV-vis absorption spectrum:





*N,N',N'',N'''-((1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl)tetrakis(ethane-2,1-diyl))tetrakis(1-(benzyloxy)-6-oxo-1,6-dihydropyridine-2-carboxamide), (Cy-HOPOBn), 72*



A solution of **68** in THF (10 mL) was added to a solution of **71** (1.8 g, 1.5 mmol) and triethylamine (2.19 g, 21.5 mmol, 3.0 mL) in THF (15 mL) under argon atmosphere. The reaction mixture was heated at 60 °C for 15.5 h. A yellow mixture was obtained, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The resulting yellow residue was dissolved in chloroform and washed with water. The chloroform was evaporated under reduced pressure and the obtained yellow oil was purified by RP-HPLC. **72** was isolated as a yellow oil in 21 % yield (540 mg, 0.31 mmol).

**HPLC:** *retention time* = 3.50 min, *purity* = > 0.99,  $\lambda_{\text{max}}$  = 219, 307 nm

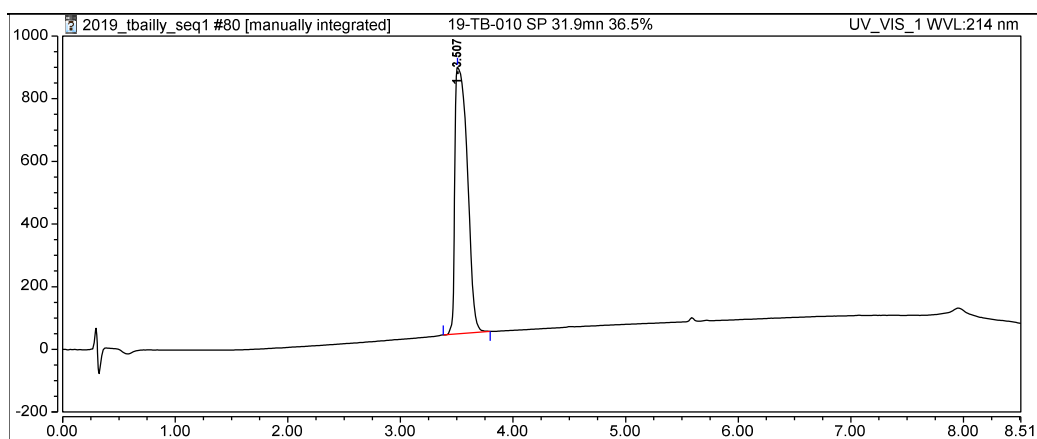
**LRMS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z$  = 1253.8 (calcd for  $C_{68}H_{77}N_{12}O_{12}$ : 1253.6)

**HRMS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z$  = 1253.57718 (calcd for  $C_{68}H_{77}N_{12}O_{12}$ : 1253.57784)

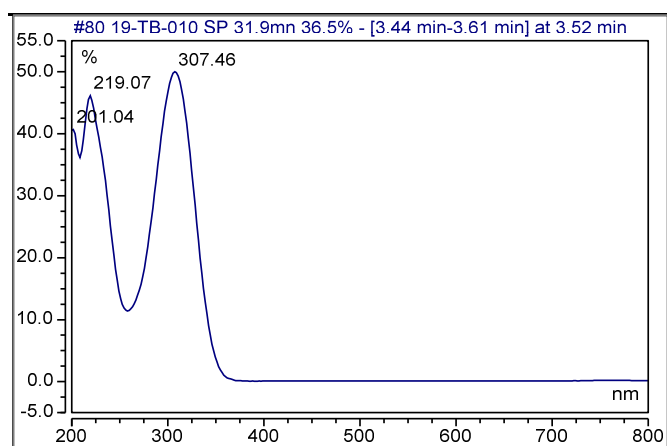
**$^1\text{H}$  NMR:** (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ (ppm) 9.05 (m, 4H), 7.48 – 7.38 (m, 24H), 6.70 – 6.65 (m, 4H), 6.33 – 6.26 (m, 4H), 5.26 (s, 8H), 3.56 – 3.45 (m, 8H), 3.10 (m, 24H)

**$^{13}\text{C}$  NMR:** (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ (ppm) 161.15, 158.14, 143.28, 139.39, 133.92, 130.00, 129.53, 128.90, 123.23, 78.76, 51.51, 34.20

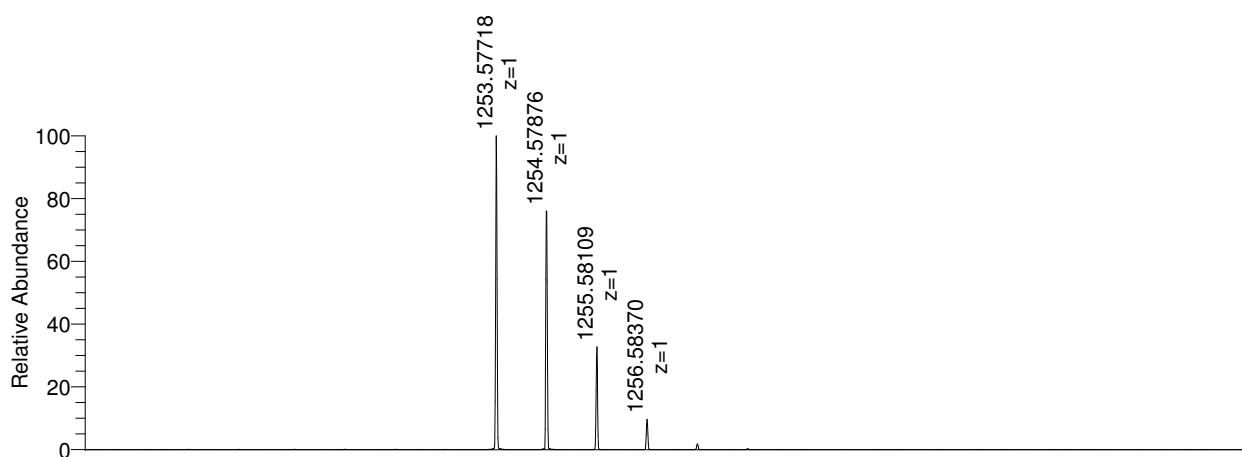
HPLC chromatogram:



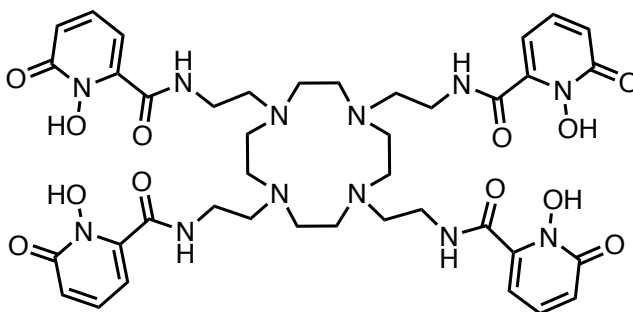
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*N,N',N'',N'''-((1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl)tetrakis(ethane-2,1-diyl))tetrakis(1-hydroxy-6-oxo-1,6-dihydropyridine-2-carboxamide) (Cy-HOPO), 73*



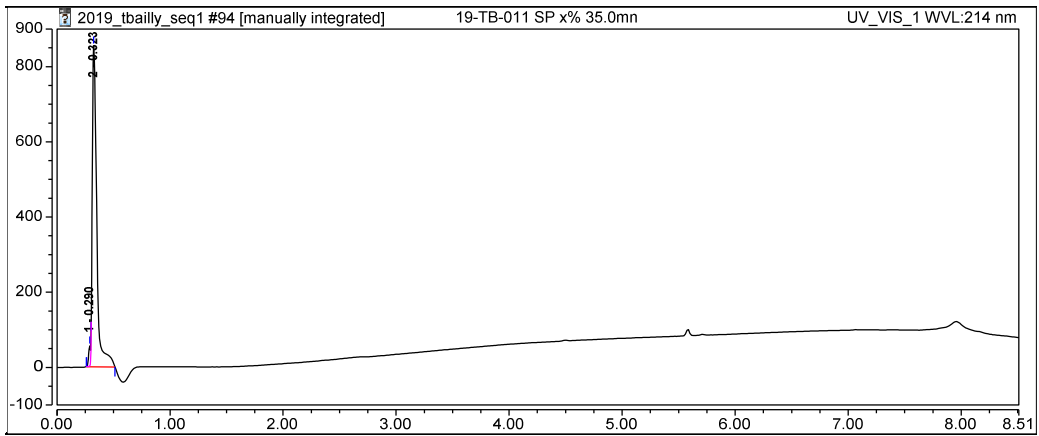
Boron trichloride (0.4 g, 0.3 mmol) was added to a solution of **72** (73 mg, 0.042 mmol) in dichloromethane (3 mL) and the solution was stirred for 2 days at rt. The solvent was evaporated under reduced pressure and the resulting brown oil was purified by RP-HPLC giving **73** as a white powder in 22 % yield (12 mg, 0.009 mmol).

**HPLC:** *retention time* = 0.35 min, *purity* = 0.97,  $\lambda_{\text{max}}$  = 220, 309 nm

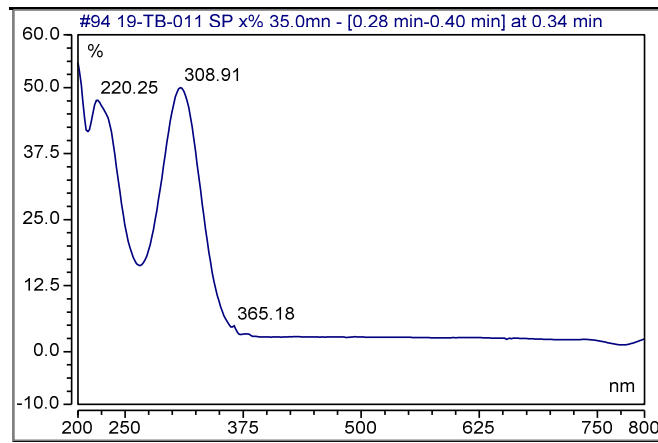
**LRMS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z$  = 893.6 (calcd for  $C_{40}H_{53}N_{12}O_{12}$ : 893.4)

**$^1\text{H NMR}$ :** (500 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$ (ppm) 7.57 (dd,  $J$  = 9.1, 7.1 Hz, 4H), 6.82 (dd,  $J$  = 9.1, 1.6 Hz, 4H), 6.72 (dd,  $J$  = 7.1, 1.6 Hz, 4H), 3.75 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 8H), 3.51 – 3.34 (m, 16H), 3.31 (s, 8H)

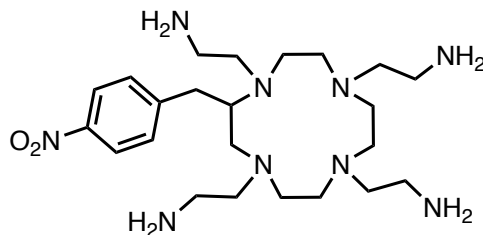
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:



**2,2',2'',2'''-(2-(4-nitrobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl)tetrakis(ethan-1-amine) (TEA-*p*-NO<sub>2</sub>-Bn-cyclen), **74****



*N*-Boc-2-bromoethylamine (0.395 g, 1.76 mmol) was added to a solution of *p*-NO<sub>2</sub>-Bn-cyclen (0.123 g, 0.400 mmol) and potassium carbonate (0.442 g, 3.20 mmol) in acetonitrile (4 mL). The solution was stirred at 65 °C until completion of the reaction (follow-up by HPLC-MS, 7 d). The solvent was evaporated under reduced pressure and the product was purified by RP-HPLC to give the desired intermediate as an orange TFA salt in 46 % yield (246 mg, 0.184 mmol).

**HPLC:** *retention time* = 4.38 min, *purity* = 0.97,  $\lambda_{\max}$  = 290 nm

**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup>: *m/z* = 480.5 (calcd for C<sub>23</sub>H<sub>46</sub>N<sub>9</sub>O<sub>2</sub>: 480.4)

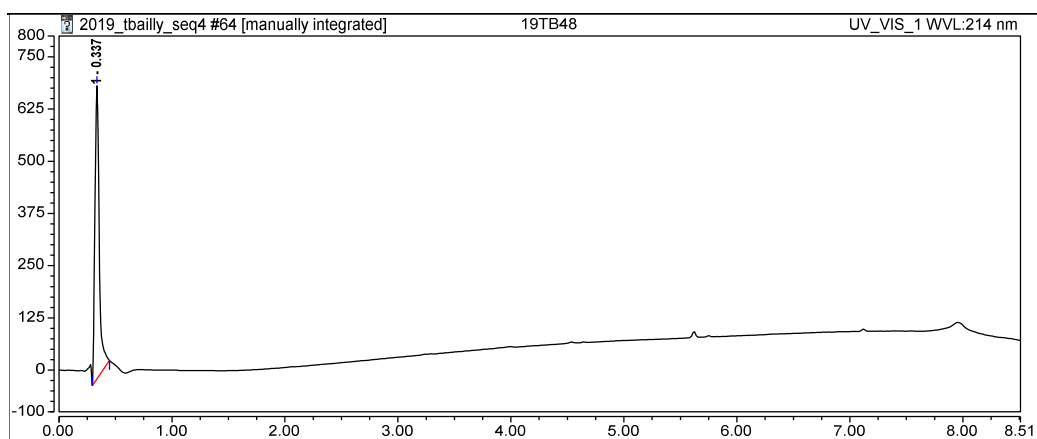
**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm) 8.18 (d, *J* = 14.8 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 5.47 (m, 4H), 3.92 – 2.65 (m, 32H), 1.43 (t, *J* = 8.8 Hz, 36H)

The intermediate was redissolved in DCM (10 mL) to which TFA (10 mL) was added. The solution was stirred at rt for 2 h and the solvents were evaporated under reduced pressure. The product was lyophilized to give **74** in 77 % yield as an orange TFA salt (194 mg, 0.141 mmol).

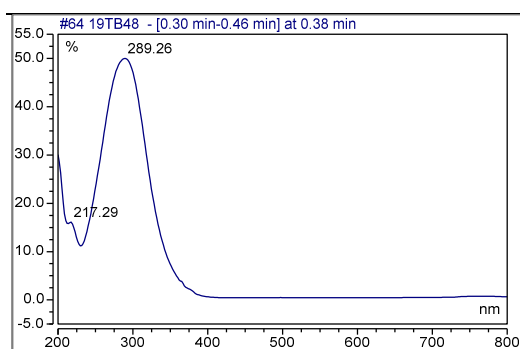
**HPLC:** *retention time* = 0.34 min, *purity* = > 0.99,  $\lambda_{\max}$  = 290 nm

**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup>: *m/z* = 480.5 (calcd for C<sub>23</sub>H<sub>46</sub>N<sub>9</sub>O<sub>2</sub>: 480.4)

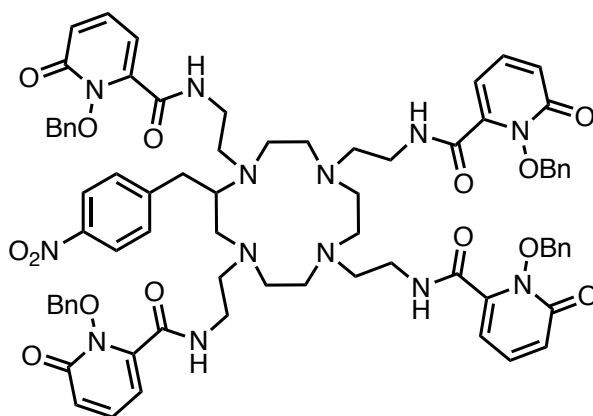
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:



*p*-NO<sub>2</sub>-Bn-Cy-HOPOBn, **75**



Starting with **68**:

A solution of **68** (0.163 g, 0.620 mmol) in THF (10 mL) was added to a solution of **74** (0.194 g, 0.141 mmol) and triethylamine (0.396 g, 2.9 mmol, 0.545 mL) in THF (15 mL). The reaction mixture was heated at 60 °C and stirred under argon atmosphere for 16 h. A yellow oil was obtained after evaporation of the solvent under reduced pressure. The crude product was purified by RP-HPLC to give **75** as a white solid in 30 % yield (58 mg, 0.042 mmol).

Starting with **69**:

A solution of **69** (0.14 g, 0.4 mmol) in acetonitrile (2 mL) was added to a solution of **74** (0.066 g, 0.080 mmol) and DIEA (0.12 mL, 0.65 mmol) in acetonitrile (1 mL). The reaction mixture was stirred at rt until completion of the reaction (follow-up by HPLC-MS, 1.5 h). A yellow oil was obtained after evaporation of the solvent under reduced pressure. The crude product was purified by RP-HPLC to give **75** as a white solid in 48 % yield (54 mg, 0.038 mmol).

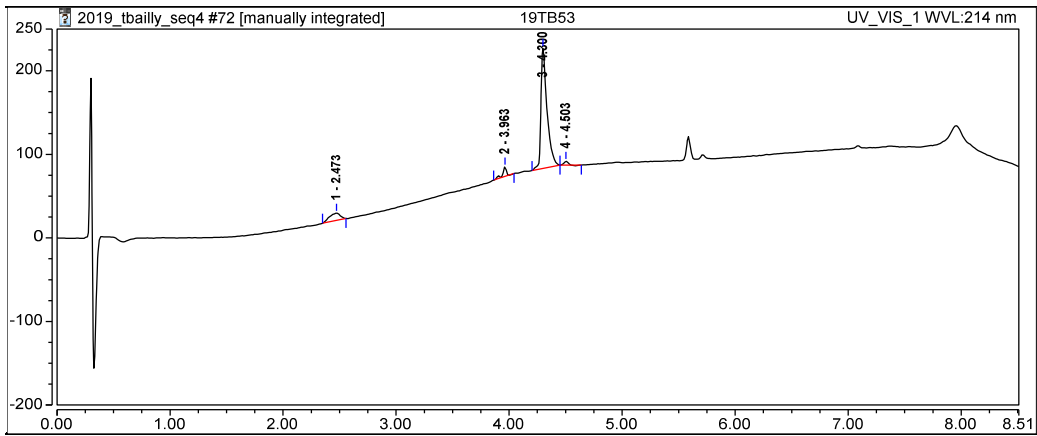
**HPLC:** *retention time* = 4.30 min, *purity* = 0.85,  $\lambda_{\text{max}}$  = 305 nm

**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup>: *m/z* = 1388.9 (calcd for C<sub>75</sub>H<sub>82</sub>N<sub>13</sub>O<sub>14</sub>: 1388.6)

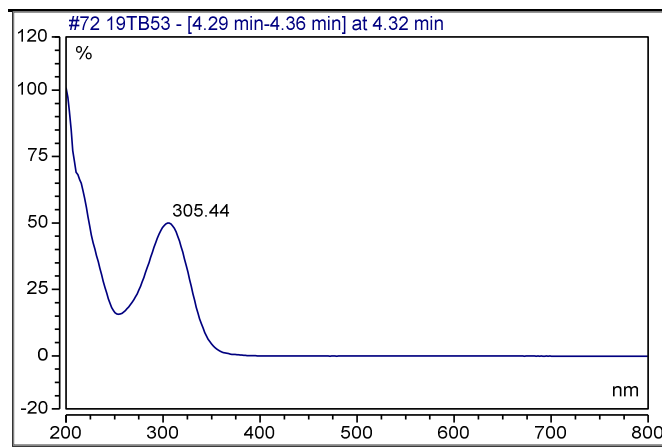
**HRMS:** [M+H]<sup>+</sup>: *m/z* = 1388.61260 (calcd for C<sub>75</sub>H<sub>82</sub>N<sub>13</sub>O<sub>14</sub>: 1388.60987)

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 9.41 – 8.59 (m, 6H), 7.53 – 7.29 (m, 26H), 6.66 (m, 4H), 6.33 – 6.17 (m, 4H), 5.32 – 5.17 (m, 8H), 3.87 – 2.53 (m, 33H)

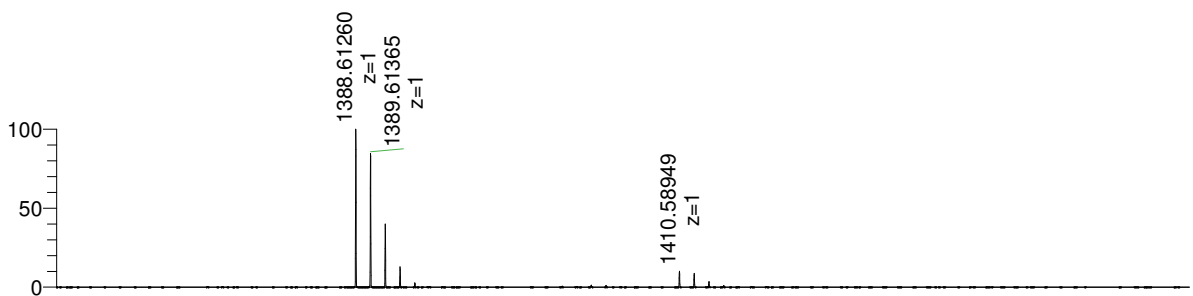
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum

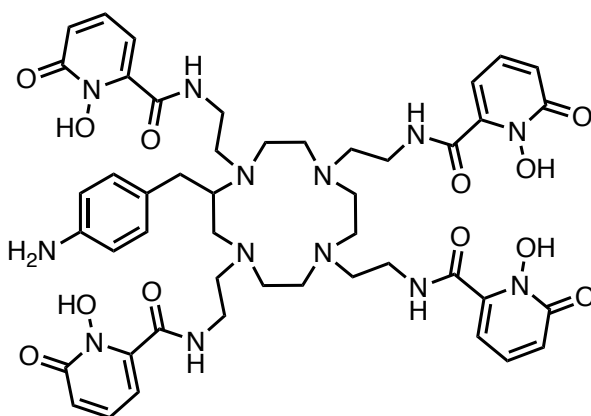


HRMS spectrum:





*p*-NH<sub>2</sub>-Bn-Cy-HOPO, **76**



**75** (140 mg, 0.076 mmol) was dissolved in methanol/THF 1:1 (v:v) in a flask containing Raney nickel in water (0.6 mg, 0.01 mmol). The reaction was vigorously stirred for 1.5 h under hydrogen atmosphere (1 atm). The reaction mixture was filtered through a syringe filter, and the latter was washed with methanol and dichloromethane. Solvents were evaporated under reduced pressure to give the reduced product as a yellow film.

**HPLC:** retention time = 3.57 min, purity = 0.91,  $\lambda_{\text{max}}$  = 309 nm

**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup>:  $m/z$  = 1358.9 (calcd for C<sub>75</sub>H<sub>84</sub>N<sub>13</sub>O<sub>12</sub>: 1358.6)

**HRMS:** [M+H]<sup>+</sup>:  $m/z$  = 1388.63538 (calcd for C<sub>75</sub>H<sub>84</sub>N<sub>13</sub>O<sub>12</sub>: 1358.63569)

BCl<sub>3</sub> (0.665 mg, 5.67 mmol, 0.500 mL) was added to a solution containing the previously synthesized product in anhydrous DCM (10 mL), cooled at 0 °C. The reaction was stirred for 2 days at rt under argon atmosphere. After completion of the reaction (follow-up by HPLC-MS), boron trichloride was quenched with methanol (1 mL) and concentrated hydrochloric acid (1 mL). The solvents were subsequently evaporated under reduced pressure yielding to **76** as a yellow TFA salt in 82 % yield (97 mg, 0.062 mmol).

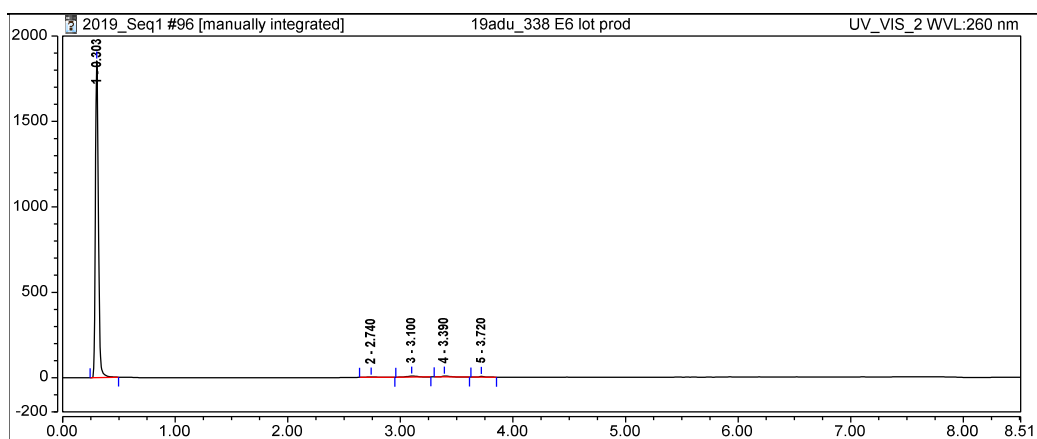
**HPLC:** retention time = 0.30 min, purity = 0.99,  $\lambda_{\text{max}}$  = 241, 308 nm

**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup>:  $m/z$  = 998.6 (calcd for C<sub>47</sub>H<sub>60</sub>N<sub>13</sub>O<sub>12</sub>: 998.5)

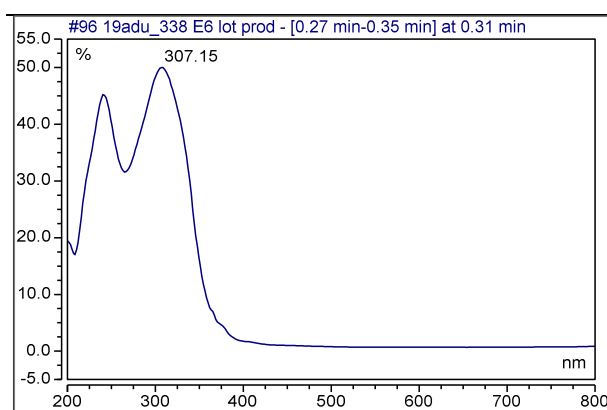
**HRMS:** [M+H]<sup>+</sup>:  $m/z$  = 998.44806 (calcd for C<sub>47</sub>H<sub>60</sub>N<sub>13</sub>O<sub>12</sub>: 998.44798)

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 9.66 – 8.82 (m, 4H), 7.60 – 7.33 (m, 14H), 5.28 (m, 2H), 4.19 – 2.57 (m, 35H).

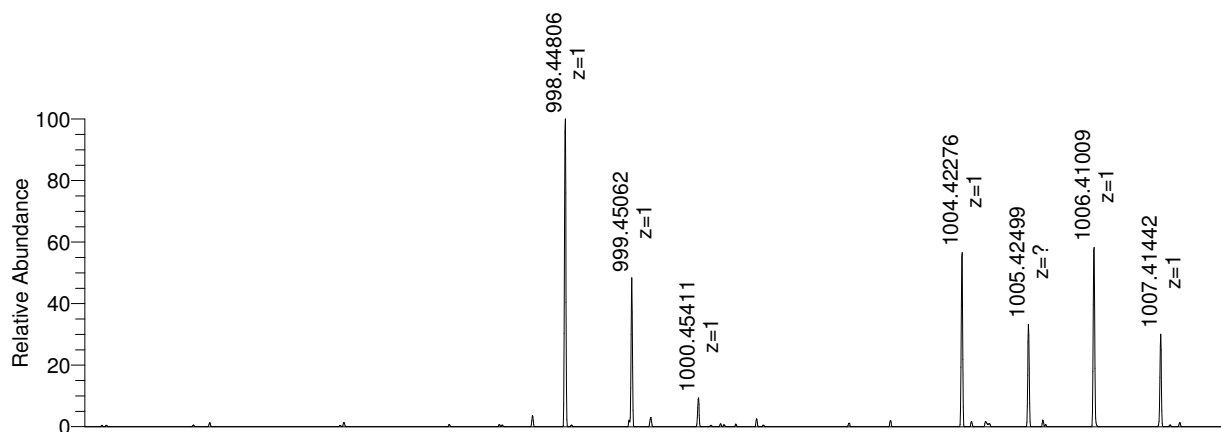
HPLC chromatogram:



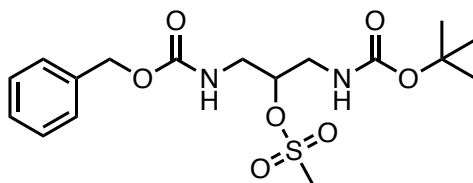
UV-vis absorption spectrum



HRMS spectrum:



**11,11-dimethyl-3,9-dioxo-1-phenyl-2,10-dioxo-4,8-diazadodecan-6-yl methanesulfonate, 77**



A solution of Boc<sub>2</sub>O (4.01 g, 1.82 mmol) in acetonitrile (20 mL) was added over 3 hours to a solution of 1,3-diaminopropan-2-ol (5.02 g, 54.4 mmol) in acetonitrile (130 mL). After two days of stirring at rt, acetonitrile was evaporated under reduced pressure and the product was dissolved in brine (50 mL). It was then acidified to pH 5 by addition of HCl (1 M). The solution was washed with DCM (3 × 50 mL). It was then basified with NaOH (2.5 M) to pH 12 and was extracted with chloroform (5 × 100 mL). The organic solution was dried over magnesium sulfate. The chloroform was evaporated to give the Boc-protected intermediate as a white powder in 45 % yield (1.56 g, 8.21 mmol)

**HPLC:** retention time = 0.59 min, purity = 0.95, λ<sub>max</sub> = 220 nm

**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup>: m/z = 191.3 (calcd for C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 191.1)

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) 5.15 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 3.60 (tt, *J* = 7.6, 4.1 Hz, 1H), 3.32 – 2.97 (m, 2H), 2.88 – 2.52 (m, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.42 (s, 9H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) 156.5, 79.3, 71.1, 44.6, 44.00, 28.3

Benzyl chloroformate (0.72 g, 0.593 mL, 4.09 mmol) was added to a solution of the previously synthesized Boc-protected compound (0.701g, 3.68 mmol) and DIEA (0.53 g, 4.05 mmol, 0.695 mL) in dry DCM (20 mL). The reaction media was stirred for 15 h at rt. DCM was afterward evaporated to give a yellow oil that was purified by normal-phase flash chromatography. Benzyl *tert*-butyl (2-hydroxypropane-1,3-diyl)dicarbamate was isolated as a colorless oil in 47 % yield (0.562 g, 1.71 mmol).

**HPLC:** retention time = 4.15 min, purity = 0.98, λ<sub>max</sub> = 200, 256 nm

**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup>: m/z = 325.3 (calcd for C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 325.2)

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) 7.46 – 7.03 (m, 5H), 5.01 (s, 4H), 3.67 (m, 1H), 3.35 – 2.91 (m, 4H), 1.35 (s, 9H)

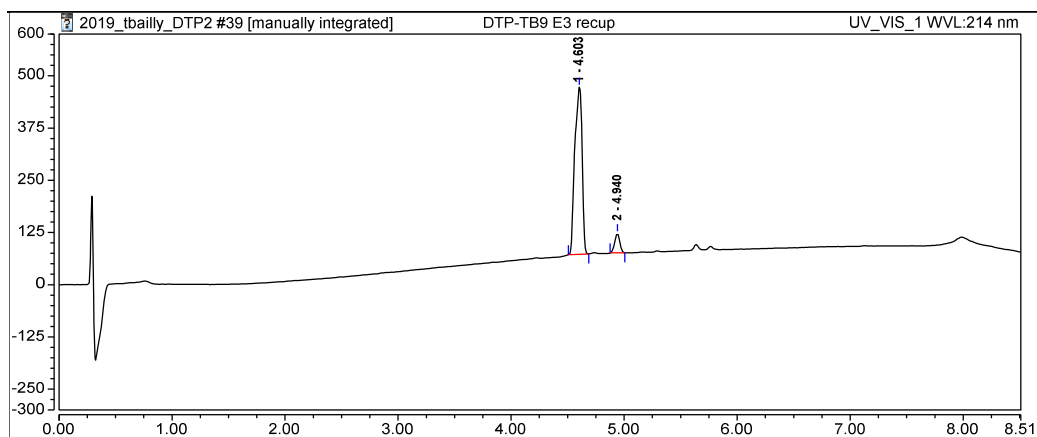
**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) 136.5, 128.7, 128.3, 128.2, 70.9, 67.1, 44.0, 28.4

Mesyl chloride (97.3 mg, 0.845 mmol, 0.066 mL) was added to a solution of the previously described compound (0.257 g, 0.769 mmol) and triethylamine (86.4 mg, 0.846 mmol, 0.119 mL) in dry DCM (6 mL) and stirred under argon atmosphere for 1 h (follow-up by TLC). The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue redissolved in DCM (15 mL). It was then washed with brine (15 mL) and the aqueous phase extracted with DCM (3 × 7 mL). The organic phases were dried over magnesium sulfate, and DCM was evaporated to give **77** as a colorless oil in 97 % yield (0.300 g, 0.745 mmol, 21 % over 3 steps).

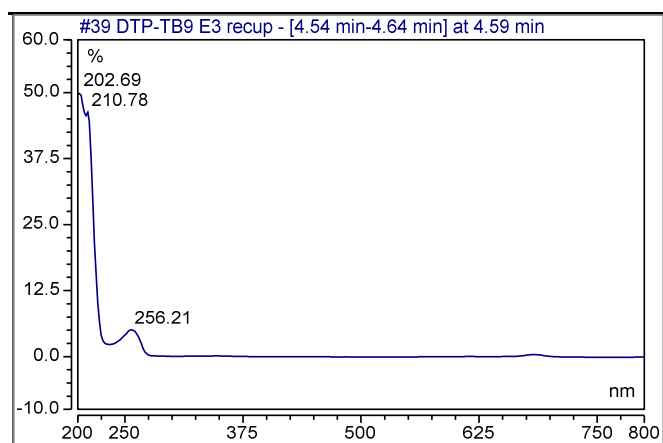
**HPLC:** retention time = 4.60 min, purity = 0.94, λ<sub>max</sub> = 200, 256 nm

**LRMS:** [M+H]<sup>+</sup>: m/z = 402.7 (calcd for C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S: 403.1)

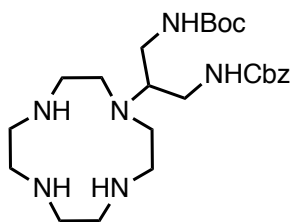
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:



*benzyl tert-butyl (2-(1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)propane-1,3-diy)dicarbamate, 78*

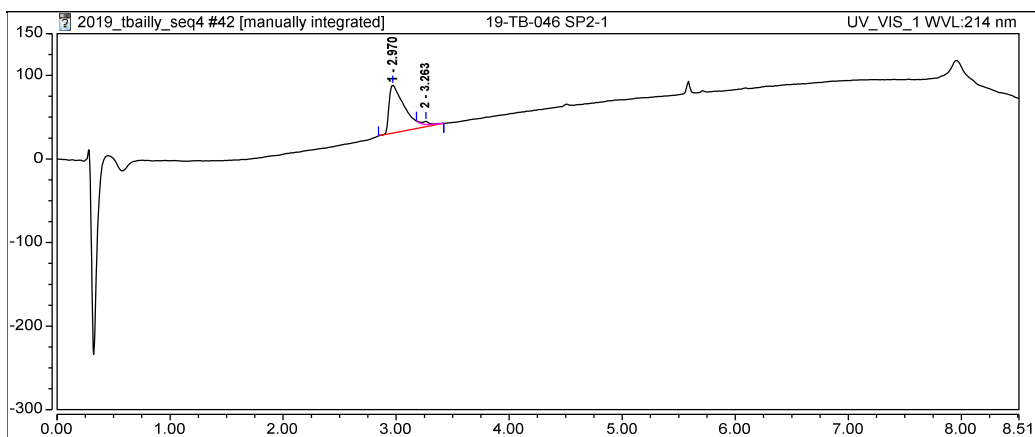


A solution of **77** (0.300 g, 0.745 mmol) in acetonitrile (5 mL) was added to a solution of cyclen (0.501 g, 2.89 mmol) and potassium carbonate (1.61 g, 11.5 mmol) in acetonitrile (15 mL). The reaction was stirred at rt for 4 days. The product was purified by RP-HPLC to give **78** as a white powder in 16 % yield after lyophilization (0.108 g, 0.116 mmol).

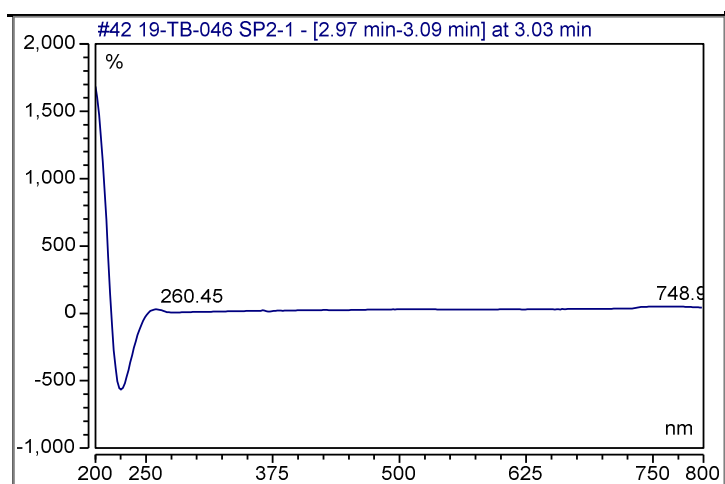
**HPLC:** *retention time* = 2.82 min, *purity* = 0.97,  $\lambda_{\text{max}}$  = 200 nm

**LRMS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z$  = 479.5 (calcd for  $C_{24}H_{42}N_6O_3$ : 479.3)

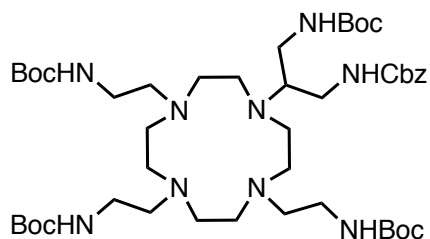
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:



*benzyl tert-butyl (2-(4,7,10-tris(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)propane-1,3-diyl)dicarbamate, 79*



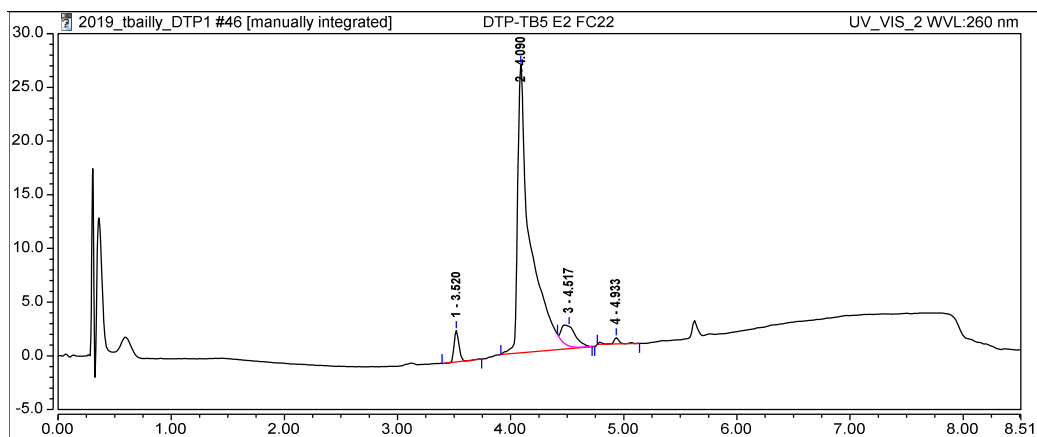
A solution of *N*-Boc-protected-bromoethylamine (167 mg, 0.074 mmol) in acetonitrile (3 mL) was added to a solution of **78** (0.108 g, 0.116 mmol) and potassium carbonate (0.249 g, 1.80 mmol) in acetonitrile (5 mL). The reaction was stirred at 80 °C for 2 days. The solvent was evaporated and the residue was purified by RP-HPLC to give **79** as a white powder in 38 % yield (60.5 mg, 0.044 mmol)

**HPLC:** *retention time* = 3.89 min, *purity* = 0.89,  $\lambda_{\text{max}}$  = 214 nm

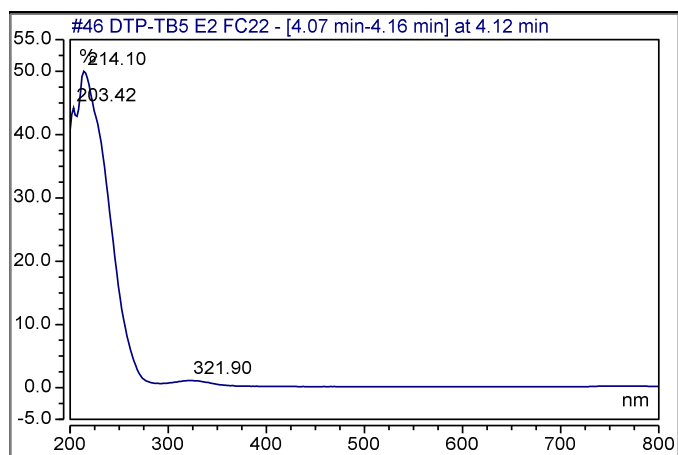
**LRMS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z$  = 908.8 (calcd for  $C_{45}H_{82}N_9O_{10}$ : 908.6)

**$^1H$  NMR:** (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ (ppm) 7.40 – 7.27 (m, 5H), 6.00 (m, 4H), 5.58 (s, 1H), 5.07 (m, 2H), 3.66 – 2.25 (m, 33H), 1.40 (d,  $J$  = 4.0 Hz, 36H)

HPLC chromatogram:

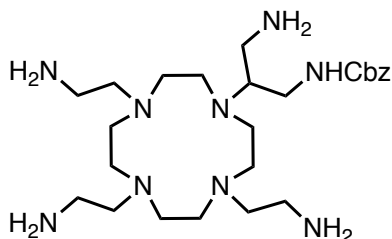


UV-vis absorption spectrum:





*Benzyl(3-amino-2-(4,7,10-tris(2-aminoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1yl)propyl)carbamate, 80*

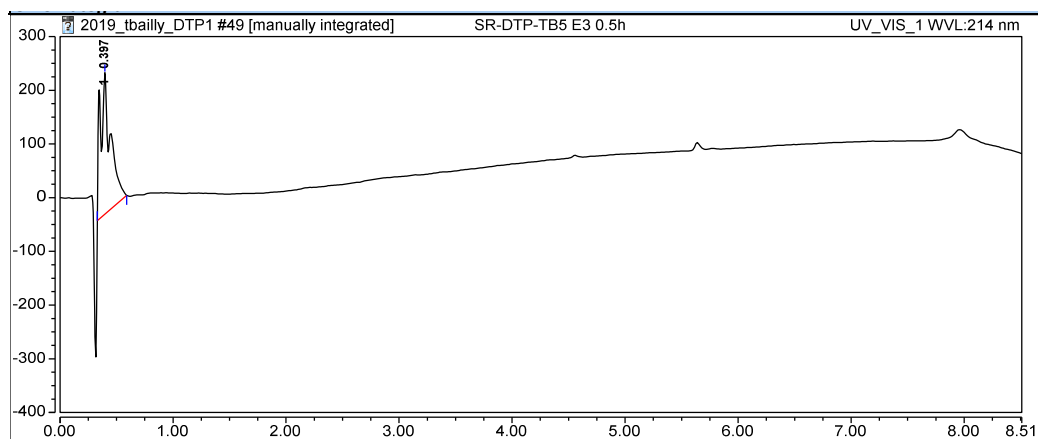


TFA (10 mL) was added to a solution of **79** (0.259 g, 0.285 mmol) in DCM (10 mL). The solution was left to stir for 1 h at rt and concentrated to 1 mL under reduced pressure. Upon addition of diethyl ether (4 °C, 10 mL), the product precipitated. The white solid was filtered, wash with diethyl ether (4 °C) and was dried in an oven to give the desired product **80** in 97 % yield (0.140 g, 0.276 mmol).

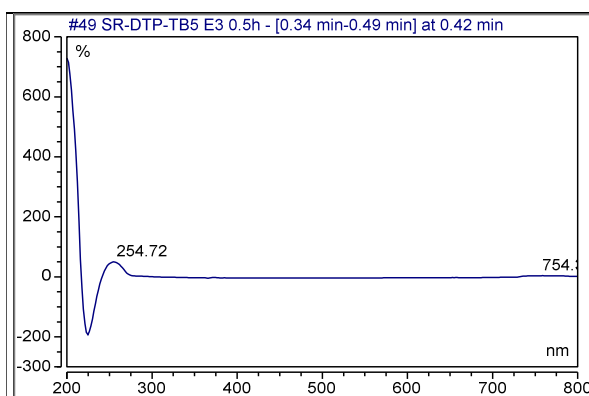
**HPLC:** *retention time* = 0.31 min, *purity* = > 0.99,  $\lambda_{\text{max}}$  = 200 nm

**LRMS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z$  = 508.4 (calcd for  $C_{25}H_{50}N_9O_2$ : 508.4)

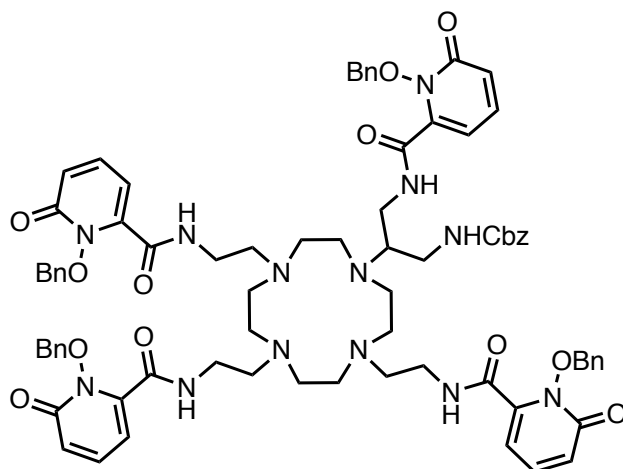
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:



*Cbz-N-aminomethyl-Cy-HOPOBn*, **81**

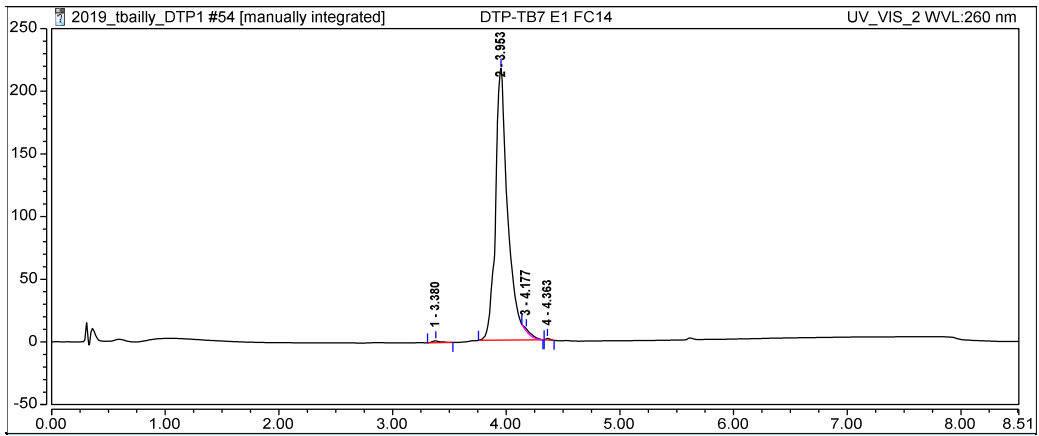


A solution of **69** (0.489 g, 1.43 mmol) and DIEA (0.25 mL) in DMF (1 mL) was added to a solution of **80** (0.145 g, 0.28 mmol) in DMF (1 mL). The reaction mixture was stirred at rt until completion of the reaction (follow-up by HPLC-MS, 1 h). The crude was purified by reverse-phase flash chromatography to give **81** (0.220 g, 0.155 mmol) as a white powder in 55 % yield.

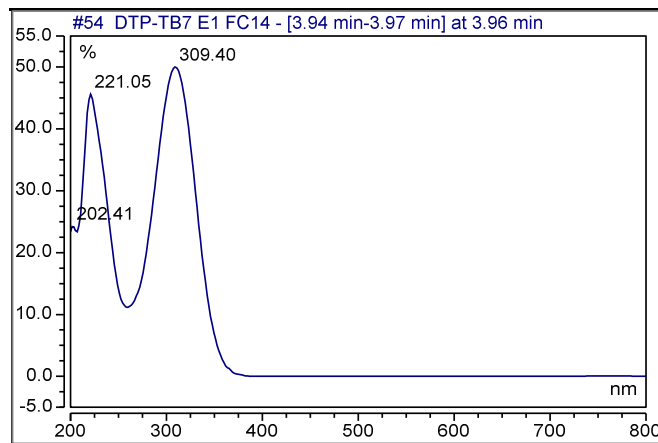
**HPLC:** *retention time* = 3.95 min, *purity* = 0.98,  $\lambda_{\text{max}}$  = 220, 309 nm

**LRMS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z$  = 1416.9 (calcd for  $C_{77}H_{86}N_{13}O_{14}$ : 1416.6)

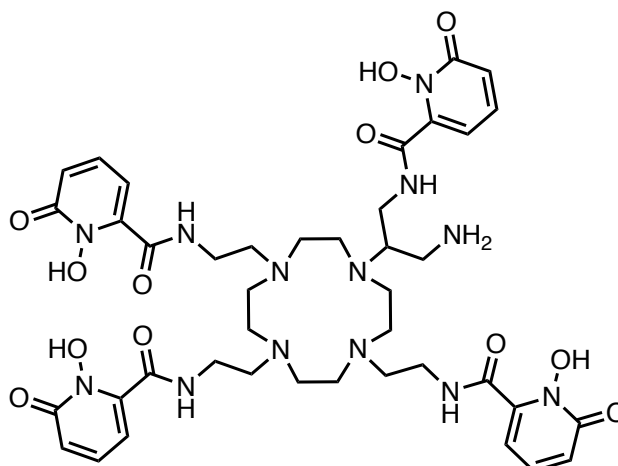
HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:



*aminomethyl-Cy-HOPOBn*, **82**



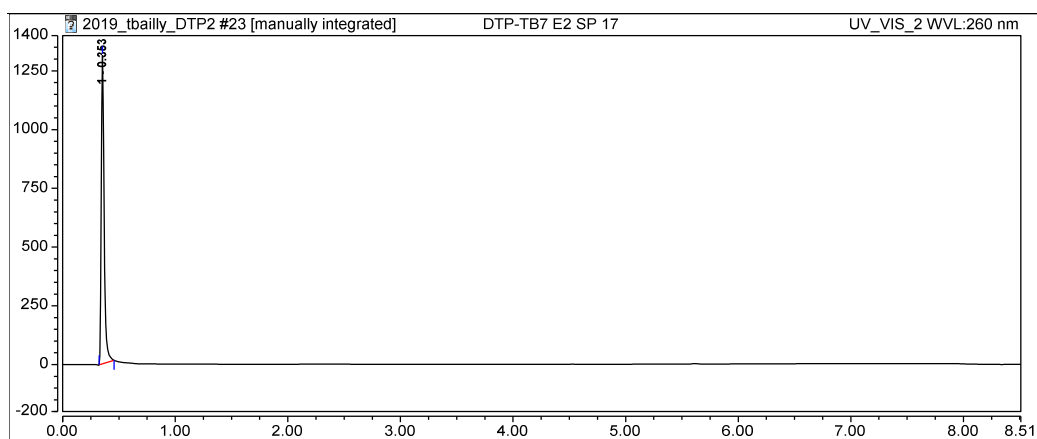
**81** (35 mg, 0.025 mmol) was dissolved in a mixture of acetic acid and HCl 37 % (50% v/v) and stirred at rt for 48 h and at 40 °C for 9 h. The acids were evaporated under reduced pressure and the resulting whitish residue was redissolved in methanol (3 mL) to be precipitated by addition of diethyl ether (4 °C, 50 mL). After filtration, the white solid was dried under vacuum and lyophilized yielding to **82** (14.5 mg, 0.012 mmol) in 51 % yield.

**HPLC:** *retention time* = 0.35 min, *purity* = > 0.99,  $\lambda_{\text{max}}$  = 240, 307 nm

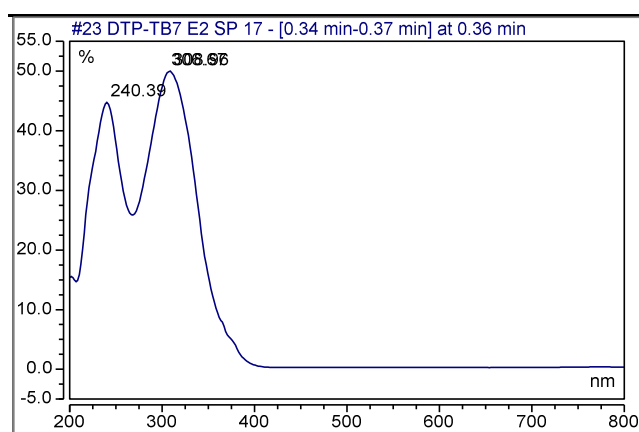
**LRMS:**  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :  $m/z$  = 922.5 (calcd for  $\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{N}_{13}\text{O}_{12}$ : 922.4)

**HRMS:**  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :  $m/z$  = 922.41334 (calcd for  $\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{N}_{13}\text{O}_{12}$ : 922.41659)

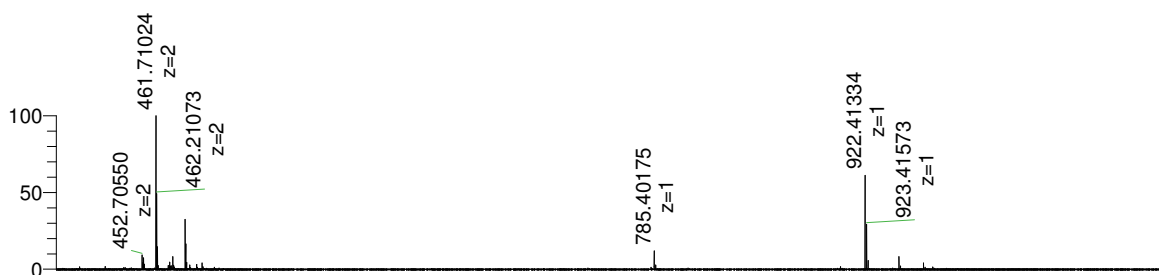
HPLC chromatogram:



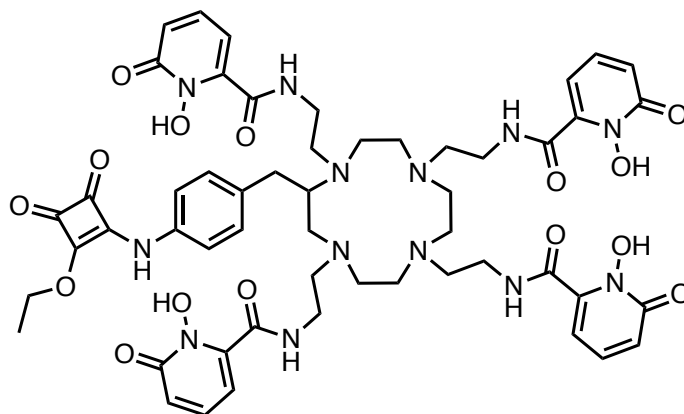
UV-vis absorption spectrum:



HRMS spectrum:



*EtO-Sq-p-aminobenzyl-Cy-HOPO*, **84**



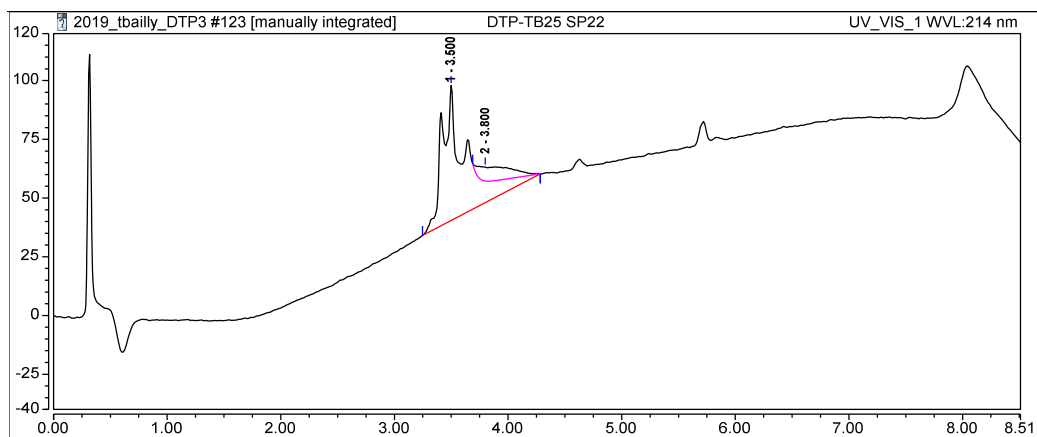
A solution of diethylsquarate (23  $\mu$ L, 0.15 mmol) in ethanol (1 mL) was added to a solution of **76** (10 mg, 0.010 mmol) in water (1 mL) that was subsequently stirred at 50 °C until completion of the reaction (follow-up by HPLC-MS, 5.5 h). The crude was directly purified by RP-HPLC to give **84** (1.25 mg, 0.0011 mmol) in 11 % yield.

NB: Regarding the HPLC-MS chromatogram and the following experiment we performed on this molecules, we suspect that the latter is a mixture of several isomers where the squaramide derivative is most probably bound to different hydroxamate functions.

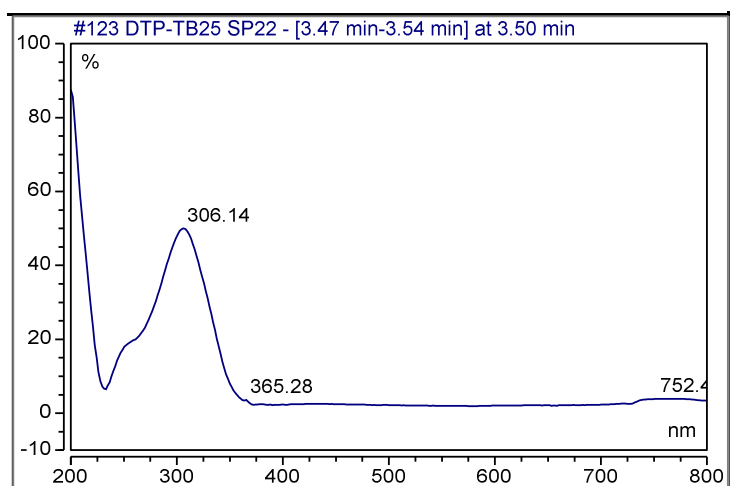
HPLC: *retention time* = 3.50 min, *purity* = 0.87,  $\lambda_{\text{max}}$  = 306 nm

LRMS:  $[M+2H+Na]^{2+}$ :  $m/z$  = 574.0 (calcd for  $C_{53}H_{65}N_{13}O_{15}Na$ : 574.2)

HPLC chromatogram:



UV-vis absorption spectrum:





### III. Radiolabeling and biological evaluation of conjugates

#### 1. *In vitro* evaluation of conjugates [<sup>68</sup>Ga]Ga-13, [<sup>68</sup>Ga]Ga-16 and [<sup>68</sup>Ga]Ga-17

##### A. Radiolabeling

Radiolabeling was achieved using the FastLab automate cassette system (GE Healthcare). 1.1 mL of <sup>68</sup>Ga[Ga]Cl<sub>3</sub> (~600 MBq) in HCl 0.1 M (Galli Eo, IRE-EliT, Belgium) was incubated, without further purification, with 50 µg (37–39 nmol) of each analog in formate buffer (pH 3.5, final volume 2 mL) and heated using a microwave reactor (GE MicroWave System 100; 100–240 vac; 50–60 Hz; 500 W ; fuses 2xT6AH 250 V) at 90 °C for 5 min. The crude peptide was then purified on a Sep-Pak Light C<sub>18</sub> cartridge (WAT023501) using 0.5 mL of ethanol and then formulated in PBS to obtain a final volume of 1.1 mL. Radiochemical purity was determined by UV-radio-HPLC and TLC analyses.

HPLC analyses were performed using a Phenomenex Luna C18 column (4 mL/min, λ = 220 nm C<sub>18</sub>, 150 mm x 4,6 mm x 5 µm). HPLC conditions were: 0-2min: 90% ACN (A), 10% water in 0.1%TFA (B), 2-10min: 90% to 10% A, 10% to 90% B, 10-12min: 10% A ; 90% B, 12-14min: 10% to 90% A ; 90% to 10% B. The analytical HPLC system used was a JASCO system with ChromNAV software, a PU-2089 Plus quaternary gradient pump, a MD-2018 Plus photodiode array detector and Raytest Gabi Star detector. TLC analyses were also carried out (miniGITA plate reader, acquisition time of 1 min, R<sub>f</sub> impurities ≤ 0.1, R<sub>f</sub> <sup>68</sup>Ga-bioconjugates ≥ 0.8 as described in the monograph of the European Pharmacopeia for <sup>68</sup>Ga-edoctreotide n°01/2013:2482 corrected 8.6 using methanol/ammonium acetate (1:1) as the mobile phase and iTLC-SG as the stationary phase).

All compounds were radiolabeled with gallium-68 with 60 % yield, high radiochemical purity >95 % after purification), high volumic activity of 100 MBq/mL, and high apparent molar activity of 12.5 ± 1.3 GBq/µmol.

##### B. Saturation binding assays

The affinity of the [<sup>68</sup>Ga]Ga-labeled conjugates were studied on PC3 and 22Rv1 cells seeded at a density of 250000 cells per well in 24-well plates and incubated overnight with complete medium.

24-well plates were first set on ice 30 min before the beginning of the experiment. <sup>68</sup>Ga-labeled radiopeptides were then added to the medium at concentrations of 0.1, 1, 10, 25, 50 and 100 nM, and cells were incubated (in triplicate) for 2 h at 4 °C. Incubation was stopped by removing medium and washing cells twice with ice-cold PBS. Finally, cells were treated with NaOH (1 M), and the radioactivity was measured in a gamma counter.

To assess for nonspecific affinity, excess nonradioactive PMPA (final concentration 10 µM) and/or bombesin (final concentration 10 µM) was added to selected wells.

## 2. *In vivo* evaluation of conjugates [<sup>68</sup>Ga]Ga-12, [<sup>68</sup>Ga]Ga-13, [<sup>68</sup>Ga]Ga-16 and [<sup>68</sup>Ga]Ga-17

### A. Cell lines and animal models

GRPR<sup>-</sup>/PSMA<sup>+</sup> 22Rv1 cells and GRPR<sup>+</sup>/PSMA<sup>-</sup> PC-3 cells were cultured at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub> in RPMI Medium 1640-GlutaMAX containing 10% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin.

Female athymic NMRI nude mice (age: 4–6 weeks, weight: 17–20 g) were purchased from Janvier, France.

For implantation, the tumor cells were harvested by trypsinization and 5 × 10<sup>6</sup> cells in 50% Matrigel (Corning Matrigel Matrix, 354230) were inoculated subcutaneously into the right and left shoulders of the mice. Growth of the tumors was measured in two perpendicular directions 2 times per week using a caliper (body weights were monitored on the same schedule), and the volumes of the tumors were calculated as  $0.5 \times L \times W^2$  ( $L$  = longest axis and  $W$  = axis perpendicular to  $L$  in millimeters).

After four weeks, tumor size reached  $388 \pm 133$  mm<sup>3</sup> for PC3 and  $151 \pm 60$  mm<sup>3</sup> for 22Rv1 (Mean ± SEM, n=6). The animals were used for biodistribution and PET imaging studies between 4 and 5 weeks after implantation.

### B. Radiolabeling

Radiometalation of AMBA, PSMA11, 12, 13, 16 and 17 were performed with an automatic module synthesis SynChrom R&D (Raytest) available at the LIMP for preclinical PET imaging. The module is equipped with two transparent reactor systems, one for the radiolabeling and the second one to allow the evaporation of the ethanol residue, in order to increase volumic activity which is critical for injection to small animals as mice.

GalliaPharm<sup>®</sup> TiO<sub>2</sub>-based Generator from Eckert & Ziegler (Germany) was eluted with 0.1 N HCl (5 mL) using a syringe pump at a flow rate of 2 mL/min., and the 1.2/1.5 mL fraction of the eluant that contained the highest concentration of <sup>68</sup>Ga was eluted into a vial while the remainder of the eluent was discarded to waste. Time course of <sup>68</sup>Ga complexation reaction was conducted using 1.2 mL peak fraction of the generator eluate at conventional heating at 40°C (PSMA11, 17) or 95 °C (AMBA) during 10 min in a first reactor with formate buffer (SOMAKIT, 100 µL for 1 mL or 120 µL for 1 mL), pH = 3-3.5 (pH paper), 10-20 nmol of peptide.

The reaction mixture was then loaded onto a C<sub>18</sub> Sep-Pack cartridge (tC<sub>18</sub> light WAT023501, Waters Milford, USA) previously conditioned with 1 mL of water then 1 mL of ethanol and 1 mL of water. To increase recovery and to remove free <sup>68</sup>Ga, both the reactor and the C<sub>18</sub> column were subsequently rinsed with 2 mL of TraceSelect water. The final products were eluted into the second reactor using 800 µL of 80% ethanol, which was subsequently evaporated at 70 °C under argon flow, then the final product was diluted in 1 mL saline solution.

HPLC quality control was performed using a Waters breeze system with a 1525 binary pump. Radioactivity was detected with a Berthold radio-HPLC detector. The HPLC mobile phase was a

mixture of H<sub>2</sub>O, 0.1% TFA (A) and acetonitrile CH<sub>3</sub>CN, 0.1% TFA (B). The HPLC Reverse Phase C<sub>18</sub> column (Zorbax Bonus-RP column; 4.6 x 250 mm; 5 μm, Agilent) was equilibrated at a flow rate of 2 mL/min with 83% A and 17% B; the HPLC gradient was as follows: 0–20 min 60% A, 40% B, flow 1 mL/min.

The specific activity in MBq/nmol and the radiochemical yield were measured to confirm the success of the radiolabelling.

### C. PET imaging studies

Whole body static PET/computed tomography (CT) scans were performed under general anesthesia in a NanoScan PET/CT (Mediso Medical Imaging Systems Ltd., Budapest, Hungary) during 20 min scans using multiple bed (three mice simultaneously). Anesthesia was induced and maintained during imaging by the administration of a mixture of isoflurane (1.5 to 2.5%) and oxygen. CT acquisitions were performed before PET acquisitions using the same bed position. PET and CT files were fused and converted to standardized uptake value (SUV) images using Nucline 2.03 Software (Mediso Medical Imaging Systems, Hungary). Images are analyzed and presented as coronal or axial slices.

### D. In vivo characterization and blocking

All animal experiments were conducted in compliance with the French animal protection laws and with the ethical principles and guidelines for scientific animal trials established by the French Academy of Medical Sciences and the French Academy of Natural Sciences.

#### Static PET imaging:

Mice received an intravenous injection of 100 μL of [<sup>68</sup>Ga]Ga-**13** (631,16 ± 78,89 pmol, 4,03 ± 0,74 MBq, diluted in 0.9 % NaCl, containing 0.1 % HSA, pH 7.4) *via* retro-orbital injection, n = 6, images were acquired 1 h *post-injection*.

Mice received an intravenous injection of 100 μL of [<sup>68</sup>Ga]Ga-**13** (690,33 ± 67,47 pmol, 4,03 ± 0,43 MBq, diluted in 0.9 % NaCl, containing 0.1 % HSA, pH 7.4) *via* retro-orbital injection, n = 3, images were acquired between 1 h 30 and 1 h 50 *post-injection*.

Mice received an intravenous injection of 100 μL of [<sup>68</sup>Ga]Ga-**AMBA** (n = 790 ± 30 pmol, 5,6 ± 0,2 MBq diluted in 0.9 % NaCl, containing 0.1 % HSA, pH 7.4) *via* retro-orbital injection, n = 3, images were acquired between 50 and 70 min and between 1 h 50 and 2 h *post-injection*.

Mice received an intravenous injection of 100 μL of [<sup>68</sup>Ga]Ga-**PSMA11** (1,5 nmol, 4,15 MBq diluted in 0.9 % NaCl, containing 0.1 % HSA, pH 7.4) *via* retro-orbital injection, n = 1, images were acquired between 50 and 70 min and between 1 h 50 and 2 h *post-injection*.

### Blocking experiment:

Non-specific uptake was determined by co-injection of an excess of bombesin or PMPA, [<sup>68</sup>Ga]Ga-**13** ( $524 \pm 100$  pmol,  $4,15 \pm 0,03$  MBq) + BBN (480 nmol, GRPR blocking), and [<sup>68</sup>Ga]Ga-**13** ( $498 \pm 30$  pmol,  $4,05 \pm 0,60$  MBq,  $n = 4$ ) + PMPA (552 nmol, PSMA blocking).  $n = 3$ /group.

### Dynamic PET images:

Mice received an intravenous injection of 100  $\mu$ L of [<sup>68</sup>Ga]Ga-**13** ( $633,5 \pm 115,7$  pmol,  $6,11 \pm 0,62$  MBq, diluted in 0.9 % NaCl, containing 0.1 % HSA, pH 7.4) *via* retro-orbital injection,  $n = 4$ , images were acquired 5, 15, 45, 50, 75 and 90 min *post-injection*. Mice were maintained asleep during the entire experiment.

Mice received an intravenous injection of 100  $\mu$ L of [<sup>68</sup>Ga]Ga-**12** ( $809,5 \pm 35,6$  pmol,  $4,91 \pm 0,69$  MBq, diluted in 0.9 % NaCl, containing 0.1 % HSA, pH 7.4) *via* retro-orbital injection,  $n = 6$ , images were acquired 5, 15, 45, 50, 75 and 90 min *post-injection*. Mice were maintained asleep during the entire experiment.

### Bodistribution studies:

The animals were sacrificed at 2 h post-injection by cervical elongation. Tumors, selected organs and aliquots of blood were collected, weighed, and the amount of radioactivity was measured in a  $\gamma$ -counter. Results are expressed as a percentage of the injected dose per gram of tissue (% I.D./g). Statistical analysis was conducted using unpaired two-tailed Student's t-test in Graphpad Prism 6.0.

## 3. Fluorescence-based *in vitro* evaluation of conjugates

### A. Cell culture

GRPR<sup>+</sup>/PSMA<sup>+</sup> PC-3pip cells and GRPR<sup>+</sup>/PSMA<sup>-</sup> PC-3 cells were cultured at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub> in RPMI medium 1640-GlutaMAX containing 10 % FBS, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin. Cells were subcultured twice a week using standard protocols.

### B. Kinetic assays

Two days prior the experiment, PC-3 cells ( $5 \times 10^5$  cells per well) were plated in a 24-well plate (Nunc multidish 24, ref: 142475, Thermo Scientific) in RPMI medium (1640-GlutaMAX containing 10 % FBS, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin) and incubated at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>. On the day of the experiment, the medium was removed by aspiration and the cells were incubated at 37 °C for 10 min, 30 min, 60 min, 120 min or 240 min with a solution of 0.32 nM of **59** in RPMI medium. Non-specific binding was determined by adding a 1000-fold excess of natural bombesin to selected wells.

After incubation, the medium was removed by aspiration and each well was gently washed with PBS (3 x 0.5 mL). Remaining fluorescence, corresponding to bound peptide, was quantified thanks to an Incucyte<sup>®</sup> SX1 Live-Cell Analysis system (objective: 10X,  $\lambda_{exc} = 567 - 607$  nm,  $\lambda_{em} = 622 - 704$  nm). The fluorescence values were then normalized by division with the area

occupied by the cells. Time of half-equilibrium was determined with non-linear regression using GraphPad Prism5.

### C. Saturation binding assays

Two days (PC-3 cells) or 1 day (PC-3-pip cells) prior the experiment, cells ( $5 \times 10^5$  cells per well) were plated in a 24-well plate (Nunc multidish 24, ref: 142475, Thermo Scientific) in RPMI medium (1640-GlutaMAX containing 10 % FBS, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin) and incubated at 37 °C and 5 %  $\text{CO}_2$ . On the day of the experiment, the medium was removed by aspiration and the cells were incubated at 37 °C for 2 h with solutions of 0.5, 1, 5, 25, 50 and 100 nM of **59** in RPMI medium. Non-specific binding was determined by adding a 1000-fold excess of natural bombesin to selected wells.

After incubation, the medium was removed by aspiration and each well was gently washed with PBS (3 x 0.5 mL). Remaining fluorescence corresponding to bound peptide was quantified thanks to an Incucyte® SX1 Live-Cell Analysis system (objective: 10X,  $\lambda_{\text{exc}} = 567 - 607 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 622 - 704 \text{ nm}$ ). The fluorescence values were then normalized by division with the area occupied by the cells.  $K_D$  was determined with non-linear regression using GraphPad Prism5.

### D. Competition binding assays

Two days (PC-3 cells) or 1 day (PC-3-pip cells) prior the experiment, cells ( $5 \times 10^5$  cells per well) were plated in a 24-well plate (Nunc multidish 24, ref: 142475, Thermo Scientific) in RPMI medium (1640-GlutaMAX containing 10 % FBS, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin) and incubated at 37 °C and 5 %  $\text{CO}_2$ . On the day of the experiment, the medium was removed by aspiration and the cells were incubated at 37 °C for 2 h with solutions of 10 nM of **59** and 0.5, 1, 5, 10, 50 and 100 nM of the ligand to assay in RPMI medium.

After incubation, the medium was removed by aspiration and each well was gently washed with PBS (3 x 0.5 mL). Remaining fluorescence corresponding to bound peptide was quantified thanks to an Incucyte® SX1 Live-Cell Analysis system (objective: 10X,  $\lambda_{\text{exc}} = 567 - 607 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 622 - 704 \text{ nm}$ ). The fluorescence values were then normalized by division with the area occupied by the cells.  $\text{IC}_{50}$  was determined with non-linear regression using GraphPad Prism5 and  $K_D$  was determined using the equation of Chen-Prussoff.



**Titre :** Synthèse et évaluation de traceurs peptidiques hétérobivalents pour l'imagerie moléculaire

**Mots clés :** Imagerie moléculaire, Multivalence, Radiopharmaceutiques, Imagerie nucléaire, Cancer

**Résumé :** En dépit des avancées réalisées ces dernières décennies, le cancer demeure l'une des premières causes de mortalité dans le monde. L'imagerie nucléaire vectorisée constitue un outil puissant qui facilite le diagnostic de ces pathologies. Cependant, elle souffre parfois d'une spécificité trop faible pour les cellules tumorales et d'un temps de résidence insuffisant au sein des tumeurs.

L'utilisation de radiotraceurs hétérobivalents (ciblant deux biomarqueurs différents) constitue à ce jour une approche prometteuse pour pallier ces deux problèmes.

L'objet de ces travaux de thèse était de développer une méthode de synthèse simple, directe et modulaire pour synthétiser une série de traceurs hétérobivalents affins de différentes cibles.

L'un de ces traceurs a été évalué *in vitro* et *in vivo* et a démontré sa capacité à se lier spécifiquement à des tumeurs surexprimant chacune de ses cibles, prouvant ainsi l'efficacité de notre approche.

Enfin, cette thèse présente également le développement d'une nouvelle méthode d'évaluation d'agents d'imagerie s'affranchissant de l'utilisation de la radioactivité.

Enfin, le dernier projet abordé dans cette thèse traite du développement d'un nouveau chélateur bifonctionnel du zirconium-89. Ce radioélément émetteur de positrons est prometteur quant à son utilisation en imagerie TEP vectorisée par les anticorps. Cependant, aucun chélateur bifonctionnel développé à ce jour ne permet pas la formation d'un complexe stable *in vivo*. Nous proposons dans cette thèse une solution à ce problème.

**Title:** Synthesis and evaluation of heterobivalent peptidic tracers for molecular imaging

**Keywords:** Molecular imaging, Multivalence, Radiopharmaceuticals, Nuclear imaging, Cancer

**Abstract:** Despite the great advances of the last fifty years, cancer remains one of the leading causes of death worldwide. Among the technologies developed in the last decades, nuclear imaging agents are powerful tools for tumor diagnosis. However, radiotracers often suffer from an affinity for non-targeted tissues as well as an insufficient residence time within the tumors.

The development of heterobivalent radiotracers (aiming two different biomarkers of cancer) is nowadays one of the most promising approaches to overcome these issues.

The main objective of this thesis work was to develop a straightforward and modular approach to generate a series of heterobivalent tracers directed to different targets.

One of these tracers has been evaluated *in vitro* and *in vivo* and has demonstrated a great affinity for both targeted proteins, thus confirming the efficacy of the approach we have developed.

Finally, this thesis also deals with the development of a new method to evaluate tracer's affinity for their target without the use of radioactivity.

Finally, the last project discussed in this thesis is dealing with the development of a new bifunctional chelator for zirconium-89. This positron emitting radionuclide is of great interest for PET imaging with antibodies. Up to now, no bifunctional chelators are able to form fully stable complexes *in vivo*. In this thesis, we propose a solution to solve this problem.