





Institut national de la santé et de la recherche médicale

# UNIVERSITÉ PARIS 13 – INSTITUT GALILÉE ÉCOLE DOCTORALE GALILÉE

Spécialité : Signaux et Images en Biologie et Médecine

# THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de

# **DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 13**

Par

Rana Ben Azzouna

# Le gallium : Applications en vue d'une utilisation en imagerie moléculaire

Soutenue publiquement le 12 décembre 2016

# <u>Jury</u> :

Pr. Jean Michel Scherrmann	Examinateur
Dr. Didier Le Bars,	Rapporteur
Dr. Amaury du Moulinet D'Hardemare	Rapporteur
Pr. Nathalie Charnaux	Examinateur
Pr. Dominique Le Guludec	Directeur de thèse
Pr. Denis Guilloteau	Co-directeur de thèse
Pr. Frédéric Chaubet	Co-directeur de Thèse

Laboratoire de Recherche Vasculaire Translationnelle (LVTS) - Inserm U1148

 $\hat{A}$  mes parents, ma fierté et mon exemple dans la vie.  $\hat{A}$  ma famille et plus particulièrement Nourane, Mohammed, Julien, Aliya et mamma Tijania.

À Amina et Nabila Afroun. Merci d'avoir été à mes côtés tout au long de ce parcours.

À Antoine Sammour. Merci pour tes conseils, tes encouragements et tes leçons de vie. Merci d'avoir toujours cru en moi.

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de thèse : Professeurs Denis Guilloteau, Dominique Le Guludec et Frédéric Chaubet. Merci d'avoir dirigé mes travaux de thèse. Merci pour votre exigence, votre patience, vos conseils et tout le temps que vous m'avez accordé. Merci pour tout ce que vous m'avez appris.

A mes rapporteurs de thèse, Dr. Amaury du Moulinet d'Hardemare et Dr. Didier Le Bars. Je vous remercie pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'examiner et de juger ce travail.

Aux Professeurs Jean Michel Scherrmann et Nathalie Charnaux. Je vous exprime ma profonde gratitude d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Dr. Jean-Baptiste Michel et Dr. Didier Letourneur de m'avoir donné l'opportunité de faire partie de l'équipe du laboratoire LVTS.

Un remerciement particulier à Faisal Al-Shoukr qui s'est énormément investi dans ce travail, qui m'a généreusement donné de son temps et de ses connaissances et qui m'a transmis sa passion pour la recherche. Merci pour tout ce que tu m'as appris. Je te suis infiniment reconnaissante.

Je remercie l'ensemble des équipes de Médecine Nucléaire, du laboratoire LVTS et de la Faculté de Médecine de Bichat avec qui j'ai eu la chance de travailler aussi bien en clinique qu'en recherche. Merci pour tout ce que vous m'avez appris. Je remercie particulièrement François Rouzet pour sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements et sa générosité humaine et scientifique. Khadija Ben Ali, merci pour ton soutien et tes encouragements tout au long de ces années.

Sébastien Leygnac, comme c'est enrichissant et passionnant de travailler avec toi ! Merci infiniment.

Walter Gonzalez, Alexandre Guez, Pr. Karoyan merci infiniment pour votre aide qui m'a été très précieuse.

Enfin je remercie mes amis: Beya, Amina, Nabila, Adnène, Mohamed Aymen, Elyes, Fehmi, Safa, Zahia, Emna, Michel, Faika, Hédi, Heythem, Meriem, Sofiane ... Qu'est-ce que je ferai sans vous!! Merci d'avoir toujours été là pour moi.

# TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX®	<b>?</b> ?
LISTE DES FIGURESE	<u>?</u> ?
ABRÉVIATIONS2	<u>?</u> ?
INTRODUCTION	<b>?</b> ?
CHAPITRE 1. INTÉRÊT DE LA TEP ET DU GALLIUM 682	<b>?</b> ?
23 255 2 255 2 26 27 2 26 2 26 2 26 2 26 2	??
	??
23 8 9 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 1	<b>??</b> ?
CHAPITRE 2. LE GALLIUM 682	<b>??</b> ?
	<b>??</b> ?
2 3 2 <sup>20</sup> 20 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	<b>??</b> ?
2. 29. 29. 29. 29. 29. 29. 29. 29. 29. 2	???
2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	???
	???
	????
[3][35][35][35][35][35][35][35][35][35][	?!?!?
	?!?!?
	?!?!?
	?!?!?
	<b>?!?</b> !?
	[?]?]?
	[?]?]?
	[?]?]?
2 22 23 2 3 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	<b>?!?</b> !?
	[?]?]?
	[?][?]
	<u></u>
	21212
and the second and the second and the second s	21212
	21212
	21212
בייייייייייייייייייייייייייייייייייייי	(1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1)
ביובינגריבייבי ביבינגריבייבי ביבינגריבייבי ביבינגריבייבי ביבינגריבייבי ביבינגריבייבי ביבינגריבייבי ביבינגריבייבייבי ביבינגריבייבייבי ביבינגריבייבייבי ביבינגריבייבייבי ביבינגריבייבייבי בי	בובובו הופו <b>כו</b>
	E E E
CHAPITRE 3. LES CIBLES MOLÉCULAIRES D'INTÉRÊTE	<mark>??</mark> ?
513 B 51 5 51 5 51 5 51 5 51 5 51 5 51 5	<b>??</b> ?
23 29 29 29 29 29 29 29 29 29 29 29 29 29	???

?

	???
SIN	???
21471472 (212) (21	???
??????????????????????????????????????	???
S. 25 (25 (27 (27 (27 (27 (27 (27 (27 (27 (27 (27	???
	???
5(3)(3)(3)(3)(3)(3)(3)(3)(3)(3)(3)(3)(3)(	???
(1)(1)(1)(1)(1)(1)(1)(1)(1)(1)(1)(1)(1)(	???
2. (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1)	???
2 (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1)	???
াসাদাদাদাদাদাদাদাদাদাদাদাদাদাদাদাদাদাদা	???
5. 19. 19. 19. 19. 19. 19. 19. 19. 19. 19	???
23 (1) (1) (2) (1) (2) (1) (2) (1) (2) (1) (2) (1) (2) (2) (2) (2) (2) (2) (2) (2) (2) (2	???
	???
2.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4	???
	???
2142142142142142142142142142142142142142	???
	???
	???
CHAPITRE 4. PARTIE EXPÉRIMENTALE®	<b>??</b> ?
CHAPITRE 4. PARTIE EXPÉRIMENTALE?	<mark>??</mark> ?
CHAPITRE 4. PARTIE EXPÉRIMENTALE?           2020	<b>??</b> ? ????
CHAPITRE 4. PARTIE EXPÉRIMENTALE?           2022	<b>??</b> ? ????
CHAPITRE 4. PARTIE EXPÉRIMENTALE2           2020         20202020202020202020202020202020202020	<b>??</b> ? ??? ???? ????
CHAPITRE 4. PARTIE EXPÉRIMENTALE?         2022 <td><b>??</b>? ??? ??? ??? ???</td>	<b>??</b> ? ??? ??? ??? ???
CHAPITRE 4. PARTIE EXPÉRIMENTALE2         2022       2022200000000000000000000000000000000	<b>22</b> <b>22</b> 222 222 222 222 222 222
CHAPITRE 4. PARTIE EXPÉRIMENTALE2         2022 <td>222 222 222 222 222 222 222 222 222 22</td>	222 222 222 222 222 222 222 222 222 22
CHAPITRE 4. PARTIE EXPÉRIMENTALE?         2022       2022	222 222 222 222 222 222 222 222 222 22
CHAPITRE 4. PARTIE EXPÉRIMENTALE2         2022       Description descripti description description description descripti	222 222 222 222 222 222 222 222 222 22
CHAPITEE 4. PARTIE EXPÉRIMENTALE2         2022       2022000000000000000000000000000000000	222 222 222 222 222 222 222 222 222 22
CHAPITRE 4. PARTIE EXPÉRIMENTALE?           2002         3000000000000000000000000000000000000	<ul> <li>272</li> <li>272</li></ul>
CHAPITRE 4. PARTIE EXPÉRIMENTALE2           2000         Description	2)2) 2)2)2 2)2(2)2 2)2(2)2 2)2(2)2)2 2)2(2)2)2 2)2(2)2)2 2)2(2)2)2 2)2(2)2)2 2)2(2)2(2)2)2(2)2(2)2)2(2)2(2)2)2(2
CHAPITRE 4. PARTIE EXPÉRIMENTALEE         2012       Demonstration entropendation entropen	<ul> <li>222</li> <li>223</li> <li>224</li> <li>224</li></ul>
CHAPITRE 4. PARTIE EXPÉRIMENTALE2         222222         222222         222222         2222222         2222222         2222222         22222222         22222222         2222222222         2222222	2)2) 2)2) 2)2)2 2)2 2 2)2 2 2)2 2 2 2)2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
CHAPITRE 4. PARTIE EXPÉRIMENTALES         2019       Description de prime management de commune de	<ul> <li>2) 2) 2)</li> <li>2)</li></ul>
CHAPITRE 4. PARTIE EXPÉRIMENTALE2           2012         >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>	222 222 222 222 222 222 222 222 222 22
CHAPITRE 4. PARTIE EXPÉRIMENTALE2         Dible boo momentation momentation concernance         Dible boo momentation momentation concernance         Dible boo momentation momentation concernance         Dible boo momentation concernance         Dible b	212 222 222 222 222 222 222 222 222 222

???????????????????????????????????????	2 (\$) (\$) (\$) (\$) (\$) (\$) (\$) (\$) (\$) (\$)	<u> ????</u> ?
???????????????????????????????????????	? ????????????????????????????????????	2.5.5.5
???????????????????????????????????????	??????????????????????????????????????	?????
???????????????????????????????????????	99 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9	<u>[]]]</u>
???????????????????????????????????????	55151515151515151515151515151515151515	?????
???????????????????????????????????????	5.5555555 444 44 44 44 44 44 44 44 44 44 4	[3]
???????????????????????????????????????	66644444444444444444444444444444444444	<u>[]]]</u>
???????????????????????????????????????	<u>5555555555555555555555555555555555555</u>	<u>[]]]</u>

2 (1) (1) (2) (2) (2) (2) (2) (2) (2) (2) (2) (2	?????
	????
<del>ព្រះអារាមអាម្នារាខ្មារជារាខ្មារជារា</del> ទ្ធា <del>រជារ</del> ទាទៅក្នុងទៅទាំង ស្រុក នៅទាំង នៅ	????
	????
াসসময়াসমান বিষয়ে আৰু প্ৰাৰম্ভ প্ৰাৰম্ভ with esis, gallium labelling and characterization of P04087 🛛	????
2 (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1)	????
	????
<del>ព្រះអារាអារាអាញ]ាក្នាត្រាវារា</del> ាអ្នយដារដែល of a low molecular weight fucoidan?	????
2.2.2.2.2.2.2.2.2.2.2.2.2.2.2.2.2.2.2.	????
22237777777777777777777777777777777777	????
29999292929292929292929292929292929292	????
5. 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19	????
21111111111111111111111111111111111111	????
<i>, ,</i>	
CHAPITRE 5. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	<b>???</b> ?
CONCLUSION GÉNÉRALE	<b>???</b> ?
BIBLIOGRAPHIE	[ <b>?</b> ][ <b>?</b> ][ <b>?</b> ]
PRODUCTION SCIENTIFIQUE	<b>???</b> ?
[2][3]] [2] [2][3][3][3][3][3][3][3][3][3][3][3][3][3]	?????
9399 2 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8	????
	????
9399 936 9 8 8 8 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9	????
<u>RÉSUMÉ</u>	<b>???</b> ?
ABSTRACT	<b>???</b> ?

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Emetteurs de positons produits par cyclotron.    112
Tableau 2. Emetteurs de positons issus de générateurs
Tableau 3. Les réactions nucléaires de production du 68Ge    142
Tableau 4. Mesure de la régénération du <sup>68</sup> Ga dans le générateur <sup>68</sup> Ge/ <sup>68</sup> Ga       192
Tableau 5. Quelques caractéristiques du gallium
Tableau 6. Constantes de formation des complexes de Ga(III) avec divers ligands
Tableau 7. Valeurs du pM et du K <sub>ML</sub> de différents agents chélatant le gallium
Tableau 8. Comparaison des caractéristiques physiques du gallium et du fer
Tableau 9. Chélatants acycliques du 68Ga
Tableau 10. Chélatants cycliques du 68Ga
Tableau 11. Dérivés du NOTA    392
Tableau 12. Stratégies de conjugaison du chélatant à la molécule vectrice
Tableau 13. Tampons utilisés pour le marquage au gallium
Tableau 14. Principales caractéristiques des récepteurs à la somatostatine
Tableau 15. Caractéristiques de différents analogues de la somatostatine utilisés en imagerie clinique         812
Tableau 16. Rendements de purification cationique et teneurs en 68       Ge des éluats obtenus à partir des générateurs de qualité chimique et de qualité pharmaceutique
Tableau 17. Elution fractionnée (rendement de concentration et pureté radionucléidique). 1032
Tableau 18. Préparation du chlorure de gallium 67 à partir de solutions de citrate de gallium.
Tableau 19. Caractérisation d'éluats purifié par méthode cationique       1292
Tableau 20. Résultats des lots de validation du dossier de médicament expérimental 68Ga- DOTANOC       68Ga- 1292
Tableau       21. Résultats des productions du <sup>68</sup> Ga-DOTANOC pour l'essai clinique multicentrique (n=14)
Tableau 22. Résultats préliminaires de la sensibilité de la TEP au 68Ga-DOTANOC parrapport à la TDM et à la scintigraphie à l'Octréoscan <sup>®</sup> .1312

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> (A) Emission à 180° de deux photons à 511 keV produits suite à l'annihilation du positon avec un électron. (B) Détection des photons d'annihilation par la caméra TEP
Figure 2. Désintégration du positon et réaction d'annihilation
Figure 3. Evènements mesurés en TEP
Figure 4. Filiation nucléaire du <sup>68</sup> Ga
Figure 5. Les différents générateurs <sup>68</sup> Ge/ <sup>68</sup> Ga développés au cours du temps
Figure 6. Cinétique séculaire d'un générateur <sup>68</sup> Ge/ <sup>68</sup> Ga
Figure 7. Cinétique de formation du gallium 68 dans un générateur <sup>68</sup> Ge/ <sup>68</sup> Ga 1812
Figure 8. Comportement de la résine de type $Me^{IV}O_2$ en fonction du pH182
<b>Figure 9.</b> Profils d'échange du Ga(III) et du Ge(IV) au niveau d'une résine de type $Me^{IV}O_2^-$ (Me est dans ce cas du Zirconium hydraté) en fonction du pH
Figure 10. Présentation schématique des prétraitements de l'éluat d'un générateur <sup>68</sup> Ge/ <sup>68</sup> Ga.
Figure 11. Diagramme E-pH du système Ga-OH, T=25°C, [Ga]=10 <sup>-10</sup> M, P=10 <sup>5</sup> Pa
<b>Figure 12.</b> Distribution des différentes espèces de Ga en milieu aqueux en fonction du pH à 25°C
Figure 13. Diagramme de solubilité des oxydes de gallium
Figure 14. LogK <sub>ML</sub> de différents ligands de gallium
<b>Figure 15.</b> Représentation schématique sur une échelle comparative des log K <sub>ML</sub> et des pM de certains chélatants de gallium
Figure 16. Présentation schématique des chélateurs de gallium en fonction du pH de marquage
<b>Figure 17.</b> Représentation schématique des sources de démétallation possibles des vecteurs marqués avec des isotopes métalliques une fois administrés à l'état de traces : protéines de réserve (ferritine) ; protéine de transport (transferrine, lactoferrine, métallothionéine) ; enzymes (ceruloplasmine, superoxyde dismutase)
Figure 18. Structure de la PS
<b>Figure 19.</b> Mécanisme de la distribution des phospholipides au niveau des membranes du RE (réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi et de la membrane plasmique (MP) en situation physiologique
Figure 20. Implication de la PS dans la coagulation sanguine (A) et dans l'apoptose cellulaire (B)
Figure 21. Structure de l'annexine A5
Figure 22. Structure de la P-sélectine

Figure 23. Interaction P-sélectine-PSGL-1
Figure 24. Structure schématique du fucoïdane extrait d'Ascophyllum nodosum
<b>Figure 25.</b> Structures peptidiques des deux formes physiologiques actives de la somatostatine : SS-14 et SS-28
Figure 26. Diagramme schématique des voies de signalisation faisant suite à la liaison de la somatostatine à ses récepteurs.       752
<b>Figure 27</b> . Relation structure-affinité – Effet de la modification de la structure de l'analogue de la somatostatine sur l'affinité du peptide pour les sst <sub>2</sub> , sst <sub>3</sub> et sst5
Figure 28. Effet du changement du métal sur l'affinité du DOTANOC
<b>Figure 29.</b> Relation structure-affinité de l'octréotide et du TOC, effet du changement du chélatant et du métal sur l'IC <sub>50</sub> au niveau de sst2, sst3 et sst5
Figure 30. Rendement d'élution du générateur Obninsk <sup>®</sup> (pendant 309 jours) et du         Pharmagrade generator (pendant 497 jours)         892
<b>Figure 31.</b> Diagramme de purification anionique de l'éluat de <sup>68</sup> Ga sur module de synthèse FasLab® utilisant une résine PS-HCO <sub>3</sub>
<b>Figure 32.</b> Radiochromatogrammes d'une solution de citrate de gallium 67 (A) et d'une solution de chlorure de gallium 68 (B) analysés par ITLC-SG et une solution d'acétate de Na 0,4M pH 4,5
<b>Figure 33.</b> Diagramme de production automatique de <sup>67</sup> GaCl <sub>3</sub> à partir de citrate de gallium 67 utilisant le module de synthèse MiniAllInOne de Trasis
Figure 34. Structure chimique du DOTANOC
Figure 35. Diagramme de production de la substance active <sup>68</sup> Ga-DOTANOC
<b>Figure 36.</b> Diagramme schématique des cassettes de production automatique du <sup>68</sup> Ga- DOTANOC au niveau du module de synthèse MiniAllInOne de Trasis
<b>Figure 37.</b> Imagerie au <sup>68</sup> Ga-DOTANOC vs <sup>111</sup> In-Octreoscan® chez un patient présentant une tumeur neuroendocrine pancréatique avec suspicion de métastases hépatiques
Figure 38. Structure chimique du NODAGANOC
Figure 39. Radiochromatogramme typique du <sup>68</sup> Ga-NODAGANOC obtenu par « vacuum elution »
Figure 40. Spectre RMN de l'Asphy-NODAGA

# **ABRÉVIATIONS**

- ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé.
- BPA : bromopropylamine
- BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication
- CLHP : chromatographie liquide haute pression (ou HPLC)
- CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse
- CQ : Contrôle Qualité
- GMP : Good Manufacturing Practices
- GS: Gold Standard
- Ks : Constante de solubilité (Eng : Ksp : Solubility Product Constant)
- K<sub>ML</sub> : constante de stabilité du complexe métal-ligand
- LPTs : protéines de transport des lipides
- PC : la phosphatidylcholine
- PE : phosphatidyléthanolamine
- PET : Positron Emission Tomography
- PS : Phosphatidylsérine
- PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand-1
- PSMA : Prostate-specific membrane antigen
- RCPG : récepteurs couplés aux protéines G
- RE : Réticulum Endoplasmique
- SM : sphingomyéline
- TE-GEP : Tumeurs Endocrines Gastro-entéro-pancréatiques
- TEP : Tomographie par Emission de Positons
- SPECT : Single Photon Emission Computed Tomography
- TEMP : Tomographie par Emission MonoPhotonique
- DOTA 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid
- NOTA 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid
- Rf: Retardation factor
- SLe<sup>x</sup> : Sialyl Lewis x
- SPECT/CT : Single Photon Emission Computed Tomography/Computed tomography

- TED : tumeurs endocrines digestives différenciées
- TE-GEP: Tumeurs endocrines gastro-entéro-pancréatiques
- TIF : Test d'intégrité du filtre
- TDM : tomodensitométrie ou scanner

**INTRODUCTION** 

La tomographie par émission de positons est une technique d'imagerie moléculaire qui présente de meilleures performances en matière de sensibilité, quantification et résolution spatiale que l'imagerie monophotonique. Elle a vu son utilisation largement étendue surtout depuis l'arrivée sur le marché du [<sup>18</sup>F]-FDG ou fluorodésoxyglucose. [1] Le fluor 18 constitue l'isotope phare de cette modalité d'imagerie moléculaire en raison du faible libre parcours moyen des positons dans la matière avant l'annihilation et donc d'une meilleure résolution spatiale. Cependant, les contraintes de sa production et sa demi-vie de 110 minutes limitent les développements des traceurs fluorés aux seuls centres qui sont équipés de cyclotron. Le gallium 68, un autre radioélément émetteur de positons est le produit de décroissance d'un radioélément-père de longue période : le germanium 68. Sa formulation sous forme de générateur <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga le rend accessible aux centres dépourvus de cyclotrons et leur permet de réaliser sur site la production de vecteurs pour un usage en imagerie TEP clinique ou préclinique. Plusieurs études cliniques menées ces dernières années avec des vecteurs marqués au <sup>68</sup>Ga ont permis d'améliorer les performances diagnostiques des examens d'imagerie nucléaire et la prise en charge thérapeutique des patients. A titre d'exemple, en cas de suspicion de tumeurs neuroendocrines, l'examen d'imagerie nucléaire prescrit est la scintigraphie à l'<sup>111</sup>In-Pentétréotide, un analogue de la somatostatine qui cible les récepteurs de la somatostatine surexprimés dans ces pathologies. Cet examen présente cependant des limites diagnostiques et ne permet pas de détecter toutes les lésions de petite taille qui sont présentes. L'amélioration de la prise en charge des patients dans le cadre de ces tumeurs est possible grâce à la mise en place d'un examen TEP avec un analogue de la somatostatine marqué au gallium 68. Cette mise en place nécessite le développement préalable du vecteur d'intérêt.

Par ailleurs, notre équipe a pour objectif le développement de ligands d'imagerie moléculaire en pathologie cardio-vasculaire, afin de visualiser et quantifier les processus pathologiques impliqués tels que le thrombus, la plaque d'athérome, l'inflammation myocardique et vasculaire, la mort cellulaire ou la fibrose. Plusieurs ligands originaux ou issus de l'industrie sont en cours de développement et/ou d'évaluation préclinique et clinique. La stratégie adoptée est la validation de la pertinence de la cible dans des modèles animaux en imagerie TEMP préclinique, puis le marquage par un émetteur de positons accessible à notre centre

(<sup>68</sup>Ga) en cas de preuve de concept préclinique positive et si l'indication clinique requiert cette modalité d'imagerie.

C'est dans ce contexte général de développement de traceurs marqués au gallium 68 que s'inscrit l'objectif principal de ma thèse. Pour expliquer la stratégie générale de développement qui sera adoptée, une partie <u>bibliographique</u> traitera de la chimie du gallium et des cibles et vecteurs d'intérêt. Trois cibles moléculaires particulièrement intéressantes dans les pathologies cardiovasculaires seront décrites :

- Les récepteurs de la somatostatine qui sont surexprimés dans les tumeurs neuroendocrines mais aussi dans les pathologies cardiovasculaires à composante inflammatoire telles que l'athérosclérose ou la myocardite
- La phosphatidylsérine, un marqueur de l'apoptose cellulaire et de l'activation plaquettaire
- La P-Sélectine, un marqueur de l'activation plaquettaire et de l'activation endothéliale.

Comme prérequis indispensable à ce développement, la première partie <u>des travaux de thèse</u> sera consacrée à la mise en place d'outils et de méthodes de marquage au gallium 68. Ces outils et méthodes seront utilisés dans la deuxième partie de ces travaux pour le marquage de vecteurs d'intérêt originaux en vue d'une utilisation préclinique ou clinique :

- le DOTANOC et le NODAGANOC : deux analogues de la somatostatine pour le ciblage des récepteurs de la somatostatine,
- le P04087 : un peptide ciblant la phosphatidylsérine,
- L'Asphy-NODAGA (fucoïdane) : un polysaccharide ciblant la P-sélectine

# CHAPITRE 1. INTÉRÊT DE LA TEP ET DU GALLIUM 68

Après une introduction des notions générales d'imagerie moléculaire et de traceurs, et une définition succincte de la première technique d'imagerie radioisotopique, la TEMP, ce chapitre traite plus en détail de la technologie TEP et des arguments qui nous ont poussés à choisir le gallium 68 pour le développement de méthodes de marquage pour ce type d'imagerie.

### 1.1. L'imagerie moléculaire, notion de traceur

Complémentaire de l'imagerie anatomique qui ne visualise que la structure des tissus ou des organes, l'imagerie moléculaire étudie directement le rôle des molécules dans le fonctionnement des cellules, tissus et organes en utilisant les techniques à base des radioéléments mais également les procédés optiques, magnétiques (IRM) ou acoustiques (échographie). [2], [3]

Quelle que soit la technique employée, celle-ci ne doit pas perturber le processus étudié. D'où la notion de traceur, décrite pour la première fois par George Charles de Hevesy en 1923. Un traceur est une substance qui est introduite dans un système biologique à des quantités très faibles et pouvant être suivie tout au long du processus étudié. [4]

Les techniques pouvant être utilisées dans un but d'imagerie moléculaire diffèrent par un certain nombre de paramètres : la sensibilité, la résolution spatiale, la résolution temporelle, la profondeur de pénétration, ...[5]

Les techniques nucléaires présentent l'avantage d'une grande sensibilité, les rendant particulièrement adaptées à l'imagerie moléculaire. En médecine nucléaire, un traceur est composé d'un vecteur permettant le ciblage et d'un radionucléide dont la désintégration entraîne l'émission de rayonnements. En fonction de la nature de l'émission, le traceur peut être utilisé à des fins diagnostiques, thérapeutiques ou en vue d'étudier la pharmacocinétique d'une substance donnée.

On distingue deux techniques d'imagerie en médecine nucléaire :

- la TEMP ou Tomographie par Emission Monophotonique, (SPECT en anglais : Single Emission Computed Tomography), est la plus ancienne des deux techniques d'imagerie nucléaire. [6] Elle nécessite l'administration chez le patient d'un radiopharmaceutique émetteur de rayonnements gamma. La détection de la distribution de ce traceur nécessite le recours à des gamma-caméras qui sont équipées de détecteurs en rotation autour du sujet.

- la TEP ou Tomographie par Emission de Positon (PET en anglais : Positron Emission Tomography).[4]

### 1.2. La Tomographie par Emission de Positons (TEP) : principe et intérêt

La TEP est une modalité d'imagerie médicale qui mesure la distribution tridimensionnelle d'une molécule marquée par un émetteur de positons ou positrons (<sup>†</sup>). L'acquisition est réalisée par un ensemble de détecteurs répartis autour du patient. Les détecteurs sont constitués d'un scintillateur qui est choisi en fonction de nombreuses propriétés, pour améliorer l'efficacité et le rapport signal sur bruit. Les caméras TEP sont des tomographes par émission de positon.[7]

Les images en TEP sont le résultat de la détection en coïncidence à 180° des photons à 511keV, produits suite à l'annihilation du positon avec un électron de la matière. (Figure 1) Les évènements enregistrés sont reconstruits en images qui représentent la distribution spatiale des sources radioactives dans l'organisme.[4]



Figure 1. (A) Emission à 180° de deux photons à 511 keV produits suite à l'annihilation du positon avec un électron. (B) Détection des photons d'annihilation par la caméra TEP. [4]

L'information mesurée correspond au lieu d'annihilation et non à celui de 📑. La distance entre ces deux lieux est appelée libre parcours moyen du positon, elle est déterminée par l'énergie d'émission des positons, et constitue une limite en termes de résolution spatiale.

Il existe une autre limite intrinsèque, en termes de résolution spatiale en TEP. Celle-ci est le résultat de la non- colinéarité des deux photons de 511 keV, faisant suite à l'annihilation d'un positon qui n'a pas intégralement perdu son énergie cinétique. Ce défaut de colinéarité peut être de l'ordre de 0,5° (Figure 2).[7]



**Figure 2. Désintégration du positon et réaction d'annihilation.** Une fois émis, le positon ( ) parcourt quelques millimètres (d) dans les tissus, où il perd toute son énergie cinétique. Quand le positon est pratiquement au repos, il interagit avec un électron (e) du milieu, suivant une réaction d'annihilation au cours de laquelle la masse des deux particules se transforme en deux photons gamma () de 511 keV, émis dans des directions opposées.[7]

L'utilité de la TEP et de la TEMP pour la détection des traceurs radiomarqués et pour l'évaluation qualitative de la distribution des radiopharmaceutiques a été démontrée dans de nombreuses études. Cependant, lorsqu'une évaluation quantitative est recherchée, la précision de l'imagerie TEMP est limitée suite à l'atténuation par les tissus de l'organisme, des photons de faible énergie. L'intensité du signal détecté n'est alors pas un indicateur fiable de la concentration du traceur réellement présente. [5] La correction d'atténuation utilisée en TEP permet de contourner ce problème ce qui permet une quantification précise des images. [4] La correction des phénomènes physiques fournit une image représentative de la distribution du traceur (Figure 3). [7] L'imagerie TEP présente aussi le grand avantage d'être beaucoup plus sensible que la TEMP, elle permet de détecter un traceur présent à des concentrations picomolaires. [8] D'où notre intérêt pour le développement de traceurs pour l'imagerie TEP.



Figure 3. Evènements mesurés en TEP. [9]

# 1.3. Choix de l'émetteur de positons

Les émetteurs de positons sont déficitaires en neutrons. Certains sont produits dans des accélérateurs de particules (essentiellement des cyclotrons) (Tableau 1). [3],[10],[11] D'autres sont disponibles sous forme de générateur (Tableau 2). [12]

Radionucléide	Demi-vie	E <sub>max</sub> (□⁺) keV	Décroissance ☐ <sup>†</sup> (%)	Libre parcours maximal dans l'eau (mm)	Libre parcours dans l'eau (mm)	Production
<sup>11</sup> C	20,4 min	961	99	3,9	1,1	Cyclotron
<sup>13</sup> N	9,96 min	1190	100	5,1	1,5	Cyclotron
<sup>15</sup> O	2,05 min	1732	100	7,9	2,7	Cyclotron
<sup>18</sup> F	110 min	634	97	2,3	0,6	Cyclotron
<sup>52</sup> Fe	8,2 h	800	57			Cyclotron
<sup>64</sup> Cu	12,7 h	656	19	2		Cyclotron
<sup>66</sup> Ga	9,49 h	4153	56	20		Cyclotron
<sup>76</sup> Br	16,1 h	1310	54	20	5	Cyclotron
<sup>86</sup> Y	14,7 h	3150	32	6		Cyclotron
<sup>124</sup> I	4,18 jours	2100	22	7		Cyclotron
<sup>44</sup> Sc	3,97 h	1157	98,95			Cyclotron ou Générateur ( <sup>44</sup> Ti)

Tableau 1. Emetteurs de positons produits par cyclotron.

#### Tableau 2. Emetteurs de positons issus de générateurs

Générateur	Radioélément père	Radioélément fils			
	t <sub>1/2</sub>	t <sub>1/2</sub>	β <sup>+</sup> (%)	$E_{\beta}^{+}$ (MeV)	Principale application
<sup>82</sup> Sr/ <sup>82</sup> Rb	25,6 j	1,27 min	95,43	1,479	Perfusion
<sup>140</sup> Nd/ <sup>140</sup> Pr	3,37j	3,39min	51	1,067	Perfusion
<sup>118</sup> Te/ <sup>118</sup> Sb	<u>6</u> j	3,6min	73,5	1,186	Perfusion
<sup>122</sup> Xe/ <sup>122</sup> I	20,1h	3,63min	78	1,41	Marquage
<sup>128</sup> Ba/ <sup>128</sup> Cs	2,43j	3,62min	68,9	1,27	Perfusion
<sup>134</sup> Ce/ <sup>134</sup> La	3,16j	6,45min	64	1,206	Perfusion
<sup>62</sup> Zn/ <sup>62</sup> Cu	9,26h	9,673min	97,43	1,314	Marquage ; perfusion
<sup>52</sup> Fe/ <sup>52m</sup> Mn	8,275h	21,1min	95	1,17	Perfusion
<sup>68</sup> Ge/ <sup>68</sup> Ga	270,95j	67,71min	89,14	0,8295	marquage
<sup>110</sup> Sn/ <sup>110m</sup> In	4,11h	69,1min	63	1,04	Marquage
<sup>44</sup> Ti/ <sup>44</sup> Sc	60 ans	3,97h	94,27	0,632	Marquage
<sup>72</sup> Se/ <sup>72</sup> As	8,4j	26h	87,8	1,17	Marquage

Le choix du radionucléide dépend :

- 1-de la période physique du radionucléide qui doit être assez longue pour permettre la production et l'utilisation du radiotraceur, et pas très longue par rapport à la demi-vie biologique afin d'éviter une irradiation inutile du patient.
- 2- du mode de désintégration
- 3- de la radiochimie du traceur
- 4- de la disponibilité et du coût [11]
- 5- de la cinétique du traceur.

Le développement de traceurs marqués par des isotopes produits dans des accélérateurs n'est accessible qu'aux centres qui sont pourvus de cet équipement très couteux et réglementairement très contraignant. La période radioactive, relativement brève du <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>N,

<sup>15</sup>O empêche l'utilisation des molécules marquées par ces isotopes à distance du site de production. La demi-vie de 110 minutes est assez longue pour permettre le transport et l'utilisation des molécules marquées au fluor 18 dans des centres cliniques à proximité du cyclotron. [7] Par ailleurs, l'énergie cinétique d'émission des positons conditionne le libre parcours de cette particule avant la réaction d'annihilation. [7] Plus l'énergie du positon est faible, meilleure est la résolution spatiale, ce qui fait du fluor l'isotope de choix en imagerie TEP.

Cependant, les traceurs disponibles sous forme de générateur et malgré des énergies de positons plus élevées et donc une résolution spatiale entrainant des images de moindre qualité, présentent le grand avantage d'être accessibles aux centres dépourvus de cyclotrons. Quand la demi-vie n'est que de quelques minutes, le développement chimique et le marquage de vecteurs d'intérêt devient difficile voire infaisable. Seule une perfusion continue au patient peut être envisagée (cas du Rubidium 82, utilisé en imagerie TEP pour l'étude de la perfusion myocardique de stress et de repos). De tous les générateurs listés dans le Tableau 2, le <sup>44</sup>Ti/<sup>44</sup>Sc, le <sup>110</sup>Sn/<sup>110m</sup>In et le <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga présentent les périodes les plus intéressantes (assez longues pour permettre un développement chimique et pas trop longue ce qui rend la dosimétrie plus avantageuse). La période du radioélément père (<sup>110</sup>Sn) est courte ce qui rend la durée d'utilisation du générateur limitée dans le temps.

Le générateur de gallium 68 présente des avantages par rapport à celui du scandium 44 (Rendements d'élutions plus élevés, volumes d'élutions moindres, activités disponibles beaucoup plus élevées, activités spécifiques du <sup>68</sup>Ga deux fois plus élevées. [13] La teneur de l'éluat de <sup>44</sup>Sc est par ailleurs faible en radioélément père : 90Bq dans 20 mL, cependant la période du <sup>44</sup>Ti est très longue : 60 ans et celui-ci émet des photons à 1156 KeV [14]). [12]

La période du gallium 68 est par ailleurs beaucoup plus adaptée aux cinétiques des vecteurs peptidiques et polysaccharidiques auxquels nous nous intéressons dans ce travail. Cette période peut être insuffisante pour un ensemble d'investigations nécessaires pour la validation du traceur après sa production (études de biodistribution, cinétique, stabilité *in vitro* et *in vivo*...). Dans ce cas, il est possible de recourir au <sup>67</sup>Ga, un radioisotope du gallium, émetteur gamma de plus longue période (3,26 jours). Les générateurs de <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga sont en plus plus facilement accessibles dans le commerce.

Tous ces paramètres ont conduit au choix du gallium 68 comme émetteur de positon pour le développement de traceurs moléculaires en vue d'une utilisation en imagerie TEP.

### **CHAPITRE 2. LE GALLIUM 68**

Ce deuxième chapitre a pour objectif de passer en revue l'état des connaissances sur le gallium 68 depuis sa production et sa formulation sous forme de générateur jusqu'à son utilisation pour le marquage des vecteurs d'intérêt. Un paragraphe sera consacré à la chimie de complexation du gallium. La compréhension des contraintes et des exigences de cette chimie nous aidera à fixer la stratégie de développement des traceurs marqués au gallium.

## 2.1. Introduction

Le gallium existe à l'état naturel sous forme de deux isotopes : le  $^{69}$ Ga (60,1%) et le  $^{71}$ Ga avec une abondance naturelle de 39,9%.

Trois radioisotopes peuvent être utilisés pour la production de radiopharmaceutiques. Le <sup>67</sup>Ga  $(T_{1/2} = 78h)$  se désintègre par émission  $\Box$  et est donc utilisé en TEMP. Les deux autres isotopes, le <sup>66</sup>Ga  $(T_{1/2} = 9,49h)$  et <sup>68</sup>Ga  $(T^{1/2} = 67,7 \text{ minutes})$  se désintègrent pas émission  $\Box^+$  et sont donc utilisables en TEP. [11]

Le <sup>68</sup>Ga peut être produit dans des cyclotrons en utilisant les réactions nucléaires suivantes : <sup>69</sup>Ga(n, 2n)<sup>68</sup>Ga [15] ou <sup>66</sup>Zn( $\Box$ , 2n) <sup>68</sup>Ga. [16] Mais il est le seul à être aussi disponible à partir d'un générateur et peut de ce fait être utilisé dans des centres dépourvus de cyclotron. C'est grâce à la production du <sup>68</sup>Ga(III) à partir d'un radioélément père, le <sup>68</sup>Ge(IV) de période assez longue et de propriétés chimiques assez différentes du fils, que celui-ci peut être formulé sous forme de générateur. [17] Le <sup>68</sup>Ge a une demi-vie de 270,95 jours et décroît uniquement par capture électronique en <sup>68</sup>Ga. Ce dernier décroît en <sup>68</sup>Zn stable, à 89% par émission de positons d'énergie maximale 1,9 MeV et dans 11% des cas par capture électronique. [11]



Figure 4. Filiation nucléaire du <sup>68</sup>Ga. [18]

# 2.2. Le générateur <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga

#### 2.2.1. Production

Le <sup>68</sup>Ge peut être produit dans des réacteurs nucléaires ou dans des cyclotrons. [11] Plusieurs réactions nucléaires peuvent être utilisées : [19]

Particule	Réaction nucléaire	Nucléide cible
Proton	(p,2n)	<sup>69</sup> Ga
Proton	(p,xn), x=2, 4	<sup>nat</sup> Ga ( <sup>69,71</sup> Ga)
Proton	(p,pxn)	natGe
Proton	(p, xnyp) y = 2, 4, 6	<sup>71</sup> As ; <sup>79,81</sup> Br; <sup>85,87</sup> Rb
Deutéron	(d,3n)	<sup>69</sup> Zn
Hélium-4	(a, 2n)	<sup>66</sup> Zn
Hélium-3	$({}^{3}\text{He}, \text{xn}) \text{ x} = 1, 2, 3$	66,67,68Zn

Tableau 3. Les réactions nucléaires de production du 68Ge

Depuis 2001, l'Agence Internationale d'Energie Atomique (AIEA) a adopté le protocole utilisant la réaction nucléaire suivante :  $Ga(p, 2n)^{68}Ge$  pour la production de générateur à visée médicale. [20] En effet cette réaction permet d'obtenir le meilleur rendement de production. [19] La chimie de purification du germanium est par ailleurs beaucoup plus simple si la cible utilisée est du gallium comparativement au zinc.[21] Les cibles de gallium naturel peuvent être utilisées sous différentes formes chimiques : du gallium métal [22] ; du gallium métal encapsulé dans du niobium [23] ; alliage Ga/Ag [24] ; Nickel de gallium (Ga<sub>4</sub>Ni) [25]; Oxyde de gallium (Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) [21] ; Ga<sub>2</sub>O [26]

Le <sup>68</sup>Ge ainsi produit puis purifié est accroché sur une résine dont le matériau doit répondre à certaines caractéristiques. La matrice du générateur doit être à base de matériau non toxique [27], stable au contact de l'éluant et résistante à l'irradiation [28] afin d'éviter le relargage dans l'éluat d'impuretés métalliques susceptibles d'entrer en compétition avec le <sup>68</sup>Ga lors des réactions de marquage. Cette résine doit par ailleurs présenter une sélectivité de rétention du radioélément père par rapport au radioélément fils. Un échangeur d'ions est en fait caractérisé aussi bien par son coefficient de distribution appelé également coefficient de partage que par sa sélectivité vis-à-vis des ions à échanger. Cette sélectivité peut être exprimée par la constante de sélectivité ou d'échange caractéristique de la réaction d'échange ionique qui est réversible :

 $m A_{(r)}^n + n B_{(s)}^m \leftrightarrow m A_{(s)}^n + n B_{(r)}^m$ 

Avec :

[A<sup>n</sup>]<sub>(r)</sub> = la concentration de l'espèce ionique A sur la résine ;

 $[B^m]_{(s)} =$  la concentration de l'espèce ionique B en solution ;

n et m = les charges portées respectivement par l'espèce ionique A et par l'espèce B (n, m = 1, 2 ou 3) ;

Et la constante d'équilibre peut s'écrire :

$$K = \frac{\left[A_{(s)}^{n}\right]^{m} \times \left[B_{(r)}^{m}\right]^{n}}{\left[A_{(r)}^{n}\right]^{m} \times \left[B_{(s)}^{m}\right]^{n}}$$

[29]

Le premier générateur a été décrit par Cleason en 1960. La matrice de la colonne était constituée de  $Al_2O_3$  et l'élution se faisait par de l'EDTA. Le gallium 68 était alors récupéré sous forme de complexe et il fallait le décrocher de son complexe avec l'EDTA avant de le fixer au ligand d'intérêt.

Plusieurs générateurs ont été développés depuis et les générateurs actuellement sur le marché sont constitués de matrice minérale (dioxyde de Titane  $TiO_2^-$ , ou dioxyde d'étain  $SnO_2^-$ ) ou encore de matrice organique [30] (Par exemple la résine de formaldéhyde de pyrogallol [31] ou encore celle à base du copolymère styrène–divinylbenzène contenant des groupes N-méthylglucamine). [32] (Figure 5)



Figure 5. Les différents générateurs <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga développés au cours du temps Schéma de [30], adapté et complété à partir de [28], [31], [32] et [33].

Les générateurs développés sont tous de qualité chimique jusqu'en 2015, date de l'obtention de l'autorisation sur le marché d'un premier générateur de qualité pharmaceutique fabriqué selon les bonnes pratiques de fabrication.

#### 2.2.2. Principe de fonctionnement

#### 2.2.2.1. Formation du gallium 68

La décroissance du radioélément père <sup>68</sup>Ge en son radioélément fils <sup>68</sup>Ga est définie par l'équation :

 $dN_{Ge}/dt = -\lambda_{Ge}N_{Ge}$  dont la solution est :  $N_{Ge} = N_{Ge}^0 e^{-\lambda_{Ge}t}$ 

 $\lambda$  étant la constante radioactive et N le nombre d'atomes du radionucléide au temps t avec  $\lambda = \frac{Ln2}{t_{1/2}}$  et t<sub>1/2</sub> la période. N<sup>0</sup> est le nombre d'atomes au temps zéro.

Le radioélément fils (dans ce cas le gallium 68) résulte de la décroissance du radioélément père (le germanium 68) selon l'équation :  $\lambda_{Ge} N_{Ge}$ . Cependant, il décroît lui-même selon l'équation  $\lambda_{Ga} N_{Ga}$ .

La production de <sup>68</sup>Ga résulte donc de l'apport de gallium  $\lambda_{Ge} N_{Ge}$  par la décroissance du germanium et de la décroissance du gallium  $\lambda_{Ga} N_{Ga}$ :

$$\frac{dN_{Ga}}{dt} = \lambda_{Ge} N_{Ge} - \lambda_{Ga} N_{Ga}$$

La solution de cette équation différentielle peut donc s'écrire :

$$N_{Ga}^{t} = N_{Ga}^{0} e^{-\lambda_{Ga}t} + \frac{\lambda_{Ge}}{\lambda_{Ga} - \lambda_{Ge}} N_{Ge}^{0} (e^{-\lambda_{Ge}t} - e^{-\lambda_{Ga}t})$$
[19]

Ou encore

$$A_{Ga}^{t} = A_{Ga}^{0} e^{-\lambda_{Ga}t} + \frac{\lambda_{Ga}}{\lambda_{Ga} - \lambda_{Ge}} A_{Ge}^{0} (e^{-\lambda_{Ge}t} - e^{-\lambda_{Ga}t})$$

 $A_{Ga}^{0}$  est l'activité de <sup>68</sup>Ga restant dans le générateur immédiatement après une élution.  $A_{Ga}^{t}$  est l'activité de gallium 68 présente dans le générateur à un temps t après la dernière élution. [34] Quand le radioélément père a une période plus longue que celle du fils, la constante radioactive du fils est alors plus grande. Le terme  $e^{-\lambda Gat}$  devient négligeable devant  $e^{-\lambda Get}$ .

Et le terme  $N_{Ga}^{0} e^{-\lambda_{Ga}t}$  peut être négligé pour un temps t assez grand

Le nombre d'atomes de gallium dans le générateur peut alors s'écrire :

$$N_{Ga} = \frac{\lambda_{Ge}}{\lambda_{Ga} - \lambda_{Ge}} N_{Ge}^0 e^{-\lambda_{Ge} t}$$

Comme le nombre d'atomes de germanium est  $N_{Ge} = N_{Ge}^0 e^{-\lambda_{Ge}t}$ , on trouve le rapport :

$$\frac{N_{Ge}}{N_{Ga}} = \frac{\lambda_{Ga} - \lambda_{Ge}}{\lambda_{Ge}}$$

Et par conséquent, le ratio des activités des deux radionucléides devient :

$$\frac{A_{Ge}}{A_{Ga}} \!=\! \frac{\lambda_{Ga} \!-\! \lambda_{Ge}}{\lambda_{Ga}} \!=\! 1 \!-\! \frac{\lambda_{Ge}}{\lambda_{Ga}}$$

Quand le ratio de l'activité du radioélément père par rapport à celle du fils devient constant, on parle d'état d'équilibre. L'activité maximale du radioélément fils est obtenue pour un temps t :

$$t = \frac{1}{\lambda_{\rm Ga}^{-} \lambda_{\rm Ge}} Ln \frac{\lambda_{\rm Ga}}{\lambda_{\rm Ge}}$$

Dans le cas du couple <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga, la période du père est très grande par rapport à celle du fils. Donc  $\lambda_{Ge} \ll \lambda_{Ga}$  et  $t_{max} \sim (1/\lambda_{Ga}) \operatorname{Ln}(\lambda_{Ga}/\lambda_{Ge})$ ; les activités du père et du fils deviennent égales au bout du même temps  $t_{max}$ . [19] On parle d'équilibre séculaire représenté sur la Figure 6. [35]



**Figure 6. Cinétique séculaire d'un générateur** <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga [35] (A) Evolution de l'activité du radioélément père, (B) Evolution des activités cumulées du père et du fils, (C) Activité du fils dans la fraction du père et (D) courbe de décroissance de l'activité du fils

La courbe C est reprise sur la figure suivante :



Figure 7. Cinétique de formation du gallium 68 dans un générateur <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga

L'activité maximale du <sup>68</sup>Ga est obtenue au-delà de 10 périodes (14,1 heures). [27] Le gallium peut être récupéré par élution du générateur.

#### 2.2.2.2. Elution

Les générateurs dont la résine est à base de  $Me^{IV}O_2^-$  sont dits ioniques (Me = Sn, Ti, Zr, Ce, etc.). Quand le pH est situé entre 0 et 2 (HCl 0,01 à 1M), la résine devient échangeuse d'anions. [36] C'est ce qui se passe avec les générateurs Obninsk<sup>®</sup> ou encore le Pharmagrade generator d'Eckert & Ziegler dont la résine est à base de TiO<sub>2</sub>. En effet, au contact d'une solution HCl 0,1M et donc à pH=1, l'oxyde de Titane prend une forme Me<sup>+</sup> comme le montre la figure suivante :



Figure 8. Comportement de la résine de type Me<sup>IV</sup>O<sub>2</sub> en fonction du pH. Inspirée de [37] par A. Du Moulinet d'Hardemare. Om : Oxygène de la matrice ; Oa : Oxygène apical.

A ce pH le germanium(IV) ou  $Ge^{4+}$ , s'hydrolyse en complexes anioniques :  $[GeO(OH)_3]^-$  ou  $[GeO_2(OH)_2]^{2-}$  qui s'adsorbent fortement sur la résine échangeuse d'anions. Alors que le <sup>68</sup>Ga qui est un acide fort de Lewis, se trouve sous sa forme cationique (Ga<sup>3+</sup>) et il est de ce fait facilement élué par la solution d'acide chlorhydrique 0,1M lors de son passage à travers la colonne. Ceci est bien illustré au niveau de la Figure 9. [21]



Figure 9. Profils d'échange du Ga(III) et du Ge(IV) au niveau d'une résine de type  $Me^{IV}O_2^-$  (Me est dans ce cas du Zirconium hydraté) en fonction du pH. [21]

« D » étant le coefficient de distribution : c'est le quotient du taux du métal ionique adsorbé par gramme de résine / le taux du métal ionique par millilitre de solution d'élution. [38]

Le temps nécessaire pour générer le maximum de gallium 68 est très long pour être adopté en pratique courante. L'élution après un délai de 10 périodes par rapport à la dernière élution, génère par ailleurs un éluat au niveau duquel une quantité importante de <sup>68</sup>Zn s'est accumulée. Le <sup>68</sup>Zn étant un cation de Lewis « dur » et labile (entraineur non isotopique), peut entrer en compétition avec le <sup>68</sup>Ga lors des réactions de marquage. [39]

La matrice non toxique du générateur à base de  $TiO_2$  peut entrainer, par ailleurs une concentration relativement élevée de Ti dans l'éluat si le générateur n'est pas élué au quotidien. [27]

Le tableau suivant représente les mesures de la régénération de l'activité de gallium 68 dans le temps suite à une élution.

Temps (h)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Activité <sup>68</sup> Ga (%)	45.7	70.6	84	91.3	95.3	97.4	98.6	99.2	99.6	99.8	99.9

Tableau 4. Mesure de la régénération du <sup>68</sup>Ga dans le générateur <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga

En plus de l'élution quotidienne du générateur, une élution préventive 3 à 4 heures avant le radiomarquage est recommandée. Cette pré-élution permet d'éliminer des impuretés métalliques qui ont pu s'accumuler au cours du temps et de régénérer une activité suffisante pour la radiosynthèse. [27]

La majorité des générateurs disponibles dans le commerce, entre autres ceux dont la matrice est à base de  $SnO_2$  et  $TiO_2$  fournissent un éluat qui n'est pas directement utilisable en raison d'un certain nombre d'inconvénients : [28]

?

- Un volume d'élution élevé [11] et donc une radioactivité volumique faible en <sup>68</sup>Ga.
- La contamination avec d'autres ions métalliques cationiques issus essentiellement des matériaux constitutifs de la colonne du générateur. [27], [28] Citons essentiellement le Ti(IV), le Fe(III). Ou encore le Zn(II), produit de décroissance du <sup>68</sup>Ga. [40]
- La contamination de l'éluat par le radioélément père, le <sup>68</sup>Ge, de longue période [11],
   [27], [28]

Ces contaminants cationiques constituent un obstacle majeur au processus de complexation du <sup>68</sup>Ga.

La pharmacopée européenne définit des normes de pureté chimique et radionucléidique pour les éluats utilisés pour la production de radiopharmaceutiques destinés pour un usage humain. Ces normes sont les suivantes :

- Pureté chimique (Fer : teneur maximale de  $10\mu g/GBq$ ; Zinc  $\Box 10 \mu g/GBq$ )
- Pureté radionucléidique : <sup>68</sup>Ge et les autres impuretés émettrices gamma < 0,001% de l'activité totale [41]

Les éluats issus des générateurs de qualité chimique sont tous non conformes aux normes de la pharmacopée européenne et doivent par conséquent subir un prétraitement préalable à tout marquage.

Les éluats issus de générateurs de qualité pharmaceutique sont souvent conformes aux normes et peuvent être utilisés directement, mais leur pré-purification entraine une amélioration de la qualité du marquage.

## 2.2.2.3. Prétraitement des éluats

Afin de garantir la réussite du marquage au gallium 68 d'un vecteur d'intérêt, l'éluat doit être préalablement concentré et purifié de ses impuretés métalliques et des traces de radioélément père, le <sup>68</sup>Ge qui a une longue période. [1], [42]

Trois méthodes principales ont été décrites dans la littérature avec des avantages et des inconvénients pour chacune d'entre elles. Ces méthodes sont résumées au niveau de la Figure 10 :

## a) L'élution fractionnée

(Figure 10 (A))

L'élution fractionnée permet de concentrer un maximum d'activité dans un minimum de volume. Elle consiste à récupérer la fraction centrale de l'éluat. Les premières et les dernières fractions, d'activité volumique assez faible sont quant à elles jetées. Velikyan et coll. ont réussi à récupérer 60% de l'activité totale du générateur dans 1 mL d'acide chlorhydrique.[27] Breeman et coll. ont réussi à récupérer 80% de l'activité totale dans un volume de 1mL et à obtenir un rendement de marquage et une activité spécifique élevés. [43] De Blois et coll. ont utilisé cette méthode avec un générateur iThemba et ils ont réussi à concentrer 75% de l'activité totale dans un volume de 1,5 mL[44] Une approche similaire a été adoptée par Gabriel et coll.[45]



**Figure 10. Présentation schématique des prétraitements de l'éluat d'un générateur** <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga. [46] (A) Elution fractionnée : récupération de la fraction de l'éluat renfermant au moins le 2/3 de l'activité en <sup>68</sup>Ga, fraction utilisée sans la moindre purification supplémentaire ; (B) Purification cationique (B1) : Chargement direct de l'éluat du générateur sur une résine échangeuse de cations (CEX), (B2) : élution du 68Ga purifié par un mélange HCl/acétone ou HCl/éthanol; (C) Purification anionique de l'éluat (C1) Elution d'un générateur dans un réservoir de HCl concentré, (C2) chargement du mélange ainsi obtenu sur une résine échangeuse d'anions, (C3) récupération du <sup>68</sup>Ga purifié avec de l'eau ; (D) Combinaison de la purification cationique et anionique, (D1) : Chargement direct de l'éluat du générateur sur une résine échangeuse de cations, (D2-D2\*) : élution du <sup>68</sup>Ga purifié par de l'HCl cc ou par un mélange NaCl 5M/HCl 5.5M ce qui transforme provisoirement le Ga<sup>3+</sup> en [<sup>68</sup>GaCl<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, (D3) : Chargement de ce complexe anionique intermédiaire sur une résine échangeuse d'anions et élution du gallium purifié avec de l'eau, ou (D3\*) transformation du <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> en utilisant un tampon acétate

L'élution fractionnée est une bonne approche pour concentrer l'éluat. Cependant elle entraine une perte d'une partie de l'activité dans les fractions non collectées. En plus, les taux de <sup>68</sup>Ge restent mesurables et une purification supplémentaire du produit avant son injection doit être assurée si cet éluat est issu d'un générateur de qualité chimique, afin de garantir le respect des normes en pureté radionucléidique de la pharmacopée européenne. L'élution finale du produit est généralement assurée par une solution d'éthanol. La présence d'éthanol dans le produit fini impose le recours à des contrôles supplémentaires de la teneur du produit fini en solvants afin de s'assurer que les taux maximums injectables sont bien respectés.

#### b) La purification cationique

#### (Figure 10 (B))

Cette méthode consiste à passer l'éluat du générateur directement à travers une résine échangeuse de cations. Plusieurs colonnes ont été décrites dans la littérature. La plus fréquemment utilisée a une matrice à base de groupements fonctionnels d'acide sulfonique. [47],[48],[40] Dans ces conditions, le gallium 68 s'adsorbe d'une façon quantitative au niveau de la résine en raison d'une forte affinité des cations <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> pour cette cartouche; le <sup>68</sup>Ge n'est pas retenu et est collecté au niveau de la poubelle.[49]

Il a été démontré que dans des solutions d'HCl de mêmes concentrations, l'affinité des cations Ga<sup>3+</sup> pour les résines échangeuses de cations décroit avec l'augmentation de la teneur en acétone. [40], [49], [50] Le gallium peut ainsi être élué directement dans le flacon de réaction en utilisant un faible volume d'une solution d'acide chlorhydrique 0,05N dans 98% d'acétone. [49] Ce qui permet de concentrer l'éluat et de le purifier des impuretés métalliques qui ont un coefficient de distribution différent de celui du Ga<sup>3+</sup>: <sup>68</sup>Ge<sup>4+</sup>, Ti<sup>4+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, et Fe<sup>3+</sup>.[51]

L'emploi de cette méthode de pré-purification de l'éluat requiert en fin de synthèse une étape supplémentaire de purification post-marquage par extraction en phase solide. La récupération du produit marqué purifié se fait par de l'éthanol.

Cette méthode a été largement utilisée dans des études précliniques et cliniques. Elle est efficace et fiable. Cependant, l'utilisation de solvants organiques constitue en soi un inconvénient majeur pour une production de routine en vue d'une utilisation clinique. L'utilisation d'acétone et d'éthanol impose des contrôles qualité post-libératoires supplémentaires du produit fini.[52] De plus, à des pH acides, à température ambiante et exposée à la lumière, l'acétone donne naissance à une impureté toxique: le mésityloxyde (4-méthyl-3pentène-2-one) qu'on peut retrouver au niveau du produit fini. [53] Des précautions de conservation supplémentaires doivent être respectées pour le mélange (acétone/HCl) utilisé

???

pour l'élution du <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> à partir de la résine échangeuse de cations.[1] Eppard et coll. ont remplacé le mélange acétone/HCl par de l'éthanol/HCl. [54]

#### c) La purification anionique

#### (Figure 10 (C))

Dans des solutions d'acide chlorhydrique > 3M, le gallium forme des complexes anioniques avec les ions Cl<sup>-</sup>. Les complexes  $[GaCl_6]^{3-}$  et  $[GaCl_4]^-$  ainsi formés sont fortement adsorbés sur les résines échangeuses d'anions.[51] En revanche, dans des solutions de HCl<5M, le germanium n'est quasiment pas adsorbé sur ces résines.[27]

Les cations et les impuretés organiques sont éliminés efficacement par lavage de la résine. Le gallium peut être élué sous forme cationique Ga<sup>3+</sup> avec un volume très réduit d'eau pure. Meyer et coll. ont utilisé une résine dont la matrice est un ammonium quaternaire.[55] Une résine PS-HCO<sub>3</sub> (Chromafix<sup>®</sup>) a été utilisée par Velikyan et coll.[27] De Blois et coll. ont démontré que la purification est meilleure si on utilise une résine à base de pipérazine (Oasis WAX 30mg) qu'une résine PS-HCO<sub>3</sub>.[44]

Le principal avantage des méthodes anioniques par rapport aux cationiques est la non utilisation de solvants organiques. Les contrôles qualité du produit fini sont par conséquent moins contraignants (pas de CQ des solvants résiduels par CPG) et l'étape de purification post-marquage n'est plus nécessaire si la méthode de marquage aboutit à un produit fini de pureté radiochimique (PRC) suffisante.

Certains auteurs ont utilisé la méthode anionique en combinaison avec la méthode cationique classique dans le but d'éviter le recours aux solvants organiques pour décrocher le Ga<sup>3+</sup> adsorbé sur la résine échangeuse de cations (Figure 10 (D)). Lorsque l'HCl concentré est utilisé comme source d'ions chlorures pour l'anionisation du Ga<sup>3+</sup> afin de le décrocher de la résine échangeuse de cations sur laquelle il est adsorbé, la méthode requiert une étape supplémentaire avec l'utilisation d'une cartouche supplémentaire échangeuse d'anions.[56] Lorsque l'anionisation est effectuée par un mélange de NaCl 5M avec un très faible volume de HCl 5.5M, une étape supplémentaire de neutralisation du produit fini avec un tampon supplémentaire est nécessaire avant l'injection. [57]

Quelle que soit la méthode utilisée pour purifier l'éluat, cette étape est immédiatement suivie par l'opération de marquage proprement dite. Celle-ci doit se faire dans des conditions qui respectent la chimie de complexation du gallium.

## 2.3. La chimie de complexation du gallium

Le gallium est un élément de post-transition du groupe 13 de la classification périodique des éléments. Il a été découvert en 1874 par LECOQ DE BOISBAUDRIAN, d'où son nom, dérivé du latin *gallus* (coq) ou encore en hommage à la France (*Gallia*, la Gaule). [58] La configuration électronique de la couche de valence est ns<sup>2</sup>np<sup>1</sup>, comme celle de tous les éléments de post-transition. La structure interne du gallium, correspond à celle du gaz rare qui le précède (dans ce cas l'argon), plus les 10 électrons de la couche d, soit la configuration électronique suivante : [Ar]3d<sup>10</sup>4s<sup>2</sup>4p<sup>1</sup>. Cette structure interne détermine les propriétés chimiques de l'élément tels que le rayon métallique, le rayon ionique... Ces propriétés sont représentées au niveau du Tableau 5.

Tableau 5. Querques caracteristiques du gamui	n [50]						
N° atomique	31						
Configuration électronique	$[Ar]3d^{10}4s^{2}4p^{1}$						
Abondance naturelle des nucléides	<sup>69</sup> Ga (60,108%)						
	<sup>71</sup> Ga (39,892%)						
Masse atomique (g/mol)	69,72						
Fusion (°C)	29,8						
Electronégativité (PAULING)	1,81 (III)						
Rayon covalent (Å)	1,26						
Rayon (Å)	M 1,41						
	M <sup>+</sup> 1,13						
	M <sup>3+</sup> 0,62						

Tableau 5. Quelques caractéristiques du gallium [58]

### 2.3.1. Importance du pH du milieu réactionnel

En raison de son faible potentiel d'oxydoréduction, la chimie de la solution aqueuse est exclusivement représentée par l'état d'oxydation stable de +III. [11], [17]

La réaction d'oxydation du gallium vers un degré d'oxydation +3 a été décrite par Latmer en 1952 :

Ga  $Ga^{3+} + 3e^{-} E^{0} = 0,53 V$ 

Ce potentiel redox est à comparer aux potentiels d'oxydoréduction suivants :

Ga 
$$Ga^{2+} + 2e^{-} E^{0} \Box 0,45 V [59]$$

$$Ga^{2+}$$
  $Ga^{3+} + e^{-} E^{0} \square 0.65; [60]$ 

Ces différents potentiels démontrent que le  $Ga^{2+}$  est thermodynamiquement instable comparé au  $Ga^{3+}$ . [59] L'état d'oxydation de faible valence +I, n'est pas important en solution aqueuse et ne présente donc pas de pertinence dans le développement des radiopharmaceutiques.

En solution aqueuse, le gallium (III) libre hydraté cationique est stable uniquement en milieu acide. [11],[17] Le pKa du gallium est en effet de 2,6 et il a une forte affinité pour les ions

???

 $OH^{-}$ . [10] A partir d'un pH =3 et pour toutes les valeurs allant jusqu'à 7, il se produit une hydrolyse ce qui aboutit au final à la formation de la forme insoluble Ga(OH)<sub>3</sub>. Cependant, en présence d'agents stabilisants, cette précipitation peut être évitée. Avant d'aboutir au Ga(OH)<sub>3</sub>, Une variété d'hydroxydes intermédiaires sont formés en fonction du pH :

$$Ga(H_2O)_6^{3+} + H_2O \rightleftharpoons Ga(OH)(H_2O)_5^{2+} + H_3O^+$$

$$Ga(OH)(H_2O)_5^{2+} + H_2O \rightleftharpoons Ga(OH)_2(H_2O)_4^+ + H_3O^+$$

$$Ga(OH)_2(H_2O)_4^+ + H_2O \rightleftharpoons Ga(OH)_{3(s)} + H_3O^+ + 3H_2O$$
[61]

Le diagramme de Pourbaix (ou diagramme potentiel-pH) représenté au niveau de la Figure 11 nous donne le détail des espèces présentes en solution aqueuse en fonction du pH. Le pourcentage de chaque espèce en fonction du pH du milieu et à 25°C peut être déduit de la Figure 12.



L'hydrolyse du Ga<sup>3+</sup> commence à partir de valeurs de pH assez faibles et cette hydrolyse dépend non seulement de la concentration initiale de gallium mais également de la concentration des espèces minérales totales présentes qui se comportent comme le gallium. Plus on augmente le pH, plus on assiste à la formation d'hydroxo-complexes qui évoluent vers les oxydes de gallium, indisponibles à la complexation.





Etant donné la très faible solubilité du trihydroxyde de gallium  $Ga(OH)_3$  (K<sub>s</sub> = 7,1×10<sup>-36</sup>), la valeur du pH maximal auquel la solution peut être portée est limitée. Ceci limite l'intervalle de pH pouvant être utilisé en pratique pour la préparation du radiotraceur tout en évitant la précipitation du radionucléide avant son incorporation. [59]

L'hydroxyde de gallium (III) se distingue des hydroxydes des autres métaux (Fe, In) par son caractère amphotère. Il se dissout donc aussi bien en milieu acide qu'en milieu basique. Aux pH >7, la réaction va continuer, les OH<sup>-</sup> réagissent de plus en plus avec des espèces de gallium et l'hydroxyde de gallium se redissout pour donner des gallates  $[Ga(OH)_4]^-$ . [11],[17]

 $Ga(OH)_{3(s)} + (OH)^{-} \rightleftharpoons Ga(OH)_{4}^{-}$  [61]

Cependant, les pH basiques ne peuvent être utilisés pour le développement de radiopharmaceutiques marqués au gallium, étant donné que les complexes galliés d'intérêt vont se comporter de la même façon aux pH les plus élevés. Ils vont également réagir avec les OH<sup>-</sup> et on assiste ainsi à une décomplexation. [65]

Un milieu réactionnel à pH acide est donc nécessaire pour le développent de traceurs marqués au gallium. Ceci n'est possible que si les vecteurs à développer sont acido-résistants. Dans ce cas, un marquage direct sans additif dans le milieu réactionnel peut être envisagé.

Si la molécule à marquer se dégrade rapidement à pH acide, il est possible d'opérer en présence d'un tampon plus basique, mais légèrement complexant (ce qui évite l'hydrolyse de gallium en Ga(OH)<sub>3</sub> ou GaO(OH), espèces réputées les plus insolubles des entités galliées. [39]

#### 2.3.2. Stabilité thermodynamique du complexe

Le Ga(III) peut être classé comme un acide « dur » de Lewis à cause de sa densité de charges élevée et son faible rayon ionique (0,62Å). En conséquence, sa chimie de chélation

est dominée par de fortes liaisons à des bases « dures » de Lewis, hautement ioniques et non polarisables comme l'azote et l'oxygène, et à un moindre degré aux amino-thiols qui sont des atomes donneurs d'électrons [11] (les thiols sont assez mous selon le concept des acides et des bases durs et mous de Pearson dite théorie HSAB vs les thiolates, qui sont anioniques et sont donc plus durs (densité de charge augmentée)). [39] Ainsi, avec des ligands carboxylate, phosphonate, hydroxamate, et des fonctionnalités amine, le Ga (III) forme des complexes thermodynamiquement stables. [11]

En raison de son faible rayon cationique, la chimie de coordination du Ga(III) est souvent définie par un nombre de coordination égal à 6 et une sphère de coordination octaédrique. [11], [17] Les plus basses coordinences (4 et 5) sont obtenues avec les halogénures ou les pseudo-halogénures (carboxylates et sulfonates), sans que l'on puisse exclure la participation de molécules d'eau, complétant ainsi la sphère de coordination à 6. Les complexes sont alors de géométrie octaédrique ou de géométrie pyramidale à base carrée. Comme beaucoup de cations « durs » selon le concept HSAB, le gallium est un métal labile. Cette caractéristique est cinétique. Elle est définie par la capacité d'un complexe de se dissocier en métal libre pour un temps donné. Plus la liaison Ligand-Métal est forte, moins la labilité est importante. [39] En milieu physiologique, les complexes de gallium avec des sites de coordination vacants (penta et tetra-coordonnées) sont plus sensibles à l'hydrolyse pour des raisons stériques et électroniques. [17] Une fois libéré, le gallium (III) se trouve sous forme de gallate soluble  $[Ga(OH)_4]^-$ . Ce composé est néphrotoxique et sa présence doit donc être évitée. [65]

Afin de mettre au point un radiopharmaceutique d'intérêt, il faut privilégier les chélatants qui permettent de former des complexes avec le gallium-68 avec une **haute stabilité thermodynamique** vis à vis de l'hydrolyse à pH physiologique. [17], [61]

Importance de la constante de stabilité

La stabilité des complexes est une grandeur thermodynamique qui peut être exprimée par une constante de stabilité notée  $K_{ML}$ 

Pour la réaction de complexation :  $Ga^{3+} + xL \rightleftharpoons [Ga(L)_x]$ , la constante d'équilibre s'écrit :

$$K_{ML} = \frac{[Ga(L)_x]}{(Ga^{3+})(L)^x}$$

Cette constante d'équilibre est conditionnelle, elle dépend de la température et des conditions de la réaction. Elle doit être la plus élevée possible surtout pour les cations labiles. [39] Le Tableau 6 et la Figure 14 regroupent les constantes de stabilité des complexes de gallium avec un certain nombre de ligands.

Ligand	Log K <sub>ML</sub>	Référence	Ligand	Log K <sub>ML</sub>	Référence	
			tris(2-			
I-	-0,2	[59], [61]	mercaptobenzyl)	20,5	[66]	
			amine			
Br-	-0,1	[59], [61]	TMDTA	20,8	[59],[61]	
Cl-	0,01	[59], [61]	EEDA	21,0	[59],[61]	
Acide salicylique	0,69	[59], [61]	N <sub>3</sub> O-Ac <sub>3</sub>	21,3	[67]	
Acide 5 sulfosalicylique	1,36	[59], [61]	HBIDA	21,55	[61]	
CHNS	1,66	[59]		20,3	[59]	
Chrome azurol S	4,5	[59]	FDTA	21	[66],[67]	
Xylenol orange	4,8	[59]	LDIM	21,7	[60],[61], [68]	
HF	4,92	[59],[61]		22	[66]	
1,10 phenanthroline	5,58	[59]	DOTA	21,33	[60], [66], [67]	
Acide oxalique	6,45	[59], [61]	CDTA	22,34	[61]	
Valine	9,02	[59]	CDT	23,2	[59]	
Glycine	9,33	[59],[61]		23.3	[60]	
Acétylacétone	9,4	[59],[61]	DTDA	23,32	[61], [68]	
Acide citrique	10,02	[59],[61]	DIFA	24,3	[67]	
OH-	11,1	[59],[61]		25,54	[59], [66]	
Acide glutamique	11,15	[59],[61]	TRAP	26,24	[69]	
Asparagine	11,17	[59]	N <sub>3</sub> O-HP	26,81	[67]	
HIDA	11,33	[61]	H <sub>2</sub> dedpa	27,4	[69]	
IDA	12,76	[61]	SBAD	28,3	[66]	
0.1	145	[(1]	DFO	20.6	[(()]	
8-hydroxyquinoline	14,5	[61]	(Deferrioxamine-B)	28,6	[00]	
Oxine	14,5	[59]	EDDA-HP	29,18	[67]	
Ferron	14,7	[59]		30,1	[66]	
NTA	13,6	[59]	NOTA	30,98	[67]	
	16,19	[61]		31	[66]	
	16.2	[40] [40]	N,N'-ethylene-di-L-	21.5	[66]	
UEDDA	10,2	[00], [08]	cysteine	51,5	[00]	
	16,75	[61]	EHPG	31,61	[61], [68]	
$N_3O_2$ -Ac <sub>3</sub>	17,1	[67]	TACN-TM	34,2	[66]	
HEDTA	16,9	[59]	3,4, DiP-LICAM	38,6	[61]	
	17,2	[61]	DIED	32,3	[67]	
TEDTA	17,3	[59], [61]	PLED	36,35	[61]	
SEDDA	18,15	[61]	SHBED	37,47	[67]	
N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> -Ac <sub>3</sub>	19,2	[67]		37,7	[66]	
EDDA	19,3	[68]	HBED	38,51	[66], [67]	
Tiron	19,4	[59], [61]		39,57	[61], [68]	
Trita	19,91	[67]	OH	39,4	[68]	
Transferrine (K <sub>1</sub> )	20,3*	[60],[68],[66]	3,4 DiP-LICAM	38,6	[61], [66]	
Transferrine (K <sub>1</sub> )	19,8	[67]	3,4 LICAMS	38,5	[68]	
Transferrine (K <sub>2</sub> )	18,8	[67]	MECAMS	38	[68]	
Transferrine (K <sub>2</sub> )	19.3*	[60].[68]	Tip-MECAMS	42.0	[61]	
	10.0		[13]3,4 DiP-		[ [ ]	
Transferrine $(K_2)$	19,8	[66]	LICAMS	42,1	[61]	
TETA	19.7	[66]	TACN-TX	44.2	[67]	
	,.		DTTA-HP	45.6	[67]	
(*) Calculés pour pH=7	4 et NaH(	$\Omega_2 = 27 \text{mM}$				

Tableau 6. Constantes de formation des complexes de Ga(III) avec divers ligands

(\*) Calculés pour pH=7,4 et NaHCO<sub>3</sub>=27mM

-0.2 -0.1 -1.4 -1.4 -1.4	4,4,0,0,0,0 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,	9.4 10.0 11.1	11.2 11.3 12.8 13.6	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	17.1 17.1 18.2	19.3 19.3 19.3	19.7 19.9 20.1	20.5 20.8 21.0	21.3 21.3 21.3	21.0 22.3 24.1 24.1	26.8 26.8 27.4 28.3	28.6 29.2 30.7	31.6 34.2 34.3	37.5 38.0 38.5	38.6 38.6 39.4	42.0 42.1 44.2 45.6	Log K <sub>ML</sub>
Ber	with a straight of the straigh	Acétylacétone Acide citrique Acide glu tamique	Asparagine HIDA IDA NTA		N302-AC3 TEDTA SEDDA N303-AC3	Transferrine (K2)	TETA Trita Transferrine (K1)	tris(2-mercaptobenzyl) amine TMDTA EEDA	EDTA N3O-Ac3 DOTA		TRAP N3O-HP H2dedpa SBAD	DFO (Deferrioxamine-B) EDDA-HP NOTA	TACN-TAC	MECAMS 3,4 LICAMS	3,4, DIP-LICAM 3,4 DIP-LICAM 3,4 DIP-LICAM Ga(OH-)4	TIP-MECAMS [13]3,4 DiP-LICAMS DTAC-HY DTTA-HP	

#### Figure 14. LogK<sub>ML</sub> de différents ligands de gallium.

Les constantes de stabilité peuvent être utilisées pour une comparaison préliminaire de différents chélatants vis-à-vis d'un métal donné, mais elles ne donnent aucune indication sur la stabilité *in vivo*. [69] En effet, elles ne reflètent que les équilibres chimiques des espèces en solution qui font partie du système de complexation. Or, les ligands (L) sont des bases de Lewis. Ils sont donc susceptibles de se protoner ou de se déprotoner en solution aqueuse :

$$LH \rightleftharpoons L^- + H^+$$

La constante d'équilibre s'écrit  $K_a = \frac{L^-(H^+)}{LH}$ , avec <u>pKa</u> = - log Ka

La réaction de protonation d'un ligand est en compétition avec celle de complexation. Par ailleurs, en milieu aqueux et à pH physiologique, la réaction de complexation est aussi en concurrence avec la réaction d'hydrolyse des cations métalliques. La constante d'équilibre est intéressante, mais ne constitue donc pas le meilleur critère de choix.

Pour refléter la réalité des équilibres en solution aqueuse, il existe une autre grandeur notée  $pM = -\log [M]$ , où [M] reflète la concentration résiduelle de l'ion métallique libre, non hydrolysé après complexation dans un milieu donné. Elle permet de comparer directement la force des différents ligands vis-à-vis des métaux, indépendamment de leur stœchiométrie dans le complexe. Plus le pM est élevé, plus le ligand est affin dans les conditions spécifiées. Il est à noter que l'ordre relatif des stabilités des complexes est susceptible de changer pour des conditions différentes (pH,  $[CO_3^{2-}]$ , concentrations ...) [68]

La définition la plus couramment acceptée est la suivante :  $pM = -\log (M(H_2O)_6)^{3+}$  [58] Le calcul du pM inclut les constantes de stabilité, les pKa des espèces en équilibre en solution et donc leur sensibilité à la protonation, il intègre également l'équilibre de la réaction d'hydrolyse, le ratio des concentrations ligand/métal ... [39], [58], [69]

Les pM ne sont pas aussi bien décrits dans la littérature que les constantes de stabilité. Le Tableau 7 regroupe un certain nombre de pM qui peuvent être utilisés pour le choix du chélatant de gallium lors du développement d'un nouveau traceur pour l'imagerie TEP.

Chélatant	pM*	log K <sub>ML</sub>	Référence				
UDED	30,9	39,57	[68]				
прер	28,6	38,51	[58], [67]				
SHBED	28.3	37.47	[58], [67]				
H <sub>2</sub> dedpa	28,1	27,4	[69]				
TACN-TM		34.2	[69]				
NOTA	26,4	30,1	[66]				
NOIA	26,4	30,98	[67]				
PLED	25,8	32,3	[58], [67]				
TACN-TX	25,2	44,2	[67]				
	22,8	23,3	[60]				
DTPA	22,8	23,32	[68]				
	20,2	24,3	[58], [67]				
THAC	21,9	15	[70]				
EDTA	20	21	[58], [67], [70]				
LDIA	21,7	21,7	[60], <mark>[</mark> 61], [68]				
EDDA-HP	20,8	29,18	[67]				
	21,3*	20,3*	[60], [68]				
$TF(K_1)$	19,8	19,7	[58]				
	19,7	19,8	[67]				
TE(K)	20,3*	19,3 *	[60], [68]				
$\Pi(\mathbf{K}_2)$	19,7	18,8	[67]				
EDDA	20,3	19,3	[68]				
Tiron	19,4	19,4	<b>[59]</b> , <b>[</b> 61], [68]				
NTA	19,04	16,2	[60], [68]				
0 <sup>11-</sup>	19,01	11,1	[59]				
011	19,01	39,4	[59], [68]				
Citrate		10,02	[59], [59], [61]				
DOTA	15,2	21,3	[58], [66]				
TETA	14,1	19,7	[66], [67]				
TRITA	13,7	19,91	[67]				

Tableau 7. Valeurs du pM et du  $K_{\mbox{\scriptsize ML}}$  de différents agents chélatant le gallium

(\*)  $pM= - \log[Ga(H_2O)_6]$ , pM calculé pour 1  $\mu$ M de Ga, 10  $\mu$ M de ligand, et 27 mM de carbonate, pH 7.

Les constantes de stabilité et les pM nous donnent une idée sur l'état d'équilibre de la réaction de coordination métal-ligand sous des conditions spécifiques, mais ne fournissent aucune information d'ordre cinétique. [69]

#### 2.3.3. L'inertie cinétique du complexe

La stabilité d'un complexe de gallium à l'hydrolyse n'est pas l'unique problème à considérer lors du choix du chélatant. Les chélatants doivent permettre en plus, la formation de complexes de gallium qui présentent une inertie cinétique. Ce qui évite les échanges de gallium avec la transferrine - échanges favorisés par une forte affinité de ce sidérophore au
Ga(III) (logK1= 20,3) et sa présence dans le plasma à des concentrations assez importantes. [71] Afin de mettre au point un radiopharmaceutique d'intérêt, il faut par conséquent privilégier les chélatants qui permettent de former des complexes avec le gallium-68 avec non seulement une haute stabilité thermodynamique mais aussi une **inertie cinétique** au moins tout au long d'un protocole d'imagerie en médecine nucléaire afin d'éviter toute réaction précoce d'échange avec le ligand. [17], [61] Il faut par conséquent se préoccuper de la similitude de la chimie de coordination du gallium III et du Fer III. [61] Cette similitude est conséquente aux similarités des charges, du rayon ionique (0,62 Å pour le Ga<sup>3+</sup> et 0,65 Å pour le Fe<sup>3+</sup>), du nombre de coordination (6), et de la configuration électronique (couche pleine  $3d^{10}$  pour le Ga<sup>3+</sup> et demi-pleine  $3d^{5}$  pour le Fe<sup>3+</sup>). (Tableau 8) [59], [61]

	Structure	Potentiel d'ionisation(V)			V)	Payon ionique	Nombre de
Elément	électronique	Ι	Π	Ш	IV	(Å) du M <sup>3+</sup>	coordination du M <sup>3+</sup> aqueux
Ga	$[Ar]3d^{10}4s^{2}4p$	5,999	20,51	30,71	64	0,62	6
Fe	[Ar]3d <sup>6</sup> 4s <sup>2</sup>	7,870	7,87	30,651	54,8	0,55 (spin bas) 0,65 (haut spin)	6

Tableau 8. Comparaison des caractéristiques physiques du gallium et du fer. [59]

?

Il y a cependant, des différences chimiques importantes entre ces deux ions, qui conduisent à des biodistributions tout à fait différentes. Dans ce contexte et à l'état de traces, le gallium est soluble alors que le fer ne l'est pas. Le fer nécessite des protéines ou d'autres agents chélateurs pour le transport *in vivo*. [60] Il existe *in vivo* des molécules qui complexent très fortement le fer, le calcium, le cuivre, le zinc et qui sont alors susceptibles de faire de même avec le gallium. Cette caractéristique est à l'origine de la <u>démétallation</u>. [58] Parmi ces molécules, nous trouvons des protéines de transport (transferrine, céruloplasmine, métallothionéine), des protéines de stockage (ferritine), ainsi que des enzymes contenant des métaux comme la superoxyde-dismutase. [69] Un échange de ligand peut se faire par exemple avec la transferrine, une protéine plasmatique abondante (2-4g/L) qui possède deux sites de liaison du fer avec une haute affinité pour le Ga(III).

La coordination du Fe<sup>3+</sup> et du Ga<sup>3+</sup> aux deux sites de fixation des métaux de la transferrine requiert une fixation concomitante d'un anion synergique, normalement le bicarbonate. [61] Aux concentrations physiologiques de bicarbonate, les constantes de liaison de la transferrine humaine au gallium sont : log K<sub>1</sub> = 20,3 et log K<sub>2</sub> = 19,3. Pour les ions Fe<sup>3+</sup>, l'affinité est un peu plus élevée (log K<sub>1</sub>=22,8 et log K<sub>2</sub>= 21,5). [68] Par conséquent, le ligand choisi doit avoir dans les conditions physiologiques, une constante de stabilité de son complexe avec le gallium supérieure à celle de la transferrine. Le gallium doit être hexacoordonné dans la ?

structure finale du complexe et ceci requiert souvent la fonctionnalisation de la molécule d'intérêt avec un chélatant adéquat.

## 2.4. Stratégie de développement d'un traceur marqué au gallium

## 2.4.1. Choix du chélatant de gallium

Comme le montrent les tableaux 6 et 7, les complexes inorganiques sont généralement faibles. Le plus élevé log K est celui de l'OH<sup>-</sup> et il est égal à 11,1. Ceci est dû partiellement au fait que ces ligands inorganiques sont monodentates. Les ligands organiques montrent un intervalle de constantes de stabilités beaucoup plus étendu, atteignant des valeurs assez importantes. Ceci est lié essentiellement à leur caractère multidenté. Les ligands multidentés présentent au moins deux avantages :

- ils forment des complexes de plus grande stabilité thermodynamique que celles observées avec les analogues mono, bi voire tridentés
- ils sont beaucoup moins sensibles au facteur de dilution qui reste un facteur très important à prendre en compte en médecine nucléaire, du fait de la très faible concentration de radiopharmaceutique utilisée (de l'ordre du nanomolaire). [58]

Les ligands organiques peuvent être acycliques ou macrocycliques.

## 2.4.1.1. Les chélatants acycliques

Le principal avantage des chélatants acycliques réside dans la cinétique de complexation du métal qui est rapide. Le marquage est quantitatif à température ambiante et en moins de 15 minutes. Donc ils constituent les chélatants de choix pour les ligands thermolabiles et aussi lorsque le radiomarquage se fait avec des radioisotopes à courte demi-vie. Cependant les chélatants acycliques sont cinétiquement moins inertes que les macrocycliques. Les complexes formés avec les métaux sont donc plus susceptibles à la décomplexation. La stabilité du complexe doit être assurée au moins pendant le temps nécessaire à la réalisation de l'examen. De point de vue thermodynamique, les chélatants acycliques mis en solution nécessitent des changements drastiques dans l'orientation physique et la géométrie afin de créer un arrangement des atomes donneurs d'électrons qui soit favorable à la complexation de l'ion métallique. (entropie faible) [69]

Plusieurs chélatants ont été décrits dans la littérature : [72]

## Tableau 9. Chélatants acycliques du <sup>68</sup>Ga

Chélatant et dérivés	molécule	Conditions de marquage	Rendement de marquage	Réf.
HO <sub>2</sub> C N N CO <sub>2</sub> H HO <sub>2</sub> C CO <sub>2</sub> H CO <sub>2</sub> H DTPA, diethylenetriaminepentaacetic acid, N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> , CN = 8	DTPA- Lectine	pH3,5 (glycine 0,1M), 30' à température ambiante	95-100%	[67], [69], [73]
N $N$ $N$ $N$ $N$ $N$ $N$ $N$ $N$ $N$	H <sub>2</sub> -RGD	pH 4.5 10' à température ambiante	97%	[69], [74]
HO, O, N, N'-bis(2-hydroxybenzyl)- ethylenediamine- $N, N'$ -diacetic acid, N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> , CN = 6	HBED-CC- mAb425	pH 4,1 5' à 40°C	86,7-92.1%	[69], [75]
$\begin{array}{c} & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ &$		pH 6,5 5' à température ambiante	98-100% (10μM) 75% (1μM)	[76]
$ \begin{array}{c} \begin{array}{c} & & & & \\ & & & \\ & & & \\ & &$	YM-103- C2Ac	pH 5,5 (acétate d'ammonium 0.5M) 5' à température ambiante	Marquage quantitatif	[76]

Chélatant et dérivés	molécule	Conditions de marquage	Rendement de marquage	Réf.
SCN - HN + N + O + O + O + O + O + O + O + O +	THP-TATE (25µg)	Sol° du précurseur 50%EtOH-50%eau, température ambiante, marquage instantané acétate d'ammonium 2M pH du mélange 5-6	>99%	[77]
	2 2	2-5 min, température ambiante acétate d'ammonium 1M pH du mélange 6,5	>99%	[78]
DFO, desferrioxamine B, O <sub>6</sub> , CN = 6	DFO- Lectine	pH 3,5 (Glycine 0,1M) 30' à température ambiante	95-100% après purification	[73]
$\begin{array}{c} R_{6} \\ R_{4} \\ R_{3} \\ R_{3} \end{array} \xrightarrow{N} \\ BAPDMEN \end{array} \xrightarrow{N} \\ R_{6} \\ R_{7} \\ R_{6} \\ R_{7} \\$	bis-salicyl aldimine	Séchage de GaCl3, reprise avec (éthanol, 0.002% acétylacétone). 20' à 70°C	> 93% après purification	[79]

## 2.4.1.2. Les chélatants macrocycliques

Les chélatants macrocycliques présentent des cinétiques de complexation beaucoup plus lentes que leurs homologues acycliques. Par conséquent, des réactions de marquage quantitatives nécessitent un temps de réaction assez lent ce qui constitue en soi un inconvénient pour le marquage au gallium 68, de courte période. A une exception près, le marquage nécessite souvent un chauffage entre 60 et 95°C pendant 30 à 90 minutes. La thermolabilité des vecteurs d'intérêt est un critère à prendre en considération dans ce cas de figure. Cependant, les complexes formés sont plus inertes cinétiquement et donc sont moins

sensibles à la démétallation *in vivo*. Sur le plan thermodynamique, les macrocycles présentent des géométries avec des sites préorganisés de chélation des métaux, ce qui limite la perte entropique lors de la réaction de complexation. [69]

Plusieurs chélatants macrocycliques ont été décrits dans la littérature.

		Conditions	Rendement	
Chélatant et dérivés	molécule	de	de	Réf.
		marquage	marquage	
HO <sub>2</sub> C — CO <sub>2</sub> H	DOTATOC	NaOAc 0,1M pH 4,5 5' à 95°C	40%	[80]
		NaOAc pH 5-5,5	60 ± 10%	
$HO_2C$ $N$ $N$ $CO_2H$ DOTA, 1,4,7,10-tetra- azacyclododecane-	DOTA-hEGF	HEPES pH 4,6-4,8 1'90±5°C Microondes	77 ± 4%	[81]
1,4,7,10-tetraacetic acid	22222000002 238892222	Ammonium acétate pH 3,9 15' à 80°C		[82]
$HO_2C$ $P-NO_2-Bn-Oxo$ N $CO_2H$ $HO_2C$ $NO_2$		pH 3-5 5' à température ambiante	> 95%	[83]
HO <sub>2</sub> C N HO <sub>2</sub> C P-NO <sub>2</sub> -Bn-PCTA NO <sub>2</sub>		pH 3-5 5' à température ambiante	> 95%	[83]
HO <sub>2</sub> C N HO <sub>2</sub> C N NOTA, 1,4,7-triaza- cyclononane-1,4,7- triacetic acid	NOTA-ZHER2:S1	pH 3,6 15' à 95°C	87.4±10.4%	[84]

Chélatant et dérivés	molécule	Conditions de marquage	Rendement de marquage	Réf.
TRAP (PRP9, TRAP-Pr), 1,4,7-triazacyclononane- 1,4,7-tris[methyl(2-carboxyethyl)phosphinic acid],	TRAP(RGD <sub>3</sub> )	pH 2 5' à 95°C	97,8±0,5% (pour 10 nmoles de précurseurs)	[69], [85]
$HO_2C + HO_2C + HO_2$	AAZTA-Minigastrine	pH 4.5 (AcONa trihydraté) 10 minutes Températur e ambiante	95%	[69], [86]
FSC	FSC-(RGD)₃	15' à température ambiante pH 4,5-5	> 95%	[87]

#### 2.4.1.3. Critères de choix du chélatant de gallium

Avec un radioélément de période courte tel que le gallium 68, il serait idéal de privilégier les chélatants qui permettent un marquage rapide à température ambiante (donc les chélatants acycliques) ; cependant l'incorporation rapide du radiométal peut signifier également une démétallation facile ; en effet, la barrière énergétique de décomplexation est dans ce cas très faible. Le choix du chélatant pour le développement d'un nouveau traceur marqué au gallium 68 est donc basé sur un compromis de sélection du chélatant qui présente les paramètres les mieux adaptés à l'application. [69] On peut opter par exemple pour un chélatant à stabilité moyenne, mais qui a une cinétique de complexation et de décomplexation lente. Des techniques de chauffage permettent dans ce cas d'améliorer la vitesse de réaction. La thermolabilité de certains vecteurs exclut l'utilisation de tels chélatants. Aussi, le choix

d'un chélatant ayant une stabilité modérée mais une vitesse de complexation élevée sera parfois suffisante *in vivo* si la biodistribution du vecteur est plus rapide que la décomplexation du métal. Dans ce cas, le traceur pourra être utilisé pour l'imagerie.

Une sélection initiale du chélatant se fait en se basant sur les valeurs des  $\log K_{ML}$  et des pM des différents chélatants de gallium comparativement à celles de la transferrine. Une représentation schématique sur une échelle comparative de ces deux paramètres (Figure 15) permet d'avoir une meilleure visibilité.



Figure 15. Représentation schématique sur une échelle comparative des log K<sub>ML</sub> et des pM de certains chélatants de gallium.

Les chélatants les plus intéressants sont ceux qui ne présentent aucun risque de démétallation *in vivo* et qui permettent donc de former avec le gallium un complexe dont les paramètres logK<sub>ML</sub> et pM sont plus élevés que ceux de la transferrine et des autres sidérophores circulants (Lactoferrine, métallothionéine). En se basant sur cette figure, l'EDTA et le DTPA ne sont pas des chélatants de choix pour le gallium. En effet, leur structure ne permet pas la formation de complexe hexadenté. Le DOTA a été largement utilisé dans le développement de traceurs marqués au gallium 68. Cependant, il présente une constante de stabilité de son complexe avec le gallium beaucoup plus faible que celle de la transferrine et un pM très limite. [69] Une démétallation *in vivo* du <sup>68</sup>Ga-DOTA-RGD a été décrite par Decristoforo et coll. [88] Cette instabilité peut s'expliquer par une taille de cage beaucoup plus large que le rayon ionique du gallium. [58] Le développement de certains dérivés du DOTA (DO<sub>2</sub>A [89], [90], DO<sub>3</sub>A [91], DOTAGA [92], p-SCN-Bn-DOTA, DOTA-NHS-ester, [69]) a permis d'améliorer la stabilité des bioconjugués. Mais la cinétique de marquage reste lente et les rendements de marquage ne sont quantitatifs que si la réaction de marquage est conduite à haute température. [69]

La Figure 15 montre que les chélatants de gallium qui donnent les complexes les plus stables sont : HBED et son dérivé SHBED, H<sub>2</sub>dedpa et NOTA.

H2dedpa, HBED et dérivés étant acycliques, ils présentent le grand avantage d'une cinétique de complexation beaucoup plus rapide que le NOTA (cyclique).

La H2dedpa permet un marquage efficace en moins de 10 minutes à température ambiante. Le complexe formé est hexadenté et de géométrie parfaitement symétrique [93] ce qui est en soit un grand avantage, car plus la géométrie est symétrique, moins elle est sensible à l'attaque des OH<sup>-</sup>. [39] Le complexe est stable et résiste à la transchélation par l'apo-transferrine et le sérum. Le chélatant reste cependant inaccessible dans le commerce. Sa synthèse difficile limite fortement son utilisation dans le développement de nouvelles molécules pour l'imagerie TEP. [93]

La desferrioxamine (DFO) possède un log  $K_{ML}$  de son complexe de gallium proche de celui de l'H<sub>2</sub>dedpa (le pM n'étant pas disponible dans la littérature). [93] Elle permet de chélater le gallium de façon efficace et stable [73] Seulement c'est une structure qui est reconnue par des peptidases ce qui entraîne une dégradation rapide *in vivo*. [39]

Le log  $K_{ML}$  et le pM de l'HBED sont des plus élevés dans la littérature et prédisent d'une grande stabilité *in vivo*. Le HBED présente cependant deux principaux inconvénients : une solubilité limitée dans l'eau [94] et la disponibilité d'uniquement 6 donneurs d'électrons. Ce qui inclut, qu'après conjugaison à la molécule d'intérêt, le complexe formé avec le gallium sera pentacoordonné et donc instable. L'ajout de deux fonctions carboxyliques sur le HBED permet d'augmenter la solubilité dans l'eau et la clairance rénale du complexe et assure la formation d'un complexe hexadenté avec le gallium. [95] Le HBED-CC ainsi obtenu présente une fonction carboxylique libre qui peut conduire à une modification de la biodistribution de la molécule vectrice surtout lorsque celle-ci est de poids moléculaire réduit (peptides). [39] Le recours à un ester de l'HBED-CC (le tetrafluorophénolate : TFP) permet de réduire les liaisons non spécifiques et conduit à une augmentation de l'internalisation spécifique (cas du PSMA dans les cellules LNCaP). [96]

L'ajout d'un sulfonate en position para de la fonction phénol de l'HBED permet d'obtenir le SHBED, ce qui permet d'augmenter la solubilité dans l'eau sans affecter considérablement l'affinité du chélatant pour les métaux trivalents. [94] La fonction sulfonate permet aussi de réduire le pKa des protons phénoliques ce qui entraîne une déprotonation plus facile et conduit donc à un marquage plus efficace à pH acide. [69]

Les dérivés de l'HBED constituent des chélatants de choix pour les isotopes de gallium surtout lorsque la molécule vectrice est thermolabile et nécessite un marquage rapide à température ambiante. Le HBED-CC permet des marquages quantitatifs (97%) en moins de 5 minutes et à température ambiante. Cependant, ce chélatant est non disponible dans le commerce et malgré une synthèse relativement aisée, celle-ci reste coûteuse avec des rendements de synthèse assez faibles. [96]

Le NOTA présente un log  $K_{ML}$  et un pM moins intéressants que ceux de l'HBED et de ses dérivés. (Figure 15) Malgré un marquage au gallium beaucoup plus lent qu'avec l'HBED-CC étant donné la structure macrocyclique du NOTA, ce chélatant présente le grand avantage d'être disponible dans le commerce avec une qualité conforme aux Bonnes Pratiques de Fabrication ce qui permet une large application pour le développement de radiopharmaceutiques. La taille du NOTA est par ailleurs très proche du rayon ionique du gallium (62 pm [69]), ce qui permet des marquages quantitatifs à température ambiante et ce en dépit d'une structure cyclique. [39] La stabilité thermodynamique du Ga(III)-NOTA est approximativement 10 fois plus élevée que celle du Ga(III)-DOTA. [66]

Le NOTA permet de former avec le Ga<sup>3+</sup> un complexe hexadentate (liaison avec trois azotes et 3 oxygènes). Seulement, lorsqu'il est conjugué à une molécule vectrice, l'un des carboxylate est bloqué, et la sphère de coordination originale du chélatant est perturbée. Le gallium est ainsi pentacoordonné et donc labile. Le Ga<sup>3+</sup> (pKa=2,6) a en effet une forte affinité pour les hydroxyles, ce qui conduit à une démétallation du gallium à pH physiologique et à un transfert vers les sidérophores circulants. Pour pallier ce problème, des dérivés du NOTA avec un groupe d'ancrage loin du cycle ont été développés, de telle sorte à préserver l'hexadenticité du complexe de gallium et donc sa stabilité. [39]

Dérivés du NOTA	molécule	Conditions de marquage	Rendement de marquage	Réf.
HO <sub>2</sub> C N N HO <sub>2</sub> C N N HO <sub>2</sub> C NO <sub>2</sub> H NO <sub>2</sub>		pH 3-5 5' à température ambiante	> 95%	[83]

Tableau 11. Dérivés du NOTA

Dérivés du NOTA	molécule	Conditions de marquage	Rendement de marquage	Réf.
HO <sub>2</sub> C N NCS HO <sub>2</sub> C N N CO <sub>2</sub> H p-SCN-Bn-NOTA(C-NOTA)	NOTA- Annexin A1	Quelques minutes à température ambiante	> 99%	[97]
HO <sub>2</sub> C, N, HN, O HO <sub>2</sub> C, N, CO <sub>2</sub> H NODAGA, R = NHS ester, amide	NODAGA-TATE	PH 3,5 10' à température ambiante	> 95%	[98]
HO <sub>2</sub> C, N, N, H, R HO <sub>2</sub> C, N, N, CO <sub>2</sub> H NODASA, R = NHS ester, amide	NODASA-D- phenylalanineamide	25min à pH 6,2 (acétate ammonium 0,5M) à 90°C		[99]

A titre d'exemple, des expériences de transchélation et de démétallation d'analogue de la bombésine conjugués avec différents chélateurs (DO3A-, NO2A- et NODAGA), conduites *in vitro* par Asti et coll. ont montré une supériorité du NODAGA comme chélatant du gallium. [100] Une étude de stabilité du complexe du gallium avec le p-SCN-Bn-NOTA en présence d'un excès de métaux (milieu 1000 fois plus concentré en Fe, Cu, Zn and Ca) a démontré une grande stabilité *in vitro*. L'incubation des chélatants DTPA-NCS, DOTA-NCS et PCTA-NCS avec la même concentration de métaux a conduit à des rendements radiochimiques réduits.[101]

D'autres dérivés de la couronne triazacyclononane ont été développés : TACN, TRAP. Malgré une constante de stabilité élevée du complexe du TACN avec le gallium [69], des expériences de marquages du TACN-HSB avec le gallium 68 étaient sans succès en raison de l'instabilité du ligand à l'air. L'emploi d'éthanol dégazé permet d'obtenir des marquages avec le gallium 67, mais très instables *in vivo*. [102]

Le TRAP, présente le grand avantage d'avoir un pKa plus faible que les NOTA, ce qui permet des marquages plus faciles à des pH encore plus acides (jusqu'à 0,5). Cette propriété pourrait être exploitée pour le marquage de vecteurs stables à pH acides ; l'éluat du générateur (HCl, 0,1M) peut alors être utilisé directement [103], ce qui évite le recours à des tampons de marquage et permet de simplifier la formulation et donc les étapes de purification post-marquage. De plus, comparé au NOTA, l'un des dérivés du TRAP, le TRAP-Pr, présente une

meilleure spécificité pour le Ga<sup>3+</sup> ce qui pourrait présenter un intérêt dans les marquages directs sans pré-purification de l'éluat de gallium de ses impuretés métalliques. Le TRAP permet par ailleurs l'obtention de ligands avec des activités spécifiques plus importantes. [85] Il faut noter tout de même que le <sup>68</sup>Ga-TRAP(RGD)<sub>3</sub> présente des fixations non spécifiques beaucoup plus importantes que celles du <sup>68</sup>Ga-NODAGA-RGD. [104]

Pour les autres chélateurs de gallium décrits dans les tableaux Tableau 9 et Tableau 10, et pour lesquels les valeurs des pM et des log  $K_{ML}$  ne sont pas disponibles :

- les dérivés de l'AAZTA (H<sub>3</sub>L<sub>1</sub> et H<sub>3</sub>L<sub>4</sub>), appelés également DATA, présentent une cinétique de marquage très rapide (une à cinq minutes à température ambiante) en dépit de leur structure cyclique. [69] Cependant, <sup>68</sup>Ga-AAZTA-Minigastrine a montré une instabilité dans le plasma humain, une légère transchélation en présence d'EDTA et de DTPA et une activité circulante élevée dans les études de biodistribution avec une fixation importante aux protéines plasmatiques. [86]
- Le PCTA, conjugué au RGD peut être marqué au gallium 68 en 5 minutes et à température ambiante avec des rendements de marquage supérieurs à 95%. Comparé au complexe avec le NOTA, le <sup>68</sup>Ga-PCTA-RGD présente l'avantage d'avoir une fixation rénale beaucoup plus faible. Le complexe est cependant moins stable que celui du NOTA. (93 ± 2% pour le PCTA Vs 98 ± 1% pour le NOTA 4h post-injection). [105]
- Des chélatants acycliques, dérivés du tris (hydroxypyridinone) peuvent être marqués efficacement en 5 minutes à température ambiante. C'est le cas de CP256 et son dérivé YM103. Ce dernier a montré une stabilité *in vivo* 90 minutes post-injection. [69], [76] D'autres chélatants acycliques dérivés du tris(hydroxypyridinone) ont été récemment synthétisés (THP-NCS et THP-PhNCS). Des marquages au gallium 68 du THP-NCS-RGD et du THP-PhNCS-RGD ont pu être réalisés à température ambiante et en moins de 5 minutes avec des rendements dépassant les 99%. Le marquage est stable dans du sérum humain et *in vivo* jusqu'à 90 minutes post-injection. Cependant ces deux traceurs sont métabolisés d'une façon significative. [78] Une étude de stabilité du <sup>68</sup>Ga(THP-TATE) dans du sérum humain a montré une transchélation de moins de 2% après 5h d'incubation à 37°C. [77]

Malgré tous ces avantages, ces chélatants ne sont cependant pas disponibles dans le commerce, ce qui limite leur utilisation.

Le NOTA demeure donc le « gold standard » pour chélater efficacement le Ga<sup>3+</sup> dans des conditions opératoires favorables et aboutissant à un complexe avec une excellente stabilité in *vivo*. [69] La présence d'un cycle aromatique au niveau de la structure peut être également un critère de choix préférentiel lorsque le vecteur d'intérêt ne permet pas une détection dans l'UV. L'ajout d'un chélatant avec cycle aromatique facilite l'analyse par UV-HPLC.

## 2.4.2. Conjugaison du chélateur à la molécule vectrice

Le développement d'une nouvelle molécule qui se prête au marquage au gallium nécessite sa conjugaison préalable d'une façon covalente au chélateur de gallium sans affecter le site de reconnaissance des cibles moléculaires et la sphère de coordination du chélateur. Cette liaison n'est possible que si la molécule vectrice possède un groupe fonctionnel (exemple : amine primaire). A défaut, des modifications chimiques doivent être apportées à la molécule d'intérêt pour permettre la conjugaison (exemple : amination). Les conditions optimales pour les réactions de conjugaison prévoient une chimie douce en milieu aqueux et à pH proche du pH physiologique. [17] La liaison chimique engagée varie en fonction des groupements fonctionnels mis en jeu. Les plus fréquemment employées sont : la liaison amide, la liaison thioéther et la liaison thiol. Une autre approche appelée 'chimie click' a été utilisée ces dernières années. Elle désigne un ensemble de réactions d'addition utilisant des conditions de chimie douce qui permettent, en partant de deux composés moléculaires, une synthèse rapide de composés organiques avec des rendements élevés. [72] On compte parmi les réactions de 'chimie click' :

- La 1,3-cycloaddition dipolaire de Huisgen appelée également CuAAC (Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions) : elle nécessite une catalyse par le cuivre (I), ce qui constitue en soi une limitation pour le développement de radiopharmaceutiques marqués au gallium ou avec un autre radiométal. [106]

- Une technique de cycloaddition améliorée qui peut être conduite sans catalyse au cuivre : la SPAAC ou (copper-free strain promoted azide alkyne cycloaddition) peut être utilisée efficacement pour développer des molécules qui se prêtent au marquage au gallium. Cette approche est aussi applicable *in vivo*. [107]

- L'approche de Diels Alders, constitue également une bonne alternative de chimie 'click' pour un tel développement. Elle permet un pré-ciblage *in vivo* [108]

- La réaction d'addition de Staudinger entre un ester de phosphane et un azoture aboutissant à une liaison amide présente une cinétique relativement plus lente et n'est de ce fait pas adaptée au pré-ciblage *in vivo*. [109]

Afin de faciliter la formation de ces liaisons covalentes, des chélateurs bifonctionnels sont souvent employés. [72] En présence de plusieurs groupements fonctionnels au niveau du chélateur, une étape de protection des sites de coordination du métal est obligatoire pour que la conjugaison puisse se faire sur un site unique. [110] Une illustration de l'ensemble de ces approches de conjugaison est présentée au niveau du Tableau 12.

?

Stratégie de conjugaison	Groupements fonctionnels engagés dans la liaison	Réaction chimique	Principe opératoire	Réf.
Liaison amide	Acide carboxylique et amine primaire	$X \xrightarrow{O} OH + H2N \xrightarrow{V} H2N V$	Quelques nanomoles de la molécule d'intérêt (hEGF) est placée en présence d'un excès (10 à 20 fois plus) de <i>N</i> -hydroxysulfosuccinimide ester anhydre de DOTA dans un tampon borate. Le pH du mélange doit être de 9. Le mélange est laissé à température ambiante de 3-4h jusqu'à une nuit. Le conjugué est purifié sur une colonne SPE C18 phase inverse. Le rinçage est effectué avec du TFA 0,1%. Le produit est élué avec un mélange acétonitrile (70%)/TFA 0,1%. Le solvant est évaporé par centrifugation sous vide à 50°C. Le produit sec est conservé à une température < 0°C.	[69], [72]
Liaison Thiourée	Isothiocyanate et amine primaire	x + H2N + H2N + H2N + Lision thiouree	Une solution de 2µmole du peptide (RGD dimère) est mélangée avec une solution renfermant 6 µmoles de p-SCN-Bn-NOTA dans du NaHCO3 0,1N (pH9). Après agitation à température ambiante pendant 5 heures, le bioconjugué obtenu est isolé par HPLC semi-préparative. Le produit est lyophilisé.	[69], [72], [111]
Liaison Thioéther	Maléimide et thiol	$X \xrightarrow{0} H \xrightarrow{0} H \xrightarrow{0} H \xrightarrow{0} X \xrightarrow{0} H \xrightarrow{0} Y$ $Maleimide Thiol Thioether$	Une solution mère de maleimidocyclohexyl-desferrioxamine (Df-Chx-Mal) est préparée en dissolvant 1,5mg (2µmoles) dans 1 mL d'un mélange Diméthylformamide/Diméthylacétamide (50:50) et en chauffant à 44°C pendant 30 minutes. Cette solution se conserve à -80°C. 220µL (0,44 µmoles) de la solution sont mélangés à 1,5 mL d'une solution de thio-trastuzumab (7,5mg, 52nmoles) dans un tampon Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5. Le mélange est incubé une heure à température ambiante. La solution est chargée sur une colonne NAP-10 et le Df-Chx-Mal-thio-trastuzumab est élué avec 1,5 mL de tampon acétate de sodium 0,25M	[69], [72], [112]
1,3cycloaddition dipolaire de Huisgen Catalysée par le Cu (chimie click CuAAC)	Alcyne et azoture	$X + N^{+} N^{-} X \xrightarrow{Q_{A}(II) + reducteur} Y \xrightarrow{Q_{A}(II) + reducteur} N^{+} N^{-} X \xrightarrow{Q_{A}(II) + reducteur} N^{+} N^{+} N^{+} X \xrightarrow{Q_{A}(II) + reducteur} N^{+} N^{+} X \xrightarrow{Q_{A}(II) + reducteur} N^{$	Un mélange d'azide (1 équivalent), d'alkyne (1 équivalent), du butanol tertiaire, de l'eau, de l'acétate de cuivre (0,1 équivalent) et de l'ascorbate de sodium (0,2 équivalents) est mis en agitation à température ambiante pendant 12 heures. En présence de groupements carboxylates dans la structure, ils doivent être protégés sous forme d'ester. Et les amines primaires peuvent être protégées sous forme de Boc-amines afin de faciliter la purification.	[69], [72], [113]

## Tableau 12. Stratégies de conjugaison du chélatant à la molécule vectrice

Chimie Click SPAAC (Copper free strain promoted azide alkyne cycloaddition?	Alcyne et azoture	Vector $-N = N + Alkyne$ Azide Alkyne Vector $N$	<ul> <li>L'azoture + l'alcyne (2 équivalents) dans un mélange acétonitrile/eau (1:9, v/v) est laissé incuber toute une nuit à température ambiante.</li> <li>22 (1) 22 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20</li></ul>	[107], [114]
Cycloaddition de Diels Alder (chimie click)	Tetrazine et হ কাগেকেগেকাগেকাগে	X Tetrazine Transcyclooctene X Tetrazine Transcyclooctene	Un anticorps anti-EGFR (IgG1, mAbs) (Cetuximab) est préalablement fonctionnalisé avec des groupements TCO (transcyclooctène). Ceci est obtenu en incubant l'anticorps non modifié avec 100 équivalents de TCO- PEG <sub>4</sub> -NHS dans un tampon bicarbonate de sodium (pH 8,3) à 4°C pendant 16h. La protéine est purifiée par filtration par centrifugation. Le préciblage <i>in vivo</i> est réalisé en prétraitant avec la protéine fonctionnalisée, des souris greffées avec des cellules tumorales A431 surexprimant les EGRF et ce pendant 3 ou 23 heures. Ceci est suivi de l'injection de 1,85MBq de 68Ga-DOTA-R-Tetrazine.	[69], [108]
Thiol- vinylsulfone addition ou thiol- Michael addition (chimie click)	Vinylsulfones et thiol	$R - SH + \bigwedge_{\substack{IIS \\ IIO}}^{O} \xrightarrow{catalyseur} R - S \xrightarrow{O}_{IIS}^{IIS} S - R$ Thiol DivinyIsulfone	Les deux composés sont mis en présence d'un catalyseur. Le temps au bout duquel la réaction devient quantitative est variable en fonction du catalyseur utilisé (exemple : 5' pour DABCO ou DMAP ; 15 minutes avec l'imidazole ; 30' avec la triéthylamine ; 60' avec la diéthylamine)	[72], [115]
Liaison de Staudinger (chimie click)	Phosphane-ester et azoture	$R_{1} - N_{3} - \underbrace{\begin{array}{c} Ph_{2}P \\ HeO \\ Staudinger Ligation \\ Traceless Staudinger Ligation \\ R_{1} - NH \\ H \\ R_{1} - NH \\ R_{1} - R_{2} + H \\ R_{1} - P \\ $	22       2	[106], [109]

#### ?

Liaison Bromoacétamide- amine	Bromoacétamide et amines	Chelator - HN Chelator - HN Br + H2N Vector Chelator - HN HN Vector		[72]
Liaison Bromoacétamide- thiol	Bromoacétamide et thiols	O Br + HS - Vector Chelator—HN Bromoacetamide Thiol	Une solution mère du chélatant bifonctionnel est préparée en dissolvant 8mg (12µmoles) de Df-Bac (2222 222220002202202222 2 2 2 2 2 2 2	[72], [112]
Liaison Iodoacétamide	Isodoacétamide et thiol	O Chelator—HN I + HS - Vector Chelator—HN Iodoacetamide Thiol	Une solution mère du chélateur bifonctionnel est préparée en dissolvant 8mg (11 $\mu$ moL) de Df-Iac (iodoacetyl-desferrioxamine) dans 1 mL de DMSO. 110 $\mu$ L (1,2 $\mu$ moles) de cette solution est mélangée à 4 mL d'une solution de thio-trastuzumab (16mg, 110 nmoles dans un tampon Tris 50 mM, NaCl 150 mM, carbonate de sodium 0,0125 M, pH 9. Le mélange est incubé 2h à température ambiante. Le mélange est chargé sur une cartouche NAP-10 et le Df-Ac-Thio-trastuzumab est élué avec 1,5 mL d'un tampon acétate de sodium 0,25M.	[112]

L'ajout d'un espaceur et/ou d'un chélateur au niveau de la structure de base d'une molécule d'intérêt peut entraîner une modification de la pharmacocinétique et de l'affinité pour la cible. Mai Lin et coll. ont démontré qu'une augmentation du nombre de carboxylates au niveau de certains chélateurs est associée à une baisse de l'affinité de liaison du conjugué aux cibles et à une baisse de l'internalisation. [116] L'ajout d'un espaceur ou d'un chélateur impose donc de vérifier l'effet de ces modifications structurales sur l'affinité initiale de la molécule pour sa cible.

Plusieurs méthodes peuvent être employées *in vitro*. Parmi les méthodes biochimiques, le test le plus répandu est celui de la compétition de liaison à la cible de la molécule d'intérêt et d'un ligand de référence radiomarqué ou conjugué à une enzyme modificatrice de substrat. Le principe de la technique consiste à mesurer le déplacement du ligand marqué lié au récepteur par la molécule à tester. L'expérience permet de calculer une affinité relative (en comparaison avec celle du ligand de référence) pour le récepteur.

Lorsque le ligand de référence est conjugué à une enzyme, l'ajout du substrat, entraîne l'émission d'un signal chromogénique ou fluorescent.

## 2.4.3. Choix du tampon de marquage

A l'exception du cas où les molécules d'intérêt sont acido-résistantes, le milieu réactionnel doit être tamponné pour assurer des conditions qui respectent à la fois les spécificités chimiques du gallium (un pH acide permettant d'avoir une forme chimique du gallium disponible à la complexation :  $Ga^{3+}$  et évitant la formation des hydroxyles de gallium insolubles), la stabilité de la molécule d'intérêt et le pKa du chélatant permettant la complexation du gallium.

La Figure 16 peut être utilisée comme une aide au choix du pH de marquage en fonction du chélateur conjugué à la molécule d'intérêt que nous cherchons à marquer au gallium.

Afin de prévenir la formation de colloïdes de gallium (qui débute à partir d'un pH égal à 2) et de favoriser sa complexation aux molécules d'intérêt, des tampons à faible pouvoir complexant sont utilisés. Ces tampons assurent le maintien du gallium sous sa forme ionique tout en maintenant le pH à des valeurs au-delà du pH de début de formation des colloïdes. [117] Le tampon utilisé ne doit pas interférer avec les ions Ga<sup>3+</sup> (exemple : précipitation du phosphate de gallium). [118]

?



Figure 16. Présentation schématique des chélateurs de gallium en fonction du pH de marquage.

Plusieurs tampons ont été décrits dans la littérature. Ces tampons sont choisis pour leurs pKa. Bauwens et al. ont démontré que le glutamate de sodium, l'oxalate de sodium, le tartrate de sodium, le lactate de sodium, et à un moindre degré le Tris ne sont pas adéquats au marquage du DOTATOC au gallium 68. Le succinate de sodium, l'HEPES ((4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid) et l'acétate de sodium permettent d'avoir les puretés radiochimiques les plus élevées. [117]

Les tampons peuvent être utilisés à différents concentrations et volumes. Le Tableau 13 résume certaines conditions opératoires décrites dans la littérature.

Tampon	Cc	Volume	pН	Opérations post-marquage	Référence
	0,1 M	100µL	4,5	Purification post-marquage sur Sep-PaK, élution à l'éthanol et dilution au NaCl	[80]
	0,1 M	200µL	4,8	Purification sur RP C18 SPE	[119]
Acétate de	1M		5,5	Aucune	[81]
sodium	1,4 M	30 µL	4.5	Aucune	[86]
	1,25	60µL	3,6	Purification sur colonne d'exclusion stérique NAP-5 pré-équilibrée avec du PBS	[84]
	1,9M	100µL			[120]
	1M	400µL	4,8	Purification sur RP18 mini-cartouche (Chromabond C18ec, 1 ml, Macherey-Nagel, Düren, Germany)	[55]
HEPES			4,6-4,8	Purification sur Bio-Select RP C18 SPE	[81]
	1M		2-2,5	Le pH 3,5 présente la meilleure incorporation	[00]
	1M		3,5	(>95%) en un temps <10 minutes	[20]
	2,1M	10µL	4,1	Purification avec une colonne NAP5	[75]

Tableau 13. Tampons utilisés pour le marquage au gallium

Tampon	Cc	Volume	pН	<b>Opérations post-marquage</b>	Référence
Succinate de Na	0,5M	100µL	4	Purification sur une cartouche C18	[117]
Acétate d'ammonium	0,25M	500µL	3,9	Aucune	[82]
	1M	300µL	6,5	Aucune	[78]
	2M	200µM	5-6	Aucune	[78]
Glycine	0.1M	1 mL	3.5	Purification sur colonne Sephadex G-25	[73]

L'HEPES présente l'avantage de permettre des marquages au gallium avec les activités spécifiques les plus élevées. [27], [117] Son utilisation dans des préparations magistrales n'est cependant pas autorisé pour un certain nombre de raisons : a) il ne fait pas partie des substances à usage pharmaceutique, b) il ne fait l'objet d'aucune monographie de Pharmacopée, c) les données de toxicologie pour une injection par voie intraveineuse ne sont pas disponibles, d) l'Hepes ne fait partie de la composition d'aucun médicament autorisé à l'exception de l'<sup>111</sup>In-oxinate utilisé pour le marquage cellulaire, mais même au niveau de cette préparation, l'Hepes doit être éliminé avant l'administration au patient des cellules radiomarquées. [117], [118] Il est par ailleurs notifié au niveau de la monographie du <sup>68</sup>Ga-edotreotide injectable, que l'Hepes ne doit pas dépasser  $200 \mu g /V$ ; V étant la dose maximale en volume injectable au patient. [121] L'utilisation de l'Hepes dans le processus de marquage impose donc une étape de purification post-marquage. Une automatisation de la procédure de marquage est donc obligatoire afin de limiter l'exposition des extrémités du manipulateur. Un contrôle de l'impureté avant injection est aussi obligatoire et constitue donc une contrainte supplémentaire.

L'acétate de sodium présente donc une bonne alternative à l'HEPES. Il permet d'avoir des rendements de marquage et des puretés radiochimiques élevées. Il est de plus disponible sous forme de matière première de qualité pharmaceutique. Il est fréquemment utilisé dans la fabrication des médicaments et son injection chez l'être humain est autorisée. [117]

Une compétition des ions sodiums avec les Ga<sup>3+</sup> pour la formation de complexes avec le DOTA a été décrite. [55] Les concentrations doivent de ce fait être contrôlées.

Des essais de marquage à l'acétate d'ammonium aboutissant à des molécules radiomarquées de hautes activité spécifique et pureté radiochimique sans purification post-marquage ont également été rapportés. [52] L'acétate d'ammonium disponible également sous forme de matière première de qualité pharmaceutique, peut aussi être utilisé dans des préparations magistrales.

## 2.4.4. Stabilité du marquage au gallium.

## 2.4.4.1. La radiolyse

L'énergie libérée par l'interaction des positons de haute énergie du <sup>68</sup>Ga avec la matière, induit soit directement, ou via la radiolyse de l'eau, une dégradation de la matière organique constitutive des ligands. Une démétallation peut s'en suivre. Elle est causée soit par une dégradation des structures complexantes ou encore par compétition avec les OH<sup>-</sup> qui proviennent de l'autoprotolyse de l'eau. [39] L'ajout d'un antioxydant comme l'acide ascorbique ou encore la méthionine limite fortement la radiolyse et protège ainsi les molécules d'intérêt d'une éventuelle dégradation. H. Karacay et al. ont démontré que l'ajout d'acide ascorbique au mélange réactionnel avant le chauffage augmente le rendement de marquage de 59% à 70%. [122]

#### 2.4.4.2. La démétallation

L'injection du radiopharmaceutique à l'état de traces (µg-ng) et l'existence à de fortes concentrations *in vivo* de métalloprotéines, rend le risque de démétallation et donc de remise en solution des espèces métallées élevé. (Figure 17) [69] Le choix d'un système de complexation avec un pM très élevé n'est pas suffisant pour garantir le fonctionnement de la molécule radiomarquée *in vivo*. [39] L'évaluation de la réactivité biologique des molécules marquées est donc nécessaire.



Figure 17. Représentation schématique des sources de démétallation possibles des vecteurs marqués avec des isotopes métalliques une fois administrés à l'état de traces : protéines de réserve (ferritine) ; protéine de transport (transferrine, lactoferrine, métallothionéine) ; enzymes (ceruloplasmine, superoxyde dismutase). [69]

Les expérimentations *in vitro* qui reflètent le mieux ce qui se passe *in vivo* sont les expériences de transmétallation par mise en compétition du traceur avec des solutions biologiques renfermant des métalloprotéines, ou des enzymes ayant une forte affinité pour les métaux. Le sérum, l'apotransferrine, la superoxyde dismutase, l'hydroxyapatite (moelle) peuvent être utilisés. En incubant les vecteurs radiomarqués dans ces solutions [69] (par exemple une solution d'apotransferrine de 3mg/mL de tampon bicarbonate de sodium 10 mM, pH 6,9, à 37°C), La stabilité du marquage est généralement évaluée en prélevant des aliquots à différents temps d'incubation [83] et en déterminant la quantité de radiométal déplacé de son chélateur par chromatographie d'exclusion stérique (HPLC-SE), chromatographie sur couches minces (iTLC), ou en utilisant des colonnes de séparation par exclusion stérique (PD-10). [99]

L'ajout d'éluat de Ga<sup>3+</sup> au sérum humain conduit à la liaison du <sup>68</sup>Ga aux protéines plasmatiques ; les complexes protéiques ainsi formés présentent des temps de rétention bien distincts en CLHP d'exclusion stérique. [78]

L'utilisation de compétiteurs à des concentrations plus élevées que celles normalement présentes *in vivo* peut nous renseigner sur la stabilité et l'inertie cinétique du radiotraceur développé, mais ne permet pas de prédire la démétallation qui pourrait se produire *in vivo*. [69] Une évaluation de la stabilité du radiotraceur *in vivo* est donc obligatoire.

L'étude de la stabilité *in vivo* s'effectue souvent par injection du vecteur radiomarqué à un animal sain. Plusieurs échantillons sanguins sont alors prélevés à différents temps postinjection. Après élimination des cellules sanguines et précipitation des protéines sériques, le surnageant est analysé par chromatographie liquide et les signaux obtenus sont comparés à ceux correspondant aux radiotraceurs. L'absence de pics additionnels signifie une stabilité du produit *in-vivo* aux temps d'analyse correspondants. Des prélèvements urinaires peuvent aussi être effectués et les analyses nous renseignent sur l'élimination sous forme intacte ou de métabolites du radiotraceur injecté. [78]

L'évaluation de la biodistribution du radiotraceur est aussi nécessaire. Celle-ci nécessite toujours l'utilisation de « contrôle interne » pour chaque expérimentation afin de limiter les facteurs de variabilité qui peuvent être observés chez des animaux d'une même espèce et de même sexe, d'un laboratoire à un autre. Les variabilités peuvent aussi être inhérentes aux paramètres de préparation du radiotraceur (activité spécifique du radiométal, activité spécifique du radiotraceur, température de marquage, pureté du produit fini, masse injectée du radiopharmaceutique, volume injecté). [69]

?

L'étude de la biodistribution d'un traceur marqué au gallium nécessite la connaissance préalable de la biodistribution du gallium libre.

## 2.5. La biodistribution du gallium

L'évaluation *in vivo* d'un nouveau traceur marqué à un isotope du gallium nécessite la connaissance préalable de la biodistribution du gallium. Celle-ci peut nous renseigner sur la survenue d'une transchélation ou démétallation *in vivo*.

Dans les conditions normales d'utilisation des radiopharmaceutiques, donc à l'état de traces, la liaison du Ga(III) libre à la transferrine sérique (protéine de transport du fer) est totale au bout de quelques minutes. Cette liaison rapide est éventuellement due d'une part aux très faibles concentrations du métal, et d'autre part, à la présence d'agents de chélation sérique comme l'acide citrique. Ces deux facteurs réduisent la polymérisation hydrolytique du gallium et conduisent à la réaction rapide de la protéine avec les espèces monomériques du métal. [123] Décroché de son chélateur, la biodistribution du gallium correspond donc à celle de la transferrine-Ga.

Si nous observons de près la nature de la transferrine, il s'agit d'une protéine avec deux domaines homologues de poids moléculaire 79,57 Da. Chaque domaine peut lier un Fe<sup>3+</sup> (ou un Ga<sup>3+</sup>) concomitamment avec un ion carbonate ou bicarbonate (Brittenham, 1991). La concentration normale en transferrine chez l'être humain est de 240 mg/kg répartie d'une façon approximativement égale entre le plasma et les liquides extracellulaires (Huebers et Finch, 1987). La capacité de liaison de cette transferrine au fer (considérée comme la capacité totale de fixation du fer) est normalement de 330 µg/dL (ou 3,3 µg/mL). Seuls 33% des sites de liaison de la transferrine peuvent être occupés par le Fe<sup>3+</sup> en même temps (Brittenham, 1991). Les sites de liaisons libres de la transferrine plasmatique, sont donc normalement disponibles pour approximativement 2,2 µg/mL de Fe<sup>3+</sup> ou 2,7 µg/mL de Ga<sup>3+</sup>.

La transferrine circule entre le sang et les liquides extracellulaires. Elle transporte son métal à travers les cellules via le récepteur de transferrine qui est une protéine pouvant lier deux molécules de transferrine. Aux valeurs de pH neutre, le récepteur se lie plus fortement à la transferrine diferrique, moins fortement à la transferrine monoferrique et faiblement à l'apotransferrine (transferrine dépourvue d'ion métallique). Le complexe (Transferrine-métal)-récepteur passe à l'intérieur de la cellule par endocytose; l'endosome est par la suite acidifié ce qui permet la libération du métal (cette libération se produit à des pH < 5,5). La transferrine et le récepteur de la transferrine sont alors réutilisés. (Brittenham, 1991). Il est

généralement reconnu que le Fe-TF et le Ga-TF empruntent cette même voie utilisant le récepteur de la transferrine, mais ça n'a jamais été démontré expérimentalement. Les études réalisées par Chitambar et Seligman (1986) suggèrent que l'incorporation cellulaire de Ga-TF interfère avec la libération intracellulaire du fer à partir de Fe-TF en empêchant une acidification suffisante de l'endosome.

Toutes les cellules nucléées du corps expriment le récepteur de la transferrine, mais les concentrations varient énormément. Dans les tissus normaux, le plus grand nombre de récepteurs de la TF sont exprimés par les hépatocytes, les cellules de Kupffer, les précurseurs érythroïdes (particulièrement au niveau de la moelle), et les cellules du placenta, l'épiderme basal, le pancréas endocrine, les tubules séminifères et l'épithélium muqueux (Gatter et coll., 1983, Huebers et Finch, 1987). Les macrophages autres que les cellules de Kupffer peuvent exprimer un nombre important de récepteurs de la transferrine (Gatter et coll., 1983 ; Huebers et Finch, 1987). Il est par ailleurs connu que le gallium a une forte affinité pour le tissu osseux en croissance ou en remodelage. En outre, des concentrations de gallium sont couramment observées dans le foie, la rate, les reins et les seins en lactation (Larson et Schall, 1971; Larson et Hoffer, 1978; Vistelle et coll., 1989). [124]

## CHAPITRE 3. LES CIBLES MOLÉCULAIRES D'INTÉRÊT

Dans ce chapitre nous nous intéressons à 3 cibles moléculaires en particulier : une glycoprotéine : la P-sélectine, un phospholipide : la phosphatidylsérine (PS), et des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G : les récepteurs de la somatostatine. Pourquoi ces trois cibles ? Certes, les deux dernières ont un intérêt indéniable en cancérologie, mais toutes semblent particulièrement pertinentes dans les pathologies cardio-vasculaires. Les phénomènes biologiques d'intérêt dans ce dernier cas sont l'activation plaquettaire, la plaque d'athérome vasculaire, l'activation endothéliale dans les phénomènes inflammatoires vasculaires et myocardiques, la mort cellulaire et sa régénération, les lésions d'ischémie–reperfusion.



Les particularités structurales de certaines molécules qui leur permettent d'interagir avec ces cibles et de les reconnaître en font des vecteurs d'intérêt pour le développement d'outils de diagnostic. Le marquage de ces molécules avec des radioisotopes et plus particulièrement le gallium 68 permet d'obtenir des outils d'imagerie moléculaire qui, s'ils sont validés pour un usage clinique, constituent un atout majeur pour l'exploration de ces pathologies et donc pour aider à assurer une meilleure prise en charge des patients.

## 3.1. LA PHOSPHATIDYLSÉRINE

## 3.1.1. Structure et expression physiologique

La Phosphatidylsérine est un phospholipide membranaire. C'est un composé amphiphile renfermant dans sa structure un groupe phosphore et est constitué d'une « tête » hydrophile et deux « queues » aliphatiques hydrophobes. Les phospholipides membranaires sont de deux types : les cholinephospholipides dont la tête polaire est la choline : la phosphatidylcholine (PC) et la sphingomyéline (SM) qui sont neutres au pH physiologique) et les aminophospholipides dont la tête polaire est une amine primaire à savoir la phosphatidyléthanolamine (PE) (charge globale neutre au pH physiologique) et la phosphatidyléthanolamine (PE) (charge globale neutre au pH physiologique). [125], [126]



Figure 18. Structure de la PS [126]

Au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) des cellules eucaryotes, la distribution de ces phospholipides est symétrique entre les feuillets interne et externe de la membrane. [127], [128] C'est au niveau du feuillet cytosolique de cet organite qu'est synthétisée la PS. [129] Quelques 50% des phopholipides nouvellement synthétisés sont alors transportés vers la lumière du RE ce qui assure la formation de la bicouche lipidique. Le transport via la membrane du RE est assuré par des mouvements de « flip-flop » par des

flippases énergie-indépendantes dans un sens comme dans l'autre assurant ainsi cette symétrie de distribution membranaire. [127]

Il s'en suit alors le transport des phospholipides vers la membrane plasmique par les protéines de transport des lipides (LPTs) ou via des vésicules de sécrétion en passant par le réseau trans-Golgien ou des endosomes précoces. [127], [129]

Contrairement à la membrane du RE, la distribution des phospholipides au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi et au niveau de la membrane plasmique des cellules eucaryotes est physiologiquement asymétrique.

Au niveau de l'appareil de Golgi, l'asymétrie est générée par le transport spécifique de la PS et de la PE par des translocases spécifiques des aminophospholipides (les P4 ATPases) vers le cytosol et par l'absence de transport des PC et des SM qui se trouvent concentrés du côté luminal de l'appareil de Golgi où elles sont synthétisées. [130]

Au niveau de la membrane plasmique, le feuillet externe est composé en majorité par les cholinephopholipides et le feuillet interne par les aminophospholipides. [125], [127], [128]. Les PS sont les seuls phopholipides à être présents presque exclusivement à la face interne de la membrane plasmique en situation physiologique. [130], [131], [132], [133], [134]. Cette asymétrie est régulée par l'action conjointe de trois transporteurs : flippase, floppase et scramblase : [127]

- Les flippases ATP-dépendantes (P4 ATPases) qui sont des translocases spécifiques des aminophospholipides, utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour assurer le transport rapide (t<sub>1/2</sub> de quelques minutes) des PS et des PE du feuillet externe vers le feuillet interne de la bicouche lipidique. [128], [131]
- Les floppases ATP-dépendantes qui ne sont pas spécifiques entrainent un transport cinétiquement beaucoup plus lent et dans le sens inverse de celui des flippases aussi bien des aminophospholipides que des cholinephospholipides donc du feuillet interne vers le feuillet externe. [127] Il en résulte une concentration des cholinephospholipides majoritairement au niveau du feuillet extracellulaire. Le flux de translocation des aminophospholipides dirigé vers le feuillet externe étant très inférieur à celui dirigé vers le feuillet interne, ceux-ci se trouvent alors concentrés au niveau du feuillet interne de la bicouche lipidique. [132], [135]
- La scramblase Ca<sup>2+</sup> dépendante (son activation nécessite un influx de Ca<sup>2+</sup>) non spécifique qui permet aux lipides de se mouvoir entre les deux feuillets selon leur gradient de concentration. [127]

A concentration physiologique de  $Ca^{2+}$ , la scramblase est inactive, tandis que la flippase (translocase) et la floppase sont actives ce qui permet le maintien de l'asymétrie de distribution des phospholipides au niveau de la membrane plasmique.

Les mécanismes de la distribution des phospholipides membranaires sont schématisés au niveau de la figure suivante :



Figure 19. Mécanisme de la distribution des phospholipides au niveau des membranes du RE (réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi et de la membrane plasmique (MP) en situation physiologique. Schéma inspiré des références [127], [128], [129] [130]. Abréviations : PC : Phosphatidylcholine ; PS : Phosphatidylsérine ; PE : Phosphatidyléthanolamine ; SM : Sphingomyéline ; Cer (Céramide) ; DAG (Diacylglycérol) ; LPTs : protéines de transports des lipides.

## 3.1.2. Intérêt de la cible moléculaire

Comme l'asymétrie de répartition des phospholipides au niveau de la membrane plasmique est de règle au niveau des cellules normales, la perte de cette asymétrie, plus particulièrement l'apparition de la PS à la surface de la cellule est associée à de nombreux phénomènes physiologiques et pathologiques : [125]

## 3.1.2.1. Activation plaquettaire, coagulation sanguine et thrombose

L'activation plaquettaire induit une augmentation de la concentration cytosolique de Ca<sup>2+</sup> qui est la résultante d'un influx de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire et d'une libération de stocks intracellulaires. [125] Ceci a pour conséquence une activation de l'activité scramblase [127], [130], [136], [137] et/ou une inhibition de l'activité translocase (P4-ATPase), générant ainsi une rupture brutale de l'asymétrie phospholipidique membranaire. [136],[137]

L'apparition des PS chargées négativement au niveau du feuillet externe des plaquettes induit les processus de coagulation et de thrombose car elle stimule l'assemblage et l'activation des complexes prothrombinase et tenase. [125], [129] (Figure 20-A)



Figure 20. Implication de la PS dans la coagulation sanguine (A) et dans l'apoptose cellulaire (B) [129]

Le développement de traceur ciblant la PS peut trouver son intérêt dans les pathologies avec une composante d'activation plaquettaire telles que les endocardites infectieuses [138], le thrombus mural dans l'anévrisme de l'aorte abdominale [139], la plaque d'athérome vasculaire [140]...

#### 3.1.2.2. Apoptose cellulaire

La perte de l'asymétrie de distribution des phospholipides membranaires et l'externalisation des phosphatidylsérines à la surface cellulaire est aussi l'une des manifestations les plus précoces de la mort cellulaire programmée par apoptose. [141], [142]. Cette externalisation est la conséquence de l'activation des caspases qui bloquent l'action des flippases (plus spécifiquement la flippase ATP11C qui est spécifique des aminophospholipides [143]) [142] et activent l'action des scramblases. (Figure 20-B). Les phosphatidylsérines ainsi exposées permettent la reconnaissance des cellules par les macrophages et leur phagocytose. [125], [136]

Il a été démontré que l'élévation du taux d'exposition de PS est à l'origine de la réduction de la durée de vie des érythrocytes dans les drépanocytoses et les bêta-thalassémies. De plus la PS présente au niveau du feuillet intracellulaire assure en se liant à la spectrine, la stabilité mécanique de la membrane, ses propriétés élastiques et la préservation de la forme de la cellule. [136]

Le développement de vecteurs ciblant la PS peut être intéressant dans la détection de pathologies présentant à des stades précoces de leur évolution une apoptose cellulaire. Nous citons à titre d'exemple la myocardite [144], l'ischémie myocardique [142], [145], la sclérose en plaques [146], la maladie d'Alzheimer. [141], [147]

Le ciblage de la PS comme marqueur cellulaire de l'apoptose peut aussi être utile dans l'évaluation de l'efficacité thérapeutique des cancers. [148]

## 3.1.3. Les ligands d'intérêt pour le ciblage de la PS

## 3.1.3.1. Ligands protéiques

L'annexine V, appelée aussi annexin A5 (AnxA5) chez l'espère humaine [149] est le ligand protéique le plus largement utilisé pour le ciblage de la PS. Il s'agit d'une protéine endogène (36 kDa) qui se lie spécifiquement et avec une affinité nanomolaire à la PS [150] selon une réaction calcium-dépendante. [2], [151], [152] Elle fait partie de la superfamille des annexines qui sont toutes caractérisées structurellement par la présence de deux domaines : une « tête » ou extrémité N-terminale qui est variable en fonction de l'annexine et probablement responsable de la spécificité fonctionnelle de chaque annexine, [153] et un « noyau » ou domaine COOH bien conservé d'une annexine à une autre. [149] Le noyau de l'annexine est composé de 4 domaines homologues d'environ 70 acides aminés (I, II, III et IV) [150], [152], [153] composé chacun de 5 segments  $\square$ hélicoïdaux (A, B, D et E disposés de façon cylindrique et coiffés par l'hélice C (Figure 21). [152] La forme générale de ces molécules est celle d'un disque légèrement plié dans lequel les quatre domaines répétitifs sont disposés autour d'un trou central hydrophile qui pourrait être responsable de l'activité des canaux calciques voltage-dépendants lorsque l'annexine se lie aux membranes.



Figure 21. Structure de l'annexine A5. [153]

L'annexine A5 radiomarquée au <sup>99m</sup>Tc (AnxA5) a été utilisée avec succès comme agent d'imagerie moléculaire de l'apoptose et du thrombus en préclinique [150], [154], chez des volontaires sains [155] ou chez des patients en oncologie [156] ou encore pour l'imagerie TEMP cardiovasculaire. [157] Elle pourrait constituer un vecteur intéressant pour le développement d'un traceur pour l'imagerie par émission de positons. L'essai de plusieurs dérivés de l'annexine A5 a démontré que la présence d'au moins 3 domaines actifs au niveau de la structure est nécessaire pour avoir une affinité de liaison suffisante pour une application en imagerie. La présence des 4 domaines entraîne une fixation optimale dans les tissus apoptotiques. [158]

#### 3.1.3.2. Ligands peptidiques

Peu de peptides ciblant la PS ont été développés comme agents d'imagerie. Ils sont en effets moins affins que les protéines, [159] mais présentent tout de même beaucoup d'avantages comparativement aux vecteurs protéiques, comme par exemple une production plus simple et moins coûteuse, [160] une biodistribution plus favorable et un accès à la cible plus facile du fait de leurs tailles réduites ainsi qu'une moindre immunogénicité. [159]

Parmi les tentatives de développements d'agents d'imagerie peptidiques de la PS, Burtea et coll. ont isolé par la technique de Phage display des peptides qui se lient spécifiquement à la PS avec une affinité élevée (PGDLSR (R824), DAHSFS (R825) et LIKKPF (R826))

La complexation des peptides sélectionnés au gadolinium a permis de mettre au point un agent de contraste pour l'imagerie de l'athérosclérose. [160] Un autre peptide, le PSP1

(CLSYYPSYC) a été conjugué à un fluorophore par Kim et coll. et a montré une supériorité de ciblage des cellules apoptotiques chez un modèle de cancer de souris traitées par camptothécine. [159]

Le développement de l'un de ces peptides pour l'imagerie TEP permettrait d'avoir un outil de diagnostic beaucoup plus sensible que l'IRM ou l'imagerie optique.

## 3.2. La P-SÉLECTINE

## 3.2.1. Structure et interactions

La P-sélectine (CD62P), appelée anciennement GMP-140 (Granule Membrane Protein 140) ou PADGEM (Platelet Activation Dependent Granule External Membrane protein) est une molécule d'adhésion cellulaire de 140 Da [161] qui fait partie de la famille des sélectines regroupant les L, E et P-sélectines (L pour Leucocytes ; E pour Endothélium et P pour plaquettes). [162] C'est une glycoprotéine à un domaine transmembranaire localisée au niveau des granules  $\Box$  des plaquettes et dans les corps de Weibel Palade de l'endothélium au repos. [163] Elle est rapidement transloquée à la surface cellulaire lorsque l'endothélium et les plaquettes sont activés. [164] Structurellement, la portion extracellulaire de la P-sélectine est constituée de 3 domaines différents: Un domaine EGF (Epidermal Growth Factor) et neuf domaines répétitifs (CR : Consensus Repeat domain de ~ 60 acides aminés). La P-sélectine est ancrée au niveau de la membrane plasmique par un seul domaine transmembranaire hélicoïdal suivi d'une « queue » intracytoplasmique. [162], [163]



Figure 22. Structure de la P-sélectine ([162]et [165])

Le ligand naturel de la P-sélectine est le P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), un homodimère exprimé principalement au niveau des leucocytes. [166] L'interaction P-sélectine/PSGL-1 (Figure 23) a pour conséquence un recrutement des leucocytes au niveau des plaquettes et de l'endothélium activé (rolling leucocytaire). Cette interaction fait intervenir :

 au niveau de l'extrémité N-terminale de la P-sélectine le domaine lectine calciumdépendant



**Figure 23. Interaction P-sélectine-PSGL-1. Adaptation de [165] avec [164] et [167]** Abréviations: Gal : Galactose ; GalNac : N-acétylgalactosamine ; GlcNAc : N-acétylglucosamine ; SLe<sup>x</sup> : Sialyl Lewis x (tetrasaccharide encadré en bleu ciel)

2) au niveau de l'extrémité N-terminale du PSGL-1 :

- un O-glycane attaché au niveau de la Thr-57 contenant le Sialyl Lewis x (SLe<sup>x</sup>), un tetrasaccharide indispensable à l'interaction avec la P-sélectine, composé de D-galactose, N-acétylglucosamine, acide sialique et L-fucose. (encadré en bleu-ciel) [168]

- Deux ou trois résidus Tyrosine sulfate (Tyr-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>). [168] La Tyr-48 sulfate est indispensable à cette interaction et au rolling leucocytaire. Son blocage ou son remplacement par un autre acide aminé entraîne en effet une perte de l'interaction. Ceci n'est pas observé avec les résidus Tyr-46 et Tyr-51 Cependant, leur substitution affecte la cinétique et la stabilité de l'interaction P-sélectine/PSGL-1. [169]

## 3.2.2. Intérêt de la cible moléculaire

La P-sélectine est rapidement transloquée à la surface des plaquettes et de l'endothélium activés en réponse à des stimuli inflammatoires. [170] La P-sélectine est donc un marqueur de l'inflammation et d'un certain nombre de pathologies associées à une activation plaquettaire telles que les thromboses (veineuse profonde ou artérielle), l'athérosclérose, ou à une activation endothéliale à l'image des ischémies (syndrome coronaire aigu) ou les lésions conséquentes à des épisodes répétés d'ischémie-reperfusion telles que celles observées au cours des anémies falciformes (drépanocytoses). [163] L'extravasation des cellules tumorales au cours des métastases peut être aussi une conséquence du rolling leucocytaire induit par les sélectines. [167] La P-sélectine est aussi un ligand pour les protéoglycanes, des héparanes

sulfates dont l'expression à la surface des cellules tumorales est associée à un mauvais pronostic et à l'existence de métastases. [171]

L'implication de la P-sélectine dans les maladies inflammatoires, thrombotiques et tumorales en font donc une cible d'intérêt pour le développement de traceurs pour l'imagerie moléculaire de ces pathologies.

# 3.2.3. Le fucoïdane : un ligand polysaccharidique d'intérêt pour le ciblage de la P-sélectine

Des anticorps monoclonaux ont été utilisés avec succès pour le ciblage de la Psélectine. [172] Cependant comme tous les anticorps, ils présentent des limites qui sont essentiellement dues à leur grande taille, leur immunogénicité potentielle et une production complexe et coûteuse.

Le SLe<sup>x</sup> a été utilisé pour cibler la P-sélectine. [173] Cependant, son affinité pour la cible est très faible (K<sub>d</sub>=0,1-5 mM). [174] Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'interaction avec la P-sélectine nécessite en plus la présence de groupement sulfates. Plusieurs études ont montré que des mimes synthétiques du SLe<sup>x</sup> interagissent avec la P-sélectine avec une plus grande affinité : des oligosaccharides sulfatés [175], [176], [177] ; ou encore des polysaccharides sulfatés : héparine, sulfate de dextrane, fucoïdane. [175] Ces composés peuvent constituer des ligands intéressants pour le développement de traceurs pour l'imagerie nucléaire de la Psélectine. Une étude comparative de l'interaction de la P-sélectine avec ces trois polysaccharides de bas poids moléculaire a été effectuée par Bachelet et coll. Le fucoïdane inhibait la liaison de la P-sélectine au Sialyl Lewis x avec une IC<sub>50</sub> de 20 nM, par rapport à 400 nM pour l'héparine et >25 000 nM pour le sulfate de dextrane. Il présentait l'affinité la plus élevée pour la P-sélectine immobilisée avec un K<sub>D</sub> de 1,2 nM, deux ordres de grandeur de plus que les autres polysaccharides. La spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence la formation d'un complexe entre la P-sélectine et le fucoïdane. De plus, l'intensité de la liaison du fucoïdane aux plaquettes était dépendante du niveau de l'activation plaquettaire. La compétition entre le fucoïdane et un anticorps anti-P-sélectine a validé la spécificité de l'interaction. [178] Parmi ces trois polysaccharides sulfatés de bas poids moléculaire, le fucoïdane est donc le meilleur candidat pour le développement d'un agent d'imagerie moléculaire.

Structurellement, les fucoïdanes sont des polymères de fucoses sulfatés retrouvés principalement dans les parois cellulaires fibrillaires et les espaces intercellulaires des algues marines brunes nommées aussi *Phaeophyceae* ou Phéophycées. [179] Les structures des

fucoïdanes peuvent varier d'une espèce à une autre. [180] Le squelette renferme des résidus  $\alpha$  -L-fucopyranose qui peuvent être organisés en chaînes linéaires de  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3)-fucans ou une alternance de  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3)-L-fucopyranose et  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4)-L-fucopyranose. [179], [181] Les résidus L-fucopyranose peuvent être substitués avec des groupements sulfates (SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) au niveau des positions C-2, C-4 (rarement C-3). Des chaînes latérales de fuco-oligosaccharide peuvent également se brancher en O-4 des résidus L-fucopyranoses. [167] La structure peut renfermer d'autres monosaccharides : Galactopyranosyl (Gal*p*), mannopyranosyl (Man*p*), xylopyranosyl (Xyl*p*) ainsi que des acides uroniques. [182]

Le fucoïdane sélectionné pour le développement de traceurs pour l'imagerie nucléaire est extrait d'une espèce d'algue brune, *Ascophyllum nodosum* produit et commercialisé par la société Algues et Mer. Il est disponible en grandes quantités et à faible coût ce qui constitue en soi un grand avantage comparé aux autres ligands de la P-sélectine.



Figure 24. Structure schématique du fucoïdane extrait d'Ascophyllum nodosum. [183] (modifiée)

Ce fucoïdane a permis le développement par le laboratoire LVTS (Laboratory for Vascular Translational Science) d'un agent d'imagerie TEMP (<sup>99m</sup>Tc-Fucoïdane) qui a montré sa capacité à détecter *in vivo* deux situations pathologiques caractérisées par une surexpression de P-sélectine : 1) l'activation plaquettaire sur deux modèles : le thrombus mural de l'anévrysme de l'aorte abdominale et la végétation de l'endocardite infectieuse 2) l'activation endothéliale dans les modèles d'ischémie-reperfusion myocardique [184] et de myocardite auto-immune [185] chez le rat. Ce travail ainsi que le développement d'un fucoïdane comme agent d'imagerie multimodale a été breveté. [186] Le développement d'un fucoïdane marqué au gallium 68 permettrait de s'affranchir des limites de l'imagerie par émission monophotonique et d'avoir donc une meilleure résolution spatiale, une plus grande sensibilité

de détection et un outil d'imagerie quantitative. La résolution spatiale est particulièrement cruciale lorsque c'est la paroi vasculaire qui est explorée, car de petite taille et donc avec un effet de volume partiel important qui limite les possibilités de quantification. [187], [188] Un travail de revue de littérature sur l'imagerie moléculaire des sélectines dans l'activation endothéliale a été publié :

## <u>Article 1</u> : Molecular Imaging of Selectins in Endothelial Activation (Publié)

Molecular Imaging of Selectins in Endothelial Activation, *Curr. Cardiovasc. Imaging Rep.*, vol. 5, no. 4, pp. 199–202, May 2012.

F. Rouzet, J.-B. Michel, F. Chaubet, R. B. Azzouna, D. Letourneur, and D. L. Guludec
## **Molecular Imaging of Selectins in Endothelial Activation**

François Rouzet · Jean-Baptiste Michel · Frédéric Chaubet · Rana Ben Azzouna · Didier Letourneur · Dominique Le Guludec

© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Keywords Selectins · Molecular imaging · Endothelial activation · Fucoidan · Nanoparticles

#### Introduction

Selectins are cell adhesion molecules mainly involved in regulation of leukocyte trafficking [1]. Leukocyte extravasation is involved in a wide range of pathophysiological processes such as neurodegenerative diseases, rheumatoid arthritis, graft rejection, etc. In the cardiovascular field, selectins expression has been evidenced in early steps of atherosclerosis as in most degenerative cardiovascular diseases. Platelet expression of P-selectin links platelet aggregates to leukocyte retention, mainly neutrophils. L-selectin

F. Rouzet · J.-B. Michel · F. Chaubet · R. Ben Azzouna · D. Letourneur · D. Le Guludec Inserm, U698, Cardiovascular Bioengineering, Paris, France

F. Rouzet · J.-B. Michel · R. Ben Azzouna · D. Le Guludee University Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

F. Rouzet · R. Ben Azzouna · D. Le Guludec Department of Nuclear Medicine, Bichat-Claude Bernard Hospital, AP-HP, Paris, France

F. Chaubet · D. Letourneur Institut Galilée, University Paris 13, Villetaneuse, France

F. Rouzet (⊠) Insern, U698, Cardiovascular Bioengineering, Bichat-Claude Bernard Hospital, 46 rue H. Huchard, 75877 Paris Cedex 18, France e-mail: francois.rouzet@bch.aphp.fr

Published online: 15 May 2012

is expressed on all circulating leukocytes and directly involved in their trafficking between blood and tissue. Endothelial expression of P-selectins and E-selectins is also provoked by ischemia, and may be a relevant target in the setting of retrospective identification of transient ischemia (ischemic memory). This article briefly reviews agents currently under development to achieve molecular imaging of selectins in endothelial activation, and deals with main issues to be addressed before clinical translation.

### Structure and Function of Selectins

Selectins share a common structure composed of an Nterminal lectin-like domain, an epidermal growth factorlike domain, and a variable number of complement regulatory-like repeats [2]. Selectins are expressed by activated endothelium (E-selectin and P-selectin), and activated platelets (P-selectin). Activation of endothelial cells results from pro-inflammatory mediator release (tumor necrosis factor-α, interleukin-1, histamine, bacterial lipopolysaccharide). L-selectin is constitutively expressed by most leukocytes and binds to endothelium of high endothelial venules in lymph nodes, and is shed upon activation [1]. Selectins ligands are glycoconjugates such as sialyl Lewis x (sLex), a fucosylated tetrasaccharide able to bind with high affinity both Eselectin and P-selectin. The counterreceptor of Pselectin on leukocytes is P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1), a homodimeric mucin rich in O-glycans and N-glycans, that also binds with lower affinity Eselectin and L-selectin [3]. Interaction between PSGL-1 and selectins is responsible for leukocytes tethering and rolling on endothelium surface, which is the first step toward leukocytes transmigration from vascular compartment to tissues.

Springer

### Pathophysiology

In the cardiovascular field, the two major conditions associated with vascular selectins overexpression are atherothrombosis and ischemia-reperfusion. There is a strong interplay between initiation and progression of atherothrombosis and leukocyte traffic which is associated with endothelial expression of adhesion molecules [4]. Particularly, selectins are preferentially expressed at early stages of the disease. Acute ischemia provokes exocytosis of Weibel-Palade bodies from endothelial cells resulting in a rapid and intense expression of P-selectin [1], followed by a delayed, transcription-dependent synthesis and expression of E-selectin [5]. Selectins overexpression persists in the area at risk after resolution of the ischemic event, and is consequently particularly suited as marker of ischemic memory [6].

#### **Imaging Agents**

#### Ligands

Three main classes of selectins-targeted agents were reported: antibodies, carbohydrates mimicking sLex, and peptides. Antibodies have been widely used to target either P-selectin or E-selectin with almost all imaging modalities. However, this approach suffers major drawbacks for a clinical translation: cost, prolonged blood half-life, and immunogenicity. Therefore many efforts were made toward smaller, furtive vectors. Consequently, synthetic analogs of sLe<sup>x</sup> or polysaccharides mimicking sLe<sup>x</sup> were developed. They usually present a high affinity for selectins and they are readily conjugated to polysaccharide-coated nanoparticles. Alternatively, peptides with high affinity for Eselectin, obtained by recombinant peptide display technology have been designed as targeting moieties both with radioisotope [7, 8], and iron oxide particles [9] for nuclear or magnetic resonance (MR) detection respectively.

### Imaging Modalities

#### Ultrasound

Targeted contrast ultrasound agents rely on microbubbles or acoustically active nanoparticles coated with a specific ligand [10]. These agents are generally confined to the vascular space, but this is not an issue in the setting of detection of endothelial activation. Microbubbles coated with  $sLe^x$ proved to be able to localize and quantify the extent of post-ischemic myocardium in a rat model of ischemiareperfusion [11]. In order to detect early stages of atherosclerosis, a similar agent targeting both P-selectin and

D Springer

Curr Cardiovasc Imaging Rep

vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) was shown to provide signal intensity related to aorta inflammation in mouse [12]. Main advantages of an ultrasound-based approach are cost, speed, ease of use, and potential wide utilization in clinical screening. Due to the relatively short blood half-life of microbubbles, sequential injections are possible. Finally, this technique allows for simultaneous acquisition of structural and functional informations. Limitations are a relative low sensitivity and potential safety issues related to the nature of nanoparticles.

#### MR

Targeted enhancement of MR contrast may be achieved by conjugating a specific ligand with gadolinium (T1 effect) through a bifunctional chelating agent, or alternatively by superparamagnetic particles of iron oxide (T2 effect) conjugated with ligands through dextran or polymere coat [13]. Most targeted MR imaging agents have been designed on the basis of functionalized iron oxide nanoparticles due to their superior contrast compared with T1-agents. Such an approach has been reported in a rat model of brain immune disease (experimental autoimmune encephalomyelitis) using a glyconanoparticle mimicking sLex [14]. The authors reported the ability of this agent to detect brain lesions before the occurrence of morphological changes, since its binding to selectins do not require blood-brain barrier to be crossed to reach the target. Recently, micron size-range iron oxide particles conjugated to antibodies against both Pselectin and VCAM-1 (designed to mimic the tether-roll phase of leukocytes on activated endothelium) were shown to accumulate on atherosclerotic lesions in apoE<sup>-/-</sup> mice according to phagocyte content [15]. Main advantages of MR imaging are excellent soft tissue contrast (spontaneously and contrast-enhanced), sub-millimeter spatial resolution, and the ability to provide structural and functional informations (nearly) at the same time. Limitations are a lower sensitivity compared to optical and nuclear imaging, and potential safety issues related to the nature of nanoparticles.

### Optical

Few optical imaging probes have been developed to date in selectins imaging. A recent paper reports the use of near-infrared probe conjugated to anti-E-selectin antibodies in a mouse model of collagen-induced arthritis [16]. Optical imaging is a highly sensitive technique, with a poor spatial resolution. The lack of penetration of light in biological tissues is a limitation for deep structures, or requires invasive catheter-based detection devices.

Curr Cardiovasc Imaging Rep

#### Nuclear

A few imaging agents relying on radiolabeled antibodies targeting E-selectin were translated to phase 2 clinical trials, in rheumatoid arthritis [17, 18] and inflammatory bowel disease [19]. More recently, our group developed an approach of molecular imaging of selectins based on fucoidan [20], a sulfated polysaccharide (molecular weight 7.2 kDa) derived from brown seaweed mimicking sLe<sup>x</sup>, with a nanomolar affinity for P-selectin [21]. In a rat model of ischemiareperfusion, radiolabeled fucoidan was shown to bind selectively to activated endothelium. The intensity of the signal quantified in vivo by SPECT was correlated to the extent of the area at risk. Interestingly, fucoidan is widely available at a low cost, without safety issues reported in animals or humans. Moreover, fucoidan has already been efficiently conjugated with iron oxide nanoparticles [22], showing its versatility as a ligand for molecular imaging agents. These results support radiolabeled fucoidan as a relevant agent to account for ischemic memory, and the process of translation of the imaging agent into human utilization is underway.

#### Perspectives

Owing to potential major clinical impact, molecular imaging of selectins generates great research effort that encompasses most imaging modalities, as evidenced by the number of agents currently under development [10, 13, 23]. The overlapping function of both E-selectin and P-selectin in vascular biology (although their kinetics is different) together with their affinity for similar ligands encourages the development of agents targeting both selectins in order to increase detection sensibility without loss in biological process selectivity. Another approach is to build particles targeting a cell adhesion molecule additionally to P-selectin to enhance binding affinity [12, 15]. However, key issues remain to be solved before a potential clinical translation of a selectintargeted imaging agent. First, safety is unknown for most of these agents. Second, target population will be determined by the spreading of dedicated detection systems in the healthcare system: agents designed for screening purpose must be utilizable by a widespread detection system such as echography; conversely, MR or nuclear imaging basedagents are designed to a more selected population in secondary or tertiary referral centers. Finally, constraints such as cost and ease of use will be critical.

Acknowledgments The authors are supported by Inserm, and by a grant of the French Society of Cardiology and the French Federation of Cardiology, Inserm U698 is supported by the FAD European integrated project (http://www.fighting-aneurysm.org/). We wish to thank the Conseil Général d'Ile de France and the Paris Department for financial support to IMOVA-Medicen IdF.

**Disclosure** No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

#### References

- Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. Blood. 1996;88:3259–87.
- Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. J Clin Invest. 1993;91:379–87.
- McEver RP. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. Curr Opin Cell Biol. 2002;14:581–6.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. Circulation. 2002;105:1135–43.
- Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, Paulson JC, Todd RF, et al. Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. Circ Res. 1994;74:336–43.
- Porter TR. Cardiovascular imaging of remote myocardial ischemia: detecting a molecular trace of evidence left behind. Circulation. 2007;115:292–3.
- Martens CL, Cwirla SE, Lee RY, Whitehorn E, Chen EY, Bakker A, et al. Peptides which bind to E-selectin and block neutrophil adhesion. J Biol Chem. 1995;270:21129–36.
- Zinn KR, Chaudhuri TR, Smyth CA, Wu Q, Liu HG, Fleck M, et al. Specific targeting of activated endothelium in rat adjuvant arthritis with a 99mTc-radiolabeled E-selectin-binding peptide. Arthritis Rheum. 1999;42:641–9.
- Funovics M, Montet X, Reynolds F, Weissleder R, Josephson L. Nanoparticles for the optical imaging of tumor E-selectin. Neoplasia. 2005;7:904–11.
- Lindner JR. Molecular imaging of myocardial and vascular disorders with ultrasound. JACC Cardiovasc Imaging. 2010;3:204–11.
- Villanueva FS, Lu E, Bowry S, Kilic S, Tom E, Wang J, et al. Myocardial ischemic memory imaging with molecular echocardiography. Circulation. 2007;115:345–52.
- Kaufmann BA, Carr CL, Belcik JT, Xie A, Yue Q, Chadderdon S, et al. Molecular imaging of the initial inflammatory response in atherosclerosis: implications for early detection of disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010;30:54–9.
- McAteer MA, Akhtar AM, von Zur Muhlen C, Choudhury RP. An approach to molecular imaging of atherosclerosis, thrombosis, and vascular inflammation using microparticles of iron oxide. Atherosclerosis. 2010;209:18–27.
- van Kasteren SI, Campbell SJ, Serres S, Anthony DC, Sibson NR, Davis BG. Glyconanoparticles allow pre-symptomatic in vivo imaging of brain disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:18– 23.
- McAteer MA, Mankia K, Ruparelia N, Jefferson A, Nugent HB, Stork LA, et al. A Leukocyte-Mimetic Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent Homes Rapidly to Activated Endothelium and Tracks With Atherosclerotic Lesion Macrophage Content. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012.
- Gompels LL, Madden L, Lim NH, Inglis JJ, McConnell E, Vincent TL, et al. In vivo fluorescence imaging of E-selectin: quantitative detection of endothelial activation in a mouse model of arthritis. Arthritis Rheum. 2011;63:107–17.
- Jamar F, Chapman PT, Manicourt DH, Glass DM, Haskard DO, Peters AM. A comparison between 1111n-anti-E-selectin mAb and 99Tcm-labelled human non-specific immunoglobulin in radionuclide imaging of rheumatoid arthritis. Br J Radiol. 1997;70:473–81.
- Jamar F, Houssiau FA, Devogelaer JP, Chapman PT, Haskard DO, Beaujean V, et al. Scintigraphy using a technetium 99 m-labelled anti-E-selectin Fab fragment in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). 2002;41:53–61.

## Curr Cardiovasc Imaging Rep

- Bhatti M, Chapman P, Peters M, Haskard D, Hodgson HJ. Visualising E-selectin in the detection and evaluation of inflammatory bowel disease. Gut. 1998;43:40–7.
- Rouzet F, Bachelet-Violette L, Alsac JM, Suzuki M, Meulemans A, Louedec L, et al. Radiolabeled fucoidan as a p-selectin targeting agent for in vivo imaging of platelet-rich thrombus and endothelial activation. J Nucl Med. 2011;52:1433–40.
- 21. Bachelet L, Bertholon I, Lavigne D, Vassy R, Jandrot-Perrus M, Chaubet F, et al. Affinity of low molecular weight fucoidan for P-

selectin triggers its binding to activated human platelets. Biochim Biophys Acta. 2009;1790:141-6.

- Suzuki M, Serfaty J-M, Bachelet L, Louedec L, Chaubet F, Michel J-B, et al. In vivo targeted Molecular Imaging for Activated Platelets by MRI using USPIO-Fucoidan in Rat Abdominal Aortic Aneuryms. Circulation. 2010; [*abs*] A18399.
- Jubeli E, Moine L, Vergnaud-Gauduchon J, Barratt G. E-selectin as a target for drug delivery and molecular imaging. J Control Release. 2012;158:194–206.

D Springer

## 3.3. LES RÉCEPTEURS DE LA SOMATOSTATINE

## 3.3.1. La somatostatine

La somatostatine (SOM ou SS) ou SRIF (Somatotropin release inhibiting factor) [189] a été décrite pour la première fois en 1973. [116] C'est un polypeptide cyclique produit au niveau central, principalement l'hypothalamus et au niveau périphérique, principalement le tractus digestif. Elle existe sous deux formes actives : une de 14 acides aminés (a.a) (SS-14) qui prédomine dans l'estomac et le pancréas et une de 28 acides aminés (SS-28) qui prédomine dans l'intestin. [190] Les deux formes dérivent d'un précurseur commun, la préprosomatostatine de 116 acides aminés codé par un gène unique localisé au niveau du chromosome 3q28, qui est clivé en prosomatostatine (peptide de 96 a.a). [191] Sous l'effet d'une enzyme de type trypsine, la prosomatostatine mature dans les granules de sécrétion soit en SS-14, soit en SS-28 selon le tissu. [190]



Figure 25. Structures peptidiques des deux formes physiologiques actives de la somatostatine : SS-14 et SS-28. [190]

La somatostatine a été découverte et doit son nom à l'une de ses propriétés au niveau du système nerveux central : sa fonction de neurohormone inhibitrice de la sécrétion d'hormone de croissance (*growth hormone* ou GH) [192]

La somatostatine agit en se liant à des récepteurs appelés les récepteurs à la somatostatine (SSTR ou sst). Le motif Phe-Trp-Lys-Thr (FWKT) est essentiel pour la liaison de la somatostatine. [189]

## 3.3.2. Les récepteurs de la somatostatine (sst)

# 3.3.2.1. Biologie et pharmacologie moléculaire des récepteurs de la somatostatine

Six sous-types de récepteurs de la somatostatine (SSTR<sub>1</sub>, SSTR<sub>2A</sub>, SSTR<sub>2B</sub> SSTR<sub>3</sub>, SSTR<sub>4</sub> et SSTR<sub>5</sub> appelés également sst<sub>1</sub>, sst<sub>2A</sub>, sst<sub>2B</sub> sst<sub>3</sub>, sst<sub>4</sub> et sst<sub>5</sub>) ont été identifiés. Ils font partie de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (GPCRs) [193], [194] et partagent une topologie moléculaire commune : un noyau hydrophobe à 7 hélices  $\Box$  transmembranaires, trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires, une extrémité amino-terminale à l'extérieur de la cellule et une extrémité carboxy-terminale à l'intérieur de la cellule. [195]

Les domaines extracellulaires contiennent les sites de liaison au ligand, alors que les domaines intracellulaires sont médiateurs de l'activation du second messager lors de la transduction du signal. [196] Les protéines G sont des protéines hétérotrimériques ( $\Box$ ,  $\Box$ ,  $\Box$ ) associées aux récepteurs à l'état basal, qui sont activées par la liaison de la somatostatine sur son récepteur membranaire et transmet le signal hormonal du récepteur à l'effecteur intracellulaire, cet effecteur pouvant être une enzyme ou un canal ionique. Un récepteur donné peut se coupler à plusieurs protéines G, chaque protéine G étant capable d'activer un nombre limité d'effecteurs. La spécificité du signal transmis par le récepteur de somatostatine va donc dépendre de la protéine G interagissant avec ce récepteur. [197]

Les principales caractéristiques de ces récepteurs sont résumées au niveau du Tableau 14.

	sst1	sst2	sst3	sst4	sst5	Référence
Chromosome de localisation	14q13	17q24	22q13.1	20p11.2	16p13.3	[193],[198], [199]
Variants connus	Aucun	$sst_{2A}$ et $sst_{2B}$	Aucun	Aucun	sstTDM4 et TDM5	[190]
Acides aminés	391	369 (2A) 356 (2B)	418	388	363	[193],[198], [199]
Poids moléculaire (KDa)	53-72	71-79	65-85	45	52-66	[199]
Affinités de liaison (IC <sub>50</sub> ) (nM) SST-14 SST-28	1,1–2,26 2,2	0,2-1,3 4,1	1,4 <b>-</b> 1,6 6,1	0,5-1,8 1,1	0,9 0,07	[199]
Distribution tissulaire physiologique Cerveau Hypophyse Estomac Foie Pancréas	+ + + ±	+ + + +	++++++	+ ± +	± + +	[199] [199] [199] [199]
Pancreas	+	+++	+	±	+	[190], [199]

Tableau 14. Principales caractéristiques des réce	epteurs à la somatostatine.
---	-----------------------------

???

	sst1	sst2	sst3	sst4	sst5	Référence
		(cellules 🗆)	(cellules 🗆)		(cellules 🗆	
					et 🗋	
Reins	+	+				[199]
Poumons	+	±		+	±	[199]
Intestins	+	+	±	±	+	[199]
moelle	+	+	+	±	±	[199]
Thymus	+	+	+			[199]
Utérus	±	+		±	±	[199]
Transduction						
AC	$\Box(G_{i\Box},G_{iB})$	$\Box(G_{i\Box 1},G_{i\Box})$	$\Box(G_{i\square})$	$\Box(G_i/G_o)$	$(G_i/G_o)$	[197],[199]
Tyrosine phosphatase					/	[193],[199]
Canaux Ca <sup>2+</sup>						[198]
Canaux K <sup>+</sup>						[198]
Canaux Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>						[199]
MAP Kinase						[190]
Phospholipase						[190]
Fonctions inhibitrices						
Sécrétions						
hypophysaires (GH,	+	++			++	[190]
ACTH, TSH, PRL)						
Sécrétions						
pancréatiques		++			+	[190]
(insuline, glucagon)						
Sécrétions digestives	+	+		+	+	[190]
Transit digestif	+				+	[190]
Prolifération tumorale	++	++	+	+	+	[190]

Chaque sous-type de sst est responsable de différentes actions de la somatostatine via l'activation de différents systèmes intracellulaires (Figure 26) :

- l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC) qui entraîne :

\* la baisse des taux intracellulaires d'AMP cyclique,

\* la réduction des taux de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et

\* la stimulation de l'activité de la phosphotyrosine phosphatase ou de la MAP kinase.

Les effets inhibiteurs sur l'adénylate cyclase et sur l'influx de  $Ca^{2+}$  sont liés à l'inhibition des processus sécrétoires. L'activation de la tyrosine phosphatase et de la MAP kinase peut jouer un rôle dans l'effet régulateur sur la prolifération cellulaire ou l'apoptose. Dans ce contexte, l'activation des sst<sub>1</sub> et sst<sub>2</sub> via l'activation de tyrosine phosphatase, a été reliée à l'activité antimitotique des analogues de la somatostatine, alors que l'activation des sst<sub>5</sub> par la réduction du taux de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, entraîne également l'inhibition de la prolifération cellulaire. En outre, sst3 induit sélectivement l'apoptose. [196]

- <u>Stimulation d'une guanylate cyclase (sst<sub>2</sub> [200])</u>: induit la formation de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) [197] ce qui entraîne une inhibition des canaux calciques type L voltage-dépendants. [200]

## - Modulation des canaux ioniques (sst<sub>2)</sub> :

La somatostatine et ses analogues activent l'ouverture de différents types de canaux potassiques ( $K^+$ ) voltage-dépendants ce qui induit une hyperpolarisation de la membrane, conduisant à une inhibition de l'influx de calcium via des canaux Ca<sup>2+</sup> voltage-dépendants et provoquant ainsi une baisse de la concentration de calcium intracellulaire.

La somatostatine peut également inhiber l'influx de calcium en bloquant directement les canaux calciques voltage-dépendants.

La baisse de calcium intracellulaire résultant de la modulation des canaux ioniques intervient dans l'inhibition de la libération d'hormones et de neurotransmetteurs induite par la somatostatine. [197]

- Stimulation des phosphatases :

La somatostatine et ses analogues stimulent une activité phosphatase membranaire dans certaines cellules tumorales ou normales ce qui entraîne la déphosphorylation de protéines phosphorylées. Ce mécanisme est impliqué dans l'effet inhibiteur de la somatostatine et de ses analogues sur la croissance des cellules.

Seuls les sous-types sst1 et sst2 sont impliqués dans l'activation de la tyrosine phosphatase. [197]

- Modulation de la phospholipase C (PLC)

Dans plusieurs modèles cellulaires, l'inhibition de la PLC par la somatostatine induit l'accumulation de l'inositol,-1,4,5-triphosphate (i3P). Les analogues de la somatostatine inhibent également la phospholipase C ce qui entraîne une diminution de la concentration de calcium intracellulaire.

Pour des concentrations élevées de la somatostatine (>1 nM), l'effet inverse peut être observé. [197]

- Inhibition de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (sst<sub>2</sub>[200])

En périphérie, un effet inhibiteur de la somatostatine sur l'échangeur  $Na^+/H^+$  a été rapporté. Cet effet conduit à une acidification du pH intracellulaire, il est indépendant des protéines G de type  $G_i/G_o$  et est médié par le récepteur sst1. [197] Cet effet peut être impliqué dans les effets antiprolifératifs du peptide. [192]

- Stimulation de la phospholipase A2

L'activation de sst4 par la somatostatine entraîne la phosphorylation et l'activation de la phospholipase  $A_2$  par les MAP-K (*mitogen activated protein kinases*) ce qui conduit à la

production de l'acide arachidonique. Cet effet serait impliqué dans l'ouverture des canaux K<sup>+</sup> voltage-dépendants de type M. [197]

Les voies de signalisation des sst (Figure 26) faisant suite à l'activation par un ligand sont similaires à celles des autres récepteurs couplés aux protéines G. [196] La liaison d'un agoniste à un récepteur de la somatostatine conduit à la phosphorylation du récepteur par les kinases couplées aux protéines G (GRKs) (protéine kinase A, C...) [196] et à un recrutement des  $\Box$ -arrestines. Ce processus est rapidement suivi d'une internalisation des complexes activés récepteur/arrestines dans des vésicules d'endocytose. Une haute affinité de liaison de l'agoniste est une condition préalable nécessaire à l'internalisation. Et l'intensité d'internalisation des sous types de récepteurs sst2, 3 et 5 est plus importante que celle des sstr1 et sstr4 après stimulation. [201]



Figure 26. Diagramme schématique des voies de signalisation faisant suite à la liaison de la somatostatine à ses récepteurs.

Schématisation réalisée en se basant sur les références [192], [196], [197], [200], [201].

AC (Adényl Cyclase) ; AMPc (Adénosine Monophosphate cyclique) ; TyrP (Phosphotyrosine phosphatase) ; Ca2<sup>+</sup> : calcium intracellulaire ; PLC (phospholipase C) ; i3P (inositol triphosphate) ; MAPK (*mitogen activated protein kinases*). Les agonistes entraînent une phosphorylation des sst et un recrutement des 🖙 arrestines. Ce processus est rapidement suivi d'une endocytose des complexes activés récepteur/arrestines et leurs déplacement vers différents compartiments intracellulaires conduisant soit au recyclage du récepteur vers la membrane cellulaire ou à leur dégradation au niveau des lysosomes. [201]

Les vésicules d'endocytose sont par la suite acheminées vers les endosomes au niveau desquels le complexe est dissocié, les récepteurs sont déphosphorylés et peuvent être alors directement recyclés au niveau de la membrane plasmique (concerne la quasi-intégralité des sstr<sub>2</sub> et sstr<sub>5</sub> activés) ou dégradés dans des lysosomes. Seul le sous-type sstr<sub>3</sub> suit cette voie, [131], [201] ceci pourrait être dû en partie à une particularité structurale des sst3 qui se distinguent des 4 autres par une insertion au niveau de la 3<sup>ème</sup> boucle intracellulaire et par l'absence d'un site de palmytoylation dans la partie C-terminale. [189]

Les récepteurs de la somatostatine peuvent être classés en deux classes qui se distinguent structurellement et pharmacologiquement : Le groupe SRIF-1 comprend les récepteurs sst2, sst3 et sst5 qui ont une affinité très élevée (nanomolaire) pour l'octréotide et certains analogues courts de la somatostatine, alors que l'autre groupe SRIF-2, comprend les récepteurs sst1 et sst4 qui possèdent au contraire une affinité très faible voire quasi absente pour ces mêmes composés. [200]

C'est dans les domaines transmembranaires que la similitude est la plus élevée et la comparaison des séquences à ce niveau permet de voir que les récepteurs sst1, sst4 d'une part et les récepteurs sst2, sst3 et sst5 d'autre part possèdent des similitudes marquées dans ces portions ou des divergences lorsque l'on compare deux membres n'appartenant pas au même groupe. Ces appariements structuraux sont confirmés par le profil pharmacologique des différents récepteurs qui se trouvent dans deux classes bien distinctes. [201]

## 3.3.2.2. Expression pathologique des récepteurs de la somatostatine

En plus de l'expression physiologique des récepteurs de la somatostatine, la surexpression de certains sous-types de récepteurs en situation pathologique en fait une cible de choix dans les explorations à visée diagnostique ou encore thérapeutique. [116] Même si son application essentielle est oncologique, elle a un potentiel en cardiologie en ciblant les phénomènes inflammatoires myocardiques et vasculaires. C'est pourquoi nous nous intéressons particulièrement à cette cible.

## 3.3.2.2.1. Intérêt de la cible moléculaire en cancérologie

## a) Tumeurs neuroendocrines

Des sous-types de récepteurs de la somatostatine sont surexprimés dans la plupart des tumeurs neuroendocrines telles que les adénomes hypophysaires, les tumeurs neuroendocrines pancréatiques [196] (gastrinomes, glucagonomes, insulinomes, non fonctionnelles [202]), les carcinoïdes gastrointestinales et pulmonaires, les paragangliomes ( $sst_2$ ,  $sst_4$  sont les plus représentés [202]), les phéochromocytomes ( $sst_2$ ,  $sst_4$  sont les plus représentés [202]), les carcinomes à petites cellules, les carcinomes à cellules de Merkel, les neuroblastomes, les carcinomes médullaires de la thyroïde (CMT) ( $sst_1$ ,  $sst_2$ ,  $sst_3$  et  $sst_5$ ).

Une grande hétérogénéité dans l'expression des différents sous-types des sst a été notée entre les différents types de tumeurs et même dans différents échantillons d'une même tumeur. Selon les données de la littérature il existe une co-expression des différents sous-types de sst au sein d'une même tumeur. Le sst<sub>2</sub> étant le plus représenté. [196]

## b) Tumeurs non neuroendocrines

L'expression des sst dans les maladies néoplasiques ne se limite pas à ces tumeurs provenant d'organes endocriniens ou des tissus classiquement définis comme cibles de la SS. Il a été démontré une expression variable des sst dans un large éventail de tumeurs solides ou de tumeurs hématologique malignes. Parmi les tumeurs épithéliales non neuroendocrines exprimant les sst, nous citons le cancer du sein, le cancer pulmonaire non à petites cellules, les tumeurs rénales, du pancréas et des voies biliaires, les tumeurs hépatocellulaires, colorectales, de l'ovaire et les carcinomes folliculaires dérivés de la thyroïde.

Les récepteurs sst<sub>1</sub>, sst<sub>2A</sub>, sst<sub>3</sub> et sst<sub>5</sub> ont été détectés par l'analyse des ARNm et des protéines dans les mélanomes malins. L'expression des sst a été détectée au niveau des sarcomes des tissus mous. Une forte expression des sst, plus particulièrement les sst<sub>2</sub> et sst<sub>1</sub> a été également reportée dans les tumeurs de cerveau comme les méningiomes, les gliomes [196] et les astrocynomes [202]. La présence de récepteurs a été démontrée dans les lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens. [196]

## 3.3.2.2.2. Intérêt de la cible moléculaire dans les maladies inflammatoires

La présence d'une forte densité de récepteurs de la somatostatine n'est pas synonyme de site tumoral. Les lymphocytes normaux et activés expriment les récepteurs de la somatostatine. Les récepteurs peuvent être détectés dans les pathologies avec infiltration lymphocytaire (l'ophtalmopathie basedownienne), dans les granulomes (sarcoïdose, la majorité des tuberculoses). [202]

Les macrophages activés expriment également les récepteurs de la somatostatine (sst<sub>2</sub>). Dans l'athérosclérose, la plaque d'athérome vulnérable a un large noyau lipidique et une chape fibreuse mince infiltrée par les macrophages. Comme les macrophages activés jouent un rôle

important dans la formation et, éventuellement, la rupture des plaques athérosclérotiques vulnérables, l'imagerie des macrophages peut fournir un moyen potentiel pour détecter et caractériser les plaques athéromateuses vulnérables. [203], [204]

## 3.3.3. Les analogues de la somatostatine : ligand d'intérêt des récepteurs de la somatostatine

Dans la circulation générale, la somatostatine (SRIF-14 et SRIF-28) est dégradée en quelques minutes (demi-vie biologique de 2-4 minutes [116]) ce qui limite son utilisation *in-vivo*. Il fut donc nécessaire de développer des analogues plus résistants aux dégradations enzymatiques que le peptide endogène pour pouvoir mener à bien des explorations à visée diagnostique ou thérapeutique des pathologies surexprimant les sst.

Il fut rapidement évident que la stabilisation de la séquence entière du SRIF-14 était très difficile à obtenir et sans grand intérêt quand elle fût testée in vivo. [205] De plus, tous les acides aminés n'ont pas la même importance pour l'activité biologique du peptide. Les études structurales et fonctionnelles de SRIF-14 durant des années ont démontré que Phe<sup>7</sup>, Trp<sup>8</sup>, Lys<sup>9</sup>, et Thr<sup>10</sup> sont des acide-aminés responsables de son affinité de liaison et de son activité biologique. [194], [196] Il a été également décrit que l'interaction aromatique de Phe<sup>6</sup> et de Phe<sup>11</sup> stabilise la structure de la somatostatine. [194] SRIF-14 perd son affinité de liaison si la Lys<sup>9</sup> est remplacée par un autre acide aminé ou si la L-Lys est changée par une D-Lys. Le remplacement de la L-Trp<sup>8</sup> par la forme D pourrait augmenter la stabilité métabolique tout en préservant son affinité de liaison. [194] Cette augmentation de l'activité biologique ne pouvait pas s'expliquer seulement par une plus grande résistance à la protéolyse, mais représentait la première indication d'un repliement de la séquence essentielle, un -turn autour des acides aminés -D-Trp-Lys du SRIF-14. [205] La fraction cyclique de la structure est nécessaire au maintien de l'activité biologique. Cependant, la réduction de la taille de la structure cyclique et la modification des 4 résidus-clef pourrait réduire la flexibilité de la somatostatine et augmenter aussi la sélectivité pour les sous-types de récepteurs. Par exemple, les analogues de la somatostatine sont sélectifs au sst3 si le résidu Trp<sup>8</sup> est remplacé par une N-Imidazolebenzyl-histidine (imBzl-his). [194]

Le premier analogue utilisé en clinique est l'Octréotide. C'est un peptide de 8 acides aminés qui se lie avec une forte affinité aux  $sst_2$ , une affinité moyenne aux  $sst_3$  et  $sst_5$  et une affinité faible voire quasi-inexistante aux  $sst_1$  et  $sst_4$ . Il a été utilisé pour le traitement de l'acromégalie et des tumeurs neuroendocrines (NETs). [206] D'autres analogues ont été synthétisés (Lanréotide, Vapréotide, Pasiréotide ...) (Tableau 15). Mais de tous ces analogues, l'Octréotide et ses dérivés restent les plus largement utilisés comme produits d'imagerie étant donné leurs propriétés pharmacocinétiques améliorées et une meilleure spécificité pour la cible. L'<sup>111</sup>In-DTPA-Octréotide (<sup>111</sup>In-Pentétréotide, demi-vie biologique de 1,7-1,9h), obtenu par couplage du DTPA sur l'extrémité N-terminale de l'octréotide, est le premier peptide radiomarqué à avoir obtenu l'AMM pour un usage en scintigraphie aux Etats-Unis et en Europe sous le nom commercial d'Octréoscan<sup>®</sup>. [116] La scintigraphie à l'Octréoscan<sup>®</sup> a permis d'améliorer largement la connaissance des tumeurs neuroendocrines. L'utilisation plus récente des caméras hybrides SPECT/CT a permis d'améliorer la sensibilité de détection, cependant, la technique possède un certain nombre de limites. L'inconvénient le plus important est la faible résolution de l'imagerie SPECT qui est sujette aux artéfacts et à l'atténuation, ce qui limite sa capacité à détecter les lésions de tailles réduites. [207]

Les avantages de l'imagerie TEP par rapport à la SPECT a conduit à la conjugaison des dérivés de l'octréotide avec des chélatants comme le DOTA qui permettent de complexer le gallium 68, mais aussi de chélater des isotopes comme l'<sup>90</sup>Y et le <sup>177</sup>Lu ce qui permet leur utilisation à des fins thérapeutiques. [116] Les 3 analogues les plus utilisés en cliniques sont : DOTATOC, DOTATATE et DOTANOC. Ils ont montré leur supériorité pour la détection de lésions tumorales neuro-endocrines par rapport à l'OctreoScan<sup>®</sup> et à l'imagerie conventionnelle. [207] A titre d'exemple, l'étude effectuée par Hofman et coll. a permis de détecter 100% des tumeurs carcinoïdes avec le <sup>68</sup>Ga-DOTATOC, alors que la SPECT n'a identifié que 85% des cas. Le <sup>68</sup>Ga-DOTATOC permet d'avoir une plus forte accumulation tumorale conduisant à des contrastes Tumeur/tissu sain plus avantageux. L'accumulation rénale est par ailleurs beaucoup plus faible que celle de l'<sup>111</sup>In-Octréotide. [80]

L'analyse des données de la littérature (Tableau 15 et Figure 27) montre que pour un même chélatant (DOTA), et un même radioisotope métallique (Ga), un changement d'un seul acide aminé au niveau de la séquence peptidique entraîne une modification de l'affinité du peptide pour les récepteurs de la somatostatine. Ce qui aura pour conséquence une modification du marquage tumoral. Par exemple, la substitution de la Phe<sup>3</sup> du DOTAOC (DOTA-Octréotide) par une Tyr<sup>3</sup> (DOTATOC) augmente l'affinité du peptide pour les sst<sub>2</sub> et diminue l'affinité pour les sst<sub>3</sub> et pour les sst<sub>5</sub>. [208] Le remplacement du threonilol C-terminal du DOTATOC par une thréonine (DOTATATE), augmente l'affinité pour les sst<sub>2</sub> d'un facteur 12 et diminue considérablement l'affinité pour sst<sub>3</sub> et sst<sub>5</sub>. Le remplacement de la Tyr<sup>3</sup> du (DOTATOC) ou la Phe<sup>3</sup> du DOTAOC par un naphtyl (DOTANOC) augmente considérablement l'affinité pour sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub> et sst<sub>5</sub>. Comparé au DOTATATE, le DOTANOC, a une affinité 10 fois plus faible

pour les  $sst_2$ , mais au moins 25 fois plus élevée pour les  $sst_3$  et 50 fois plus importante pour les  $sst_5$ . DOTATATE et DOTANOC possèdent une affinité pour les  $sst_4$  au moins 3 fois plus importante que celle du DOTAOC et du DOTATOC. (Tableau 15 et Figure 27)

L'utilisation d'analogues ayant une affinité pour plus d'un type de sst présente un intérêt majeur étant donné qu'ils permettent l'exploration d'une gamme plus étendue de tumeurs exprimant d'autres types de sst que le sst<sub>2</sub>. [209] D'où notre intérêt particulier pour le DOTANOC qui a été choisi pour la mise en place du projet clinique qui sera présenté dans le chapitre 4.

L'analyse des données du Tableau 15 et de la Figure 29 montre aussi, que pour une même séquence peptidique, le remplacement d'un chélatant par un autre ou la chélation d'un radioisotope métallique différent par une même structure et par un même chélatant entraîne aussi des modifications de l'affinité du composé chimique pour les récepteurs de la somatostatine. [210] A titre d'exemple, pour le DOTATOC, l'affinité est plus importante pour les sst<sub>2</sub> lorsque celui-ci est chélaté au gallium. (Ga>In>Y). La Figure 28 montre en plus que l'effet du changement du métal sur l'affinité d'un même analogue est différent d'un récepteur à un autre. Pour le DOTANOC, l'affinité pour le sst<sub>2</sub> décroît dans cet ordre : Ga>In>Y>Lu. L'affinité pour sst<sub>5</sub> est aussi plus élevée lorsque l'analogue est complexé au gallium : Ga>Y>In>Lu. L'effet opposé est observé avec les sst<sub>3</sub> où l'affinité la plus faible est celle du DOTANOC complexé au gallium: In>Lu>Y>Ga.

La Figure 29 montre aussi que la conjugaison du TOC avec un dérivé du NOTA (le NODAGA) entraîne une moindre perte d'affinité que celle entraînée par sa conjugaison au DOTA. Le complexe Ga-NOTA présente par ailleurs une meilleure stabilité thermodynamique *in vivo* comparé au Ga-DOTA [116] et une cinétique de marquage beaucoup plus avantageuse (marquage possible à température ambiante). Malgré tous ces avantages, les DOTA-peptides restent les plus largement utilisés du fait de la disponibilité du DOTA sous forme GMP et de l'abondance des données de la littérature relatives à la toxicité. [211] Le développement d'analogues conjugués au NOTA et à ses dérivés constitue cependant une voie de développement intéressante. D'où notre travail sur le NODAGANOC présenté dans le chapitre 4.

Analoguo	Structure		ffinité (IC <sub>50</sub>	en nM ± éca	rt type moy	/en)	Dáfáranca
Allalogue			sst <sub>2</sub>	sst <sub>3</sub>	sst <sub>4</sub>	sst <sub>5</sub>	Kelerence
Octréotide (SMS 201-995)	D-Phe-c[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-ol	>10000	2,0±0,7	187±55	>1000	22±6	[206], [208]
DTPA-Octréotide (DTPAOC) (Octréoscan®)	DTPA-D-Phe-c[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-ol	>10000	12±2	376±84	>1000	299±50	[208]
<sup>111</sup> In-DTPA-Octréotide ( <sup>111</sup> In-Pentetreotide) (In-DTPA-OC)	<sup>111</sup> In-DTPA-D-Phe-c[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-ol	>10000	22±3.6	182±13	>1000	237±52	[208]
DOTA-Octréotide (DOTA-OC)	DOTA-D-Phe-[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol)	>10000	14±3	27±9	>1000	103±39	[208]
Ga-DOTA-Octréotide (Ga-DOTA-OC)	Ga-DOTA-D-Phe-[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol)	>10000	7,3±1,9	120±45	>1000	60±14	[208]
In-DOTAOC	In-DOTA-D-Phe-[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol)		14				[212]
Y-DOTAOC	Y-DOTA-D-Phe-[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol)	>10000	20±2,2	27±8	>1000	58±22	[213]
[Tyr <sup>3</sup> ]-Octréotide (TOC)	-D-Phe-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol)		2.8±0,6	225±82		9,9±1,8	[208], [147]
DOTA-[Tyr <sup>3</sup> ]-Octréotide (DOTATOC)	DOTA-D-Phe-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol)	>10000	14±2,6	880±324	>1000	393±84	[208]
Ga-DOTATOC	Ga-DOTA-D-Phe-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol)	>10000	2,5±0,5	613±140	>1000	73±21	[208], [215]
In-DOTATOC	In-DOTA-D-Phe-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol)	>10000	4,6±0,2	120±26	230±82	130±17	[210]
Y-DOTATOC	Y-DOTA-D-Phe-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol)	>10000	11,4±1,7	389±136	>10000	204±92	[213]
NODAGA-Tyr3-octreotide (NODAGATOC)	NODAGA-D-Phe-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol)	>10000	3,2±1,0	675±225	>1000	305±85	[216]
Ga-NODAGATOC	Ga-NODAGA-D-Phe-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol)	>1000	3,5±1,6	325±55	>1000	185±35	[216]
In-NODAGATOC	In-NODAGA-D-Phe-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol)	>1000	1,7±0,2	293±71	320±17	44±8	[216]
Lanréotide (BIM 23014)	D- □Nal-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH <sub>2</sub>		1,6±0,4	438±39		7,4±1,2	[147], [217]
DOTA-Lanréotide (DOTALAN)	DOTA-D-□Nal-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH <sub>2</sub>	>10000	26±3,4	771±229	>10000	73±12	[191], [208], [217] [215]
Y-DOTALAN	Y-DOTA-D-□NaI-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH <sub>2</sub>	>10000	22,8±4,9	290±105	>1000	16,3±3,4	[213]
Vapréotide (RC160)	D-Phe-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Trp-NH <sub>2</sub>		1,8±0,3	233±34		4,8±0,9	[208], [147]
DOTA-Vapréotide DOTAVAP	DOTA-D-Phe-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Trp-NH <sub>2</sub>	>10000	29±7	419±104	743±190	80±19	[208]
[ <sup>125</sup> I]-Tyr <sup>3</sup> -Octréotate ([ <sup>125</sup> I]-TATE)	-D-Phe-[Cys-[ <sup>125</sup> I]-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr	>1000	0,47±0,2	187±38	337±57	50±5,8	[218]
DTPA-[Tyr <sup>3</sup> ]-Octréotate (DTPATATE)	DTPA-D-Phe-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr	>10000	3,9±1	>10000	>1000	>1000	[208]

Tableau 15. Caractéristiques de différents analogues de la somatostatine utilisés en imagerie clinique

?

Analogua	Structure		Affinité (IC <sub>50</sub> en nM ± écart type moyen)				
Allalogue			sst <sub>2</sub>	sst <sub>3</sub>	sst <sub>4</sub>	sst <sub>5</sub>	Kelerence
In-DTPA-[Tyr <sup>3</sup> ]-Octréotate	In- DTPA-D-Phe-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr	>10000	1,3±0,2	>10000	433±16	>1000	[208]
DOTA-[Tyr <sup>3</sup> ]-Octréotate (DOTATATE)	DOTA-D-Phe-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr	>10000	1,5±0,4	>1000	453±176	547±160	[208]
Ga-DOTA-[Tyr <sup>3</sup> ]-Octréotate (Ga-DOTATATE)	Ga- DOTA-D-Phe-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr	>10000	0,2±0,04	>1000	300±140	377±18	[208], [215]
In-DOTATATE	In- DOTA-D-Phe-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr		1,5				[212]
Y-DOTATATE	Y- DOTA-D-Phe-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr		1,6±0,4	>1000		187±50	[214]
Y-DOTA-NOC	Y-DOTA-D-Phe-[Cys-1-Nal <sup>3</sup> -D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol)	>1000	3,3±0,2	26±1,9	>1000	10,4±1,6	[213]
In-DOTA-NOC	In-DOTA-D-Phe-[Cys-1-Nal <sup>3</sup> -D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol)	>10000	2,9±0,1	8±2	227±18	11,2±3,5	[148], [213]
Ga-DOTA-NOC	Ga-DOTA-D-Phe-[Cys-1-Nal <sup>3</sup> -D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol)	>10000	1,9±0,4	40±5,8	260±74	7,2±1,6	[144], [215]
Lu-DOTA-NOC	Lu-DOTA-D-Phe-[Cys-1-Nal <sup>3</sup> -D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol)	>10000	3,4±0,4	12±3,3	747±47	14±3,5	[219]
NOC-ATE	D-Phe-c[Cys- 1-Nal <sup>3</sup> -D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr	>1000	3,6±1,6	302±137	260±95	16,7±9,9	[210]
In-DOTA-NOC-ATE	In-DOTA-D-Phe-c[Cys- 1-Nal <sup>3</sup> -D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr	>10000	2±0,35	13±4	160±3,8	4,3±0,5	[210]
Lu-DOTA-NOC-ATE	Lu-DOTA-D-Phe-c[Cys- 1-Nal <sup>3</sup> -D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr	>1000	3,6±0,3	31±2		15±1	[214], [219]
Y-DOTA-NOC-ATE	Y-DOTA-D-Phe-c[Cys- 1-Nal <sup>3</sup> -D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr	>1000	4,2±2	47±1		12±1	[219]
Ga-DOTA-NOC-ATE	Ga-DOTA-D-Phe-c[Cys- 1-Nal <sup>3</sup> -D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr	>1000	2,6±0,3	113±80	53±30	25±4	[219]
In-DOTABOC	In-DOTA-D-Phe-[Cys-1-Bz-Thi-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol)	>1000	4,4±0,4	6,8±0,8		10,5±1,5	[219]
Lu-DOTABOC	Lu-DOTA-D-Phe-[Cys-1-Bz-Thi-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol)	>1000	4±0,4	6,3±0,2	591±88	6,5±0,1	[219]
Ga-DOTABOC	Ga-DOTA-D-Phe-[Cys-1-Bz-Thi-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol)	700±300	1,7±0,2	10,5±0,5		4,4±1,2	[219]
Y-DOTA-BOC-ATE	Y-DOTA-D-Phe-c[Cys-1-Bz-Thi-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr	>1000	2,9±0,3	23±1		7,8±2	[219]
Ga-DOTA-BOC-ATE	Ga-DOTA-D-Phe-c[Cys-1-Bz-Thi-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr	>1000	2±0,2	33±23	35±24	19,5±13	[219]



Figure 27 : Relation structure-affinité – Effet de la modification de la structure de l'analogue de la somatostatine sur l'affinité du peptide pour les sst2, sst3 et sst5



Figure 28. Effet du changement du métal sur l'affinité du DOTANOC



Figure 29. Relation structure-affinité de l'octréotide et du TOC, effet du changement du chélatant et du métal sur l'IC<sub>50</sub> au niveau de sst2, sst3 et sst5

Il est à noter aussi que les antagonistes des récepteurs de la somatostatine radiomarqués ont démontré des propriétés supérieures en imagerie par rapport aux agonistes des récepteurs.

Tans dis que les agonistes provoquent une forte internalisation mais se lient à un nombre limité de récepteurs, les antagonistes n'entrainent pas d'internalisation mais semblent se lier à un plus grand nombre de récepteurs de conformations différentes. L'utilisation d'antagonistes radiomarqués peut donc améliorer la sensibilité de l'imagerie de la tumeur et l'efficacité de la radiothérapie ciblée médiée par les récepteurs. [220] Cependant, la plus grande fixation des antagonistes au niveau des tissus non spécifiques peut limiter leur utilisation relativement aux agonistes. [211]

## CHAPITRE 4. PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les avantages de l'imagerie TEP par rapport à l'imagerie monophotonique ont contribué à l'expansion de son utilisation en Europe et dans le monde. L'énergie du positon émis par le fluor 18 (634 KeV) permet d'obtenir une résolution spatiale des plus élevées en imagerie nucléaire ce qui en fait l'isotope de référence pour ce type d'imagerie. Son utilisation pour le développement de nouveaux traceurs est cependant limitée aux centres qui sont équipés de cyclotrons. Dans l'objectif de développer des traceurs pour une application clinique ou préclinique en imagerie TEP, l'équipe de médecine nucléaire de Bichat Claude Bernard dont le centre est dépourvu de cyclotron a opté pour l'utilisation du gallium 68, accessible à partir d'un générateur dont l'utilisation est possible pendant une période d'au moins une année.

Comme prérequis indispensable à ce développement, nous allons traiter dans une **première partie** de ce travail de thèse de la mise en place d'outils et de méthodes de marquage au gallium 68.

Ces outils et méthodes seront utilisés dans <u>la deuxième partie</u> pour le marquage de vecteurs d'intérêt au gallium 68 en vue d'une application :

- <u>En clinique</u>: Le marquage du <sup>68</sup>Ga-DOTANOC a été mis en place et a permis de participer à une étude clinique multicentrique chez des patients atteints de tumeurs neuroendocrines gastroentéropancréatiques. En plus de la mise en place de la plateforme de production de ce peptide, les résultats préliminaires de cette étude seront décrits.
- 2) En préclinique :
  - a) Pour pallier aux limites de stabilité thermodynamique et d'inertie chimique des DOTA-peptides, nous nous sommes intéressés à un analogue de la somatostatine conjugué au NODAGA : le NODAGANOC. Les résultats préliminaires des essais de marquage, de stabilité et d'étude d'affinités seront présentés.
  - b) L'équipe de médecine nucléaire de Bichat Claude Bernard en collaboration étroite avec le laboratoire LVTS : Laboratory for Vascular Translational Science (Inserm U1148) et la FRIM (Fédération de Recherche en Imagerie Multimodalités) ont mis en place des outils d'imagerie nucléaire monophotonique pour le ciblage de la phosphatidylsérine (<sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Annexin A5) et de la P-sélectine (<sup>99m</sup>Tc-Fucoïdane). Les deux traceurs ont prouvé leur efficacité dans la détectabilité préclinique des thrombi. Dans l'objectif de pouvoir les utiliser un jour en clinique :

• Pour le ciblage de la PS : un mutant de l'annexine A5 a été produit selon les BPF. Dans une optique de sélectionner le ligand de la PS à développer en TEP, un travail comparatif de ce mutant par rapport à l'HYNIC-Annexin A5 sera présenté dans ce rapport. Le vecteur peptidique finalement choisi sera marqué au gallium 68 et testé sur un modèle d'endocardite infectieuse.

• Pour le ciblage de la P-sélectine : La production de fucoïdane de structure bien caractérisée et reproductible est indispensable pour pouvoir l'utiliser en clinique. C'est dans cette optique qu'une méthode de purification des fucoïdanes extraits d'algues brunes a été mise en place. Après un travail de caractérisation physico-chimique, ce produit a été fonctionnalisé, conjugué à un chélateur de gallium, marqué et testé sur un modèle d'endocardite infectieuse.

# 4.1. Première partie : Mise en place d'outils et de méthodes de marquage au <sup>68</sup>Ga

## 4.1.1. Caractérisation des générateurs <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga

Deux types de générateurs ont été utilisés pour les travaux de la thèse : un générateur de qualité chimique (Obninsk®) et depuis son arrivée sur le marché, un générateur fabriqué selon les bonnes pratiques de fabrication (dénommé <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga-Generator<sup>®</sup> puis Galliapharm<sup>®</sup> depuis son obtention de l'AMM en Europe le 10 juin 2015). Les générateurs sont fabriqués par la société Eckert & Ziegler (Allemagne). Le générateur de qualité chimique a été qualifié et commercialisé en Europe pour un usage clinique par l'Etablissement pharmaceutique Iason<sup>®</sup> et le générateur pharmaceutique est commercialisé en France par l'entreprise pharmaceutique Cyclopharma depuis son obtention de l'autorisation de mise sur le marché. Nous avons effectué une évaluation des rendements d'élution et des puretés radioisotopiques

des éluats des deux générateurs.

En fonction des résultats obtenus, des méthodes de purification/concentration des éluats ont été mises en place ou des méthodes de marquage direct qui peuvent être utilisées pour le marquage de vecteurs formulés sous forme de kits pharmaceutiques.

## 4.1.1.1. Rendements d'élution

Les deux générateurs utilisés sont formés d'une colonne à base d'une matrice inorganique de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) sur laquelle est adsorbé le radioélément père sous forme de chlorure de germanium 68 (<sup>68</sup>Ge de période 270,95 jours). Le fabricant recommande pour les deux générateurs une élution du radioélément fils (gallium 68 : <sup>68</sup>Ga de période 67,71 minutes) par 5 mL de HCl 0,1M. L'activité nominale chargée au niveau de la colonne est de 1850 MBq à la date de calibration dans les deux cas. [221], [222]

Le générateur de qualité chimique utilisé est l'Obninsk<sup>®</sup> produit par Cyclotron Co., Ltd, Obninsk, Russie. Lorsque le <sup>68</sup>Ge et le <sup>68</sup>Ga sont en équilibre, les rendements d'élution annoncés sont supérieurs à 70% pour une première élution et pas moins de 35% après 3 années d'utilisation ou après 400 élutions (2000 mL d'éluant). La vitesse d'élution recommandée est de 2,5 à 5 mL/min. La teneur en <sup>68</sup>Ge est  $\Box$  0,005%. [221]

Le générateur de qualité pharmaceutique utilisé est Galliapharm<sup>®</sup>. Ce générateur peut être utilisé en clinique pendant une année à la partir de la date de calibration. Les rendements d'élution annoncés sont supérieurs à 60% tout au long de la durée de vie du générateur si celui-ci est élué avec 5 mL de HCl 0,1M stérile à une vitesse ne dépassant pas 2mL/min. La

teneur en <sup>68</sup>Ge annoncée est inférieure à 0,001% de l'activité de <sup>68</sup>Ga éluée. Cette teneur peut être augmentée si le générateur n'est pas élué pendant plus de deux jours. [222]

Le rendement d'élution de <sup>68</sup>Ga de ces deux générateurs a été évalué. Il est exprimé par le rapport entre l'activité de <sup>68</sup>Ga et celle de <sup>68</sup>Ge (en équilibre avec le radioélément fils) présentes au niveau de la colonne du générateur au moment de l'élution.

Les résultats obtenus sont présentés au niveau du graphique suivant :



Figure 30. Rendement d'élution du générateur Obninsk<sup>®</sup> (pendant 309 jours) et du Pharmagrade generator (pendant 497 jours)

Les rendements d'élution du générateur de qualité chimique évalués sur une période de 455 jours sont plus élevés (73±7%) que ceux du générateur de qualité pharmaceutique (61±4%) sur la même période.

Les rendements d'élution du générateur de qualité chimique sont conformes aux spécifications annoncées par le fabricant. Cependant les rendements d'élution du générateur pharmaceutique peuvent être inférieurs aux 60% annoncés durant la durée de validité du générateur. Ces rendements sont par contre plus constants dans le temps que ceux du générateur de qualité chimique.

## 4.1.1.2. Pureté radionucléidique (PRN)

La teneur de l'éluat en <sup>68</sup>Ge a été déterminée en mesurant l'activité de l'éluat au niveau d'une chambre d'ionisation (Scintidose<sup>®</sup>, LemerPax) immédiatement après la fin de l'élution et au moins 48 heures après, au niveau d'un compteur gamma (Wallac 1480 WIZARD® 3 NaI(Tl) scintillation detector, PerkinElmer<sup>®</sup>). Au-delà de ce délai, le gallium de période approchant les 68 minutes aurait totalement décru et le signal mesuré correspond uniquement aux photons à 511 keV issus de la décroissance du gallium immédiatement généré par le <sup>68</sup>Ge

présent dans l'éluat. [223] La contamination de l'éluat par le <sup>68</sup>Ge est exprimée par le pourcentage de l'activité du <sup>68</sup>Ge par rapport à l'activité totale dans chaque éluat. [27]

Il est précisé au niveau de la monographie de la pharmacopée européenne « GALLIUM (68Ga) CHLORIDE SOLUTION FOR RADIOLABELLING » [41] que l'éluat de <sup>68</sup>Ga utilisé pour le radiomarquage doit avoir :

- 3) Une teneur en  $^{68}$ Ge  $\Box 10^{-3}$  % de l'activité totale
- 4) La teneur en <sup>68</sup>Ga doit être au moins égale à 99,9% de l'activité totale.

Les teneurs en <sup>68</sup>Ge des éluats du générateur de qualité chimique évaluées sur 252 jours d'utilisation étaient de  $4,4\times10^{-3} \pm 2,5\times10^{-3}$ %. Toutes les valeurs n'étaient pas conformes aux spécifications de la pharmacopée européenne. Une pré-purification de l'éluat de qualité chimique est donc obligatoire avant son utilisation pour le marquage de vecteurs.

La teneur du 1<sup>er</sup> éluat du générateur de qualité pharmaceutique effectué avec 10 mL de HCl 0,1M a été déterminée :  $5,37 \times 10^{-4}$  %. Les puretés radioisotopiques des éluats préparés selon les recommandations du fabricant étaient toutes conformes aux spécifications de la pharmacopée européenne. Quatre mois après la date de péremption du générateur la teneur en <sup>68</sup>Ge mesurée était de  $3,58 \times 10^{-6}$  % et donc toujours conforme.

Cet éluat peut donc être utilisé sans pré-purification préalable pour le marquage des vecteurs d'intérêt.

## 4.1.2. Techniques de purification/concentration de l'éluat

Comme précisé au niveau du paragraphe « Prétraitement des éluats », plusieurs techniques de concentration et de purification de l'éluat de <sup>68</sup>Ga ont été décrites dans la littérature. Ces techniques sont nécessaires pour tout marquage utilisant un éluat issu des générateurs de qualité chimique.

Nous nous sommes fixés comme objectifs d'automatiser dans un premier temps les techniques de purification/concentration des éluats les plus fréquemment utilisées, d'évaluer dans un deuxième temps l'efficacité de ces méthodes, et enfin de les améliorer voire de proposer de nouvelles techniques en vue d'une future application pour les marquages des vecteurs d'intérêt.

Trois techniques de purification/concentration des éluats ont été utilisées : purification cationique, purification anionique et élution fractionnée.

## 4.1.2.1. Purification cationique de l'éluat

Nous avons opté pour l'automatisation d'une technique qui a démontré son efficacité et a été largement utilisée en clinique. Elle consiste à passer l'éluat du générateur à travers une résine échangeuse de cations (matrice -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>H<sup>+</sup>). Il s'en suit une adsorption des cations <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> sur la cartouche et une élimination de <sup>68</sup>Ge qui n'est pas retenu. [49] Le décrochage du Ga<sup>3+</sup> est obtenu en utilisant 0,8 mL d'une solution 98% acétone/0.02M HCl. [48] En effet, dans des solutions d'HCl, l'affinité des cations Ga<sup>3+</sup> pour les résines échangeuses de cations décroit avec l'augmentation de la teneur en acétone.[49],[40],[50] Cette opération permet également de purifier l'éluat des impuretés métalliques qui ont un coefficient de distribution différent de celui du Ga<sup>3+</sup>: <sup>68</sup>Ge<sup>4+</sup>, Ti<sup>4+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, et Fe<sup>3+</sup>.[51]

Les rendements de purification et les puretés radioisotopiques des éluats purifiés ont été évalués sur 3 éluats issus du générateur de qualité chimique et 10 éluats du générateur de qualité pharmaceutique. Les résultats sont représentés au niveau du tableau suivant :

Tableau 16. Rendements de purification cationique et teneurs en <sup>68</sup>Ge des éluats obtenus à partir des générateurs de qualité chimique et de qualité pharmaceutique.

Paramètre	Générateur chimique	Générateur pharmaceutique
Rendement de purification (moyenne±sd) (%)	86±2	85±8
Teneur en <sup>68</sup> Ge (moyenne±sd) (%)	1,3E-04±1,5E-05	2,5E-07±1,6E-07

Avec un rendement de purification de 85 à 86%, la méthode de purification cationique utilisée permet d'avoir un éluat de pureté radionucléidique conforme aux spécifications de la pharmacopée européenne quel que soit le générateur de provenance. La teneur en <sup>68</sup>Ge de l'éluat purifié du générateur pharmaceutique est 14 fois plus faible que celle de l'éluat non purifié. Celle du générateur chimique est 35 fois plus faible après purification.

La contenance en <sup>68</sup>Ge de l'éluat purifié du générateur pharmaceutique est 500 fois plus faible que celle du générateur chimique.

Les rendements de purification de la méthode après automatisation sont du même ordre que ceux décrits par Ocak et coll. [48]

La méthode de purification cationique automatisée sur le module de synthèse de trasis sera utilisée pour le marquage du DOTANOC dans le cadre d'un essai clinique multicentrique

## 4.1.2.2. Purification anionique de l'éluat

En dépit de sa fiabilité et de sa large utilisation en préclinique et en clinique, l'emploi de la méthode cationique de pré-purification de l'éluat requiert en fin de synthèse une étape supplémentaire de purification post-marquage par extraction en phase solide. La récupération du produit marqué purifié se fait par de l'éthanol. L'utilisation d'acétone et d'éthanol impose des contrôles qualité post-libératoires supplémentaires du produit fini. [52] De plus, à des pH acides, à température ambiante et exposée à la lumière, l'acétone donne naissance à une impureté toxique: le mésityloxyde (4-méthyl-3pentène-2-one) qu'on peut retrouver au niveau du produit fini. [53] Des précautions de conservation supplémentaires doivent être respectées pour le mélange (acétone/HCl) utilisé pour l'élution du <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> à partir de la résine échangeuse de cations.[1]

Tous ces inconvénients ont conduit certains auteurs à l'utilisation des méthodes anioniques de purification. Celles-ci comportent une étape supplémentaire d'anionisation de l'éluat par l'ajout d'un excès d'ions chlorures (l'HCl concentré étant la source de chlorure la plus utilisée : HCl 30%). Ceci conduit à la formation de complexes anioniques  $[GaCl_6]^{3-}$  et  $[GaCl_4]^-$  qui sont alors chargés sur des résines échangeuses d'anions. [51] Le germanium n'est quasiment pas adsorbé sur ces résines dans des solutions de HCl < 5M. [27] Les cations et les impuretés organiques sont éliminés efficacement par lavage de la résine. Le gallium peut être élué sous forme cationique Ga<sup>3+</sup> avec un volume très réduit d'eau pure.

Nous nous sommes proposé d'automatiser sur le module de synthèse FastLab de GE Healthcare la méthode de purification anionique décrite par Velikyan et coll. Celle-ci associe une concentration de l'éluat par élution fractionnée et une purification anionique sur une résine PS-HCO<sub>3</sub> (Chromafix<sup>®</sup>). [27]

Le diagramme d'automatisation est présenté au niveau de la figure suivante :



Figure 31. Diagramme de purification anionique de l'éluat de <sup>68</sup>Ga sur module de synthèse FasLab® utilisant une résine PS-HCO<sub>3.</sub>

Les rendements de purification obtenus étaient de 52±0,7%, moins élevés que ceux décrits par Velikyan et coll. (60 à 65%).

Les teneurs en <sup>68</sup>Ge trouvés par Velikyan et coll. sont de ~  $10^{-3}$  %. Cette méthode a permis des marquages de DOTA et NODAGA-peptides avec des activités spécifiques élevées en associant un chauffage aux microondes. [27] Dans la suite de ce travail, cette méthode a été utilisée pour le marquage d'un peptide ciblant la PS et conjugué au NODAGA (P04087), mais à température ambiante et sans purification post-marquage du produit fini.

La méthode anionique décrite présente un ensemble d'avantages essentiellement le non recours aux solvants organiques ce qui permet de s'affranchir des contrôles qualités de la teneur du produit fini en solvants en fin de synthèse. Les teneurs en <sup>68</sup>Ge, bien que conformes aux spécifications de la pharmacopée européenne restent plus élevées que celles obtenues avec la purification cationique. Les volumes réactionnels sont bien réduits, mais l'élution fractionnée associée entraîne la perte d'une quantité importante de l'activité disponible dans le générateur (~ 40 à 50%). Cette méthode nécessite par ailleurs une étape supplémentaire comparée à la méthode cationique et donc un temps plus lent. De plus, l'utilisation de l'HCl 30% comme source de chlorures constitue une contrainte pratique étant donné sa toxicité et sa corrosivité pour le matériel.

Nous nous sommes alors proposé d'apporter des améliorations aux méthodes anioniques utilisées en substituant la source de chlorures par du NaCl en poudre et en réduisant le nombre d'étapes. L'étape d'anionisation se fait dans ce cas au même moment que celle de l'élution et du chargement sur la résine échangeuse d'anions. Ceci a été possible en conditionnant le NaCl poudre sous forme de cartouche montée en série avec l'échangeur anionique. La résine anionique utilisée a une matrice à base de pipérazine. De Blois et coll. ont démontré que la purification est meilleure avec cette résine qu'avec une matrice PS-HCO<sub>3</sub>.[44] La méthode automatique mise en place sur le module de synthèse FastLab® a permis d'obtenir des éluats purifiés issus du générateur de qualité chimique avec des teneurs moyennes en <sup>68</sup>Ge 28 fois plus faibles si l'éluat est obtenu à partir d'un générateur élué il y a moins de 24 heures.

La méthode de purification anionique mise en place a été utilisée pour le marquage de peptides conjugués au DOTA ou au NODAGA. Ce travail a été valorisé par une communication affichée au « Theranostics Word Congress 68Ga&PPRT » qui a eu lieu à Baltimore aux Etats-Unis en mars 2015 et a donné lieu à la publication suivante :

# <u>Article 2</u>: A new <sup>68</sup>Ga anionic purification method using NaCl cartridge (Publié)

A new <sup>68</sup>Ga anionic concentration and purification method for automated synthesis of [<sup>68</sup>Ga]-DOTA or NODAGA conjugated peptides in high radiochemical purity. *J. Label. Compd. Radiopharm.*, vol. 58, no. 10, pp. 403–410, Aug. 2015.

**R. Ben Azzouna**, F. Alshoukr, S. Leygnac, A. Guez, W. Gonzalez, O. Rousseaux, D. Guilloteau, and D. Le Guludec.

## **Research article**

Received 7 March 2015,

Revised 12 June 2015,

Accepted 26 June 2015

Published online in Wiley Online Library

Labelled Compounds and

Radiopharmaceuticals

(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/jlcr.3316

## A new <sup>68</sup>Ga anionic concentration and purification method for automated synthesis of [<sup>68</sup>Ga]-DOTA or NODAGA conjugated peptides in high radiochemical purity

Rana Ben Azzouna,<sup>a,b,c,d</sup>\* Faisal Alshoukr,<sup>a,b,c</sup> Sébastien Leygnac,<sup>a,b,c</sup> Alexandre Guez,<sup>e</sup> Walter Gonzalez,<sup>f</sup> Olivier Rousseaux,<sup>f</sup> Denis Guilloteau,<sup>g</sup> and Dominique Le Guludec<sup>a,b,c</sup>

The <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator is of increasing interest for clinical PET. For successful labelling, the eluate has to be purified. The aim of our approach is to improve the existing anionic methods which have a number of advantages compared to other methods but which use high concentrated HCl, and require an additional anionizing step. A new <sup>68</sup>Ga-eluate anionic purification method that enables rapid and high efficiency labelling of DOTA and NODAGA conjugated peptides in high radiochemical purity is described. The new method uses NaCl as an alternative Cl<sup>-</sup> source to the corrosive HCl and combines the three standard steps in a single step. The recovery yield was ≥90%, and the <sup>68</sup>Ge breakthrough was in conformity with the European Pharmacopeia limit. An automated labelling of DOTA and NODAGA-conjugated peptides was performed with the new method, using acetate sodium buffer, with a total duration of 13 min and a radiochemical yield >85%. The labelled peptides have a radiochemical purity exceeding 99% and can be used directly without any further purification step and without the quality control by gas chromatography. Furthermore, the new method has an economic advantage: it offers the possibility to use generator until 20 months after the calibration date.

Keywords: gallium 68; anionic purification; NaCl; peptides; DOTA; NODAGA

## Introduction

The generator-produced positron-emitting  $^{68}$ Ga ( $T_{1/2}$  = 68 min) is of increasing interest for clinical PET.

<sup>68</sup>Ga as a metallic cation is suitable for complexation reactions with chelators conjugated to vector molecules. Large <sup>68</sup>Ga generator eluate volumes, metal traces from the generator matrix material or reaction reagents, however, disturb the labelling procedure.<sup>1</sup>

For successful labelling, <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator eluate has to be concentrated and to be purified of metallic impurities and long-lived parent <sup>68</sup>Ge(IV), <sup>2,3</sup>

There are three main eluate purification approaches described in the literature, but with limits for each method (Figure 1).

#### Fractional elution method (Figure 1(A))<sup>4</sup>

To overcome the problems of the <sup>68</sup>Ga eluate, the first approach is to fractionate it from the generator.<sup>5</sup> Velikyan et al. reported that the third 1-mL fraction of the eluate contained over 60% of the total available <sup>68</sup>Ga activity.<sup>1</sup> Breeman et al. reported high labelling yields and specific activities without the need for purification of the eluate. Eighty percent of the radioactivity was collected in a volume of 1 mL.<sup>6</sup> De Blois et al. used the fractional elution method with iThemba generator. Seventy-five percent of the activity was collected in a volume of  $\rm 1.5\,mL^{7}$  A similar approach was chosen by Gabriel et al. $^{8}$ 

The fractional elution methods are a good approach to concentrate the eluate. But a part of the total activity is lost in the non-collected fractions, and the eluate still contains measurable activities of long lived <sup>68</sup>Ge. Furthermore, if a chemical grade generator is used, the labelled vector needs an additional purification step before injection because in

<sup>a</sup>Nuclear Medicine Department and DHU FIRE, Bichat-Claude Bernard University Hospital, AP-HP, Paris, France

<sup>b</sup>UMR 1148 Inserm, Paris, France

<sup>c</sup>Federation de Recherche en Imagerie Multimodale, Paris 7 University, Paris, France

<sup>d</sup>Pharmacy Department, Bichat Claude Bernard University Hospital, APHP, Paris, France

<sup>e</sup>Pierre et Marie Curie University, Paris, France

<sup>f</sup>Guerbet, Research Center, Aulnay-sous-Bois, France

<sup>9</sup>Inserm, U930, François Rabelais University, CHRU, Tours, France

\*Correspondence to: Rana Ben Azzouna, Nuclear Medecine Department and DHU FIRE, Bichat Claude Bernard University Hospital, APHP, France. E-mail: rana.benazzouna@amail.com

J. Label Compd. Radiopharm 2015

Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.



**Figure 1.** Overview on the mostly applied  $^{68}$ Ge/ $^{68}$ Ga-generator-eluate purification methods. (A) Fractionated method: identification of the eluate fraction representing at least two third of the total activity and use without further purification;<sup>4</sup> (B) cationic eluate purification: (B1) direct generator elution through strong cation exchanger (SCX), (B2) desorption of purified  $^{66}$ Ga using HCl/acetone mixture; (C) anionic eluate purification: (C1) generator elution into cc. HCl reservoir, (C2) subsequently elution through strong anion exchanger (SAX), (C3) desorption of purified  $^{66}$ Ga using water; (D) combined cationic/anionic eluate purification: (D1) direct generator elution through through cation exchange catridge, (D2–D2\*) desorption of gallium using cc. HCl or NaCl 5 M/HCl 5.5 M mixture: intermediate transformation of the absorbed  $^{66}$ Ga<sup>3+</sup> into [ $^{66}$ Ga(La] and (D3) loading of negatively charged gallium on a SAX catridge, and desorption of purified gallium with water, Or (D3\*) re-transformation to  $^{66}$ Ga<sup>3+</sup> with the help of acetate buffer.

these conditions, fractionated elution is not sufficient to have a final product in conformity with European Pharmacopoeia specifications. The final elution is performed with ethanol. The presence of ethanol in the final product requires additional quality control in order to check the conformity with the maximum authorized injectable amount.

#### Cationic purification methods (Figure 1(B))

In this method, the <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga-generator eluate is directly passed through a cation exchange resin which can be used for the same application for over a year. Various columns were tested. The most commonly used cartridge has a sulfonic acid functional groups as matrix.<sup>9–11</sup>

Because of high distribution coefficients, generator-produced  $^{68}\text{Ga}$  can be quantitatively adsorbed on the resin directly from the generator eluate.  $^{11}$  In fact, ions  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  had high affinity for this ion exchange column, while  $^{68}\text{Ge}$  was collected in a 'generator waste' vial.  $^{12}$ 

Literature data indicate that, with the increase of the content of acetone in the HCl solutions of the same acid concentration, the affinity of  ${}^{68}$ Ga for the organic cation-exchange resin decreases.<sup>11,13</sup> Consequently, ions  ${}^{68}$ Ga $^{3+}$  trapped in the column

can be re-eluted in a reaction vessel with reduced volume solution of 0.05 N HCl and 98% acetone<sup>12</sup> and the <sup>68</sup>Ga eluate can be concentrated, and additionally be purified from <sup>68</sup>Ge<sup>4+</sup>, Ti<sup>4+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup>, because of the different distribution coefficients of the metals.<sup>5</sup> The procedure includes a final purification step using a solid-phase extraction. The final elution is performed by ethanol.

This method has proven to be effective and reliable, but the use of organic solvents is an important disadvantage for routine clinical production. The use of acetone and ethanol requires additional quality control testing of the final products.<sup>14</sup>

Furthermore, acetone in the acidic pH, at room temperature and under light, forms mesityloxide (4-methyl-3-penten-2-on), a toxic impurity, which can be detected in the final products.<sup>15</sup> Consequently, precautions for the storage of acetone/HCI mixture should be taken.<sup>3</sup>

## Anionic purification methods (Figure 1(C))

The anionic purification strategy is based on the fact that in HCl solution, gallium forms strong anionic complexes with Cl<sup>-</sup>, and the corresponding  $[GaCl_{4}]^{3-}$  and  $[GaCl_{4}]^{-}$  complexes are strongly adsorbed on anion-exchange resin from HCl concentrations

www.jlcr.org

Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

J. Label Compd. Radiopharm 2015

#### R. Ben Azzouna et al.

 ${>}3\,\text{M}.^5$  In contrast, germanium is practically not adsorbed from  ${<}5\,\text{M}\,\text{HCI}$  solution.^1

Cations and organic debris can be washed off the column effectively before the complex is destroyed by lowering the proton concentration. In these conditions the gallium can be eluted as  ${\rm Ga^{3+}}_{\rm aq}$  with a very small amount of pure water.<sup>16</sup>

Meyer et al. used quaternary ammonium resin.<sup>16</sup> PS-HCO<sub>3</sub> resin (chromafix) was used by Velikyan et al.<sup>1</sup> De Blois et al. reported better anion purification results with piperazine resin (Oasis WAX 30 mg) than with PS-HCO<sub>3</sub> resin.<sup>7</sup>

The main advantage of the anionic purification methods compared to the cationic approaches is the non-use of organic solvent. This allows the elimination of an additional purification step of the <sup>68</sup>Ga-labelled molecules and of the additional control of the final product by gas chromatography before injection.

Some authors used the anionic approach in combination with the classic cationic method in order to desorb the trapped gallium in the cationic exchanger without the use of organic solvents (Figure 1(D)). When the concentrated HCl is used as chloride source, the method requires an additional step with an additional cartridge.<sup>17</sup>

When the anionization of the trapped gallium was performed by a mixture of 5 M NaCl and a small amount of 5.5 M hydrochloric acid, a supplementary neutralization step with an additional buffer was needed in the end of the synthesis.<sup>18</sup>

The advantages of anionic purification approach compared to other describes methods prompted us to improve described techniques by trying to reduce the major limitations of these methods. In fact, except when generator can be eluted directly with concentrated HCI (Schuhmacher et al.),<sup>19</sup> in all reported techniques, an intermediate step is needed before loading the eluate in anion exchange resin. In this step, the eluate is mixed with concentrated HCI in order to form negatively charged gallium which can be trapped in the strong anion exchange cartridge (SAX). This is a disadvantage compared to cationic purification method in which the eluate is directly passed through the strong cation exchange cartridge (SCX). Furthermore, the use of concentrated HCI allows pH decrease and is a real disadvantage because it is very corrosive. A particular attention should be paid in order to protect users and materials.

In the present paper, we report a new automated anionic concentration and purification method of the <sup>68</sup>Ga eluate with a single 'elution-anionizing-loading' step via NaCl cartridge, followed by the desorption of <sup>68</sup>Ga from the exchanger without any use of concentrated HCl or organic solvents. The new method is particularly suitable for automated production of [<sup>68</sup>Ga] DOTA- or NODAGA-conjugated peptides. DOTANOC and R824- $\beta$ -alanine-NODAGA were used as models. (R824 was described by Burtea et al. as a potential phosphatidylserine-specific peptide ligand).<sup>20</sup>

## Experimental

#### The new anionic concentration and purification method

The <sup>68</sup>Ga was available from a <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator system (Cyclotron Co., Ltd, Obninsk, Russia) where <sup>68</sup>Ge was attached to a column of an inorganic matrix based on titanium dioxide.

The new anionic purification method is based on an 'elutionanionizing-loading' step followed by the desorption of  $^{68}$ Ga from the Weak Anion eXchanger (WAX) with a small volume of water.

The <sup>68</sup>Ga was eluted with 5 mL of 0.1 M hydrochloric acid solution (BioXtra, Sigma-Aldrich, Germany). The eluate in form of <sup>68</sup>Ga chloride was passed directly through an in-house made NaCl cartridge. During this passage, the contact with the chlorides converts the gallium into

anionic forms, which are loaded during the same step in the anion exchange resin. Sodium chloride (2.64 to 2.66 g), purchased from Merck, are weighed and then placed into an empty polypropylene solid phase extraction cartridge (2 mL) fitted with two polyethylene frits (pore size 20  $\mu$ m). A luer lock cap is adapted to the full cartridge which can be connected in the cassette.

Four commercially available anion-exchange cartridges were tested manually for optimization: A piperazine-ion exchange resin (Oasis<sup>®</sup> WAX 1 cc Vac Cartridge, 30-mg sorbent, 30-µm particle size, Waters), two quaternary-amine exchange resins (Oasis<sup>®</sup> MAX 1 cc Vac Cartridge, 30-mg sorbent, 30-µm particle size, Waters and Strata<sup>®</sup> SAX 100 mg/ 1 mL, phenomenex<sup>®</sup>); and a PS-HCO<sub>3</sub> resin (Chromafix 30-PS-HCO<sub>3</sub>, 45-mg Macharey-Nagel, Dueren, Germany). The Oasis<sup>®</sup> WAX cartridge was selected for the automated procedure which was performed with FastLab synthesizer from GE Healthcare.

After the 'elution-anionizing-loading' step, the anionic exchanger was washed with 2.5 mL of 5 M NaCl and then dried by sucking filtered nitrogen through the column. The <sup>68</sup>Ga was then eluted in the reactor with 1-mL ultrapurified Water (TraceSELECT<sup>®</sup>, Fluka Analytical, Sigma-Aldrich—Switzerland).

Figure 2(A) shows the scheme of the new anionic purification procedure of the  $^{68}\mbox{Ga}$  eluate.

Retention was expressed as % of trapped <sup>68</sup>Ga on the anionic cartridge from the total <sup>68</sup>Ga activity present at the end of the elution. Desorption was expressed as % eluted <sup>68</sup>Ga of total <sup>68</sup>Ga activity applied to the column. The recovery yield was expressed as % of eluted <sup>68</sup>Ga from the total <sup>68</sup>Ga activity present at the end of the elution.

<sup>68</sup>Ge breakthrough was expressed as the ratio between activities of <sup>68</sup>Ge vs total activity in the eluate (in %). The total activity was counted with an ionization chamber (Scintidose, LemerPax) immediately after the end of elution. The <sup>68</sup>Ge contamination was determined by recounting the eluate >48 h after collection using a Nal(TI) scintillation detector (Wallac. 1480 WIZARD<sup>®</sup> 3" Gamma Counter PerkinElmer<sup>®</sup>).

 $Breakthrough(\%) = \frac{{}^{68}Ge\ activity}{Total\ activity\ (end\ of\ elution)} \times 100$ 

#### Labelling of DOTA and NODAGA conjugated peptides using the new anionic purification and concentration method

The starting full  $^{68}$ Ga activity from generator used for the labelling reactions was between 200 and 220 MBq over a period of 1 month. The age of the used generator was 19–20 months.

Peptides were labelled on a FastLab module (GE Healthcare). The <sup>68</sup>Ga concentration and purification step, and the subsequent elution of <sup>68</sup>Ga using 1 mL of ultrapure water were carried out similarly as described above. (Figure 3).

The DOTA conjugated peptide used is DOTANOC acetate salt, which was obtained from ABX (advanced biochemical compounds, Germany). The eluate was slowly added into a mixture of 500 µL of 0.4 M sodium acetate buffer, pH 4 (sodium acetate buffer was prepared using sodium acetate trihydrate BioUltra ≥99.5%, Sigma-Aldrich, Germany, Water TraceSELECT<sup>®</sup>, Fluka Analytical. Sigma-Aldrich—Switzerland. pH was adjusted by addition of acetic acid ≥99.9%, Sigma-Aldrich), and 50 µg of the DOTANOC (100 µL of a 0.5 mg/mL DOTANOC solution in ultrapure water).

The solution was heated during 300 s at 95 °C, and then diluted with 300  $\mu L$  of saline solution.

The NODAGA-conjugated peptide used is R824- $\beta$ -alanine-NODAGA (MW: 1291.7 g/mol) (R824 = PGDLSR<sup>20</sup>) which was obtained from *Guerbet*, *Research Center*. Thirty-nine micrograms of the peptide (39  $\mu$ L of a 1 mg/mL solution in 0.4 M sodium acetate pH 4.6) was mixed with 500  $\mu$ L of the same buffer (Eur. Pharmacopeia buffer), and the eluate was slowly added into this mixture. The solution was incubated 300 s at room temperature and then diluted with 300  $\mu$ L of saline.

The End of Synthesis (EOS) activity was measured by means of a calibrated radionuclide activity meter (Scintidose, LemerPax).

J. Label Compd. Radiopharm 2015

Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

www.jlcr.org

## Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals



#### R. Ben Azzouna et al.

The radiochemical yields are expressed as a percentage of total activity of  $^{68}$ Ga from the generator eluates.

#### Quality control

The radiochemical purity was determined by HPLC system from Dionex (DIONEX UltiMate 3000) consisting of HPLC pump, quaternary gradient unit, LPG-3400 SD DIONEX; autosampler, WPS-3000 SL DIONEX; multiwavelength detector, DAD-3000 DIONEX; column oven, TCC-3000 DIONEX and a radio detector, HERM LB 500 Berthold, Germany, coupled in series.

Data acquisition and handling were performed using Chromeleon software, DIONEX.

Analytical liquid chromatography of [ $^{68}$ Ga]-DOTANOC was performed using the following conditions: column, C18, Acclaim<sup>®</sup> 120 Å; with the dimensions 4.6 × 150 mm, 5-µm particle size. We applied gradient elution with the following parameters: A) H<sub>2</sub>O, 0.05% TFA; B) acetonitrile, 0.05% TFA; with UV detection at 220 nm; flow was 1 mL/min; 0–2 min isocratic 10% B, 10–90% B linear gradient 20 min, 90–10% B linear gradient 2 min. Retention time (tR) for the radio-HPLC signal was 11.28 ± 0.01 min.

The following HPLC conditions were used for the quality control of the  $16^{68}$ Ga]-NODAGA conjugated peptide: the column used was ACE<sup>®</sup> 100 Å C18 with the dimensions 150 mm × 4.6 mm, 3-µm particle size. We applied gradient elution with the following parameters: A) H<sub>2</sub>O, 0.1% TFA; B) acetonitrile, 0.1% TFA; with UV detection at 220 nm; flow was 1 mL/min; 0–2 min isocratic 5% B, 5–35% B linear gradient 20 min, 35–5% B linear gradient 2 min. Retention time (*t*R) for the radio-HPLC signal was 11.75 ± 0.03 min.

Radiochemical purity was also examined by radio-thin layer chromatography using ITLC-SG (PALL), mobile phase: (1 M ammonium acetate/methanol 1:1) for the quality control of [ $^{68}$ Ga]-DOTANOC and (0.4 M sodium acetate pH 4.5) for the quality control of [ $^{68}$ Ga]-NODAGA- $\beta$  alanine-R824.

## **Results and discussion**

#### The new anionic purification method

Our anion purification approach is based on the conversion of  ${}^{68}\text{Ga}^{3+}$  to  $[{}^{68}\text{Ga}\text{Cl}_4]^-$  anion by the use of NaCl as an alternative chloride source to high concentrated HCl which is very corrosive. The developed method combines the three standard steps (elution, anionizing and loading) in a single step. Furthermore, the new anionic purification method offers the possibility to use  ${}^{68}\text{Ge}/{}^{68}\text{Ga}$  generator up to 600 days after calibration time.

#### Manual optimization

In our initial experiments, we tried to convert the gallium to anionic form by use of saturated sodium chloride solution (Table 1). It was found that the volume of this solution has to be more than 20 mL in order to have a quantitative retention on the strong anion exchanger (Oasis MAX<sup>®</sup> 1cc 30 mg from Waters was used in this experiment). Thus we replaced the sodium chloride solution by NaCl powder, and we tried to anionize the gallium eluate by elution of the generator directly into the in-house made NaCl cartridge described above which is connected in series with the anionic exchanger. Ultrapure water was found better eluents than saline to desorb the trapped gallium 68 from the anionic cartridge. The results obtained with the four different types of resin are shown in Figure 4.



**Figure 4.** The new anionic purification method using four different types of resin (manual method). The retention was expressed as % of trapped <sup>66</sup>Ga on the anionic cartridge from the total <sup>68</sup>Ga activity present at the end of the elution. The desorption was expressed as % eluted <sup>66</sup>Ga of total <sup>66</sup>Ga activity applied to the column. The recovery yield was expressed as % of purified <sup>66</sup>Ga (<sup>66</sup>Ga eluted from the anionic cartridge) from the total <sup>68</sup>Ga activity present at the end of the elution. The recovery yield was expressed as % of purified <sup>66</sup>Ga (<sup>66</sup>Ga eluted from the recovery yield was expressed as % of the elution. The recovery yield are better with the 30-mg Oasi<sup>69</sup> WAX.

Total 5N NaCl solution added to cotal volume (5 mL) of <sup>68</sup> Ga eluate (mL)	Activity of Oasis® MAX (MBq)	Non-trapped activity (MBq).	Retention (%)
2	15	370.9	3.88
4	50	296.6	14.42
7	115.2	205.7	35.89
10	176.4	121.4	63
13	202.6	65.78	75.48
15	211.5	41	83.76
20	210	26	89

## Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals

## Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals

 $^{68}$ Ga activity (5 mL) passed manually through the in-house NaCl cartridge was absorbed (from 51 to 87%) on all anion columns (average, n = 2). Desorption of  $^{68}$ Ga activity from total activity on anion columns ranged between 51 and 82% (average, n = 2). As Figure 4 shows, highest desorption (82%) and recovery were obtained with the 30-mg weak anion Oasis WAX column. Similar result was reported by De Blois et al. (desorption = 83%).<sup>7</sup> The Oasis<sup>®</sup> WAX cartridge was selected for the automated procedure. The retention mechanism of this resin is mixed-mode, both ion-exchange and reversed-phase, which improves retention for, as well as the ability to elute, strongly acidic compounds.

#### Automated procedure

The eluate passed through the in-house made NaCl cartridge was analysed with radio-HPLC, and the main peak at 2.4 min was compared to the one obtained with an eluate mixed with high concentrated hydrochloric acid (HCl 30%). As shown in Figure 5, retention times are similar and correspond to the retention time for  $[^{68}GaCl_{4}]^{-}$ .

Results of automated concentration and purification of <sup>68</sup>Ga eluate using the new anionic approach with the 30-mg weak anion Oasis WAX column are shown in Table 2.

With retention of over 99%, the new anionic purification method based on the single 'elution-anionizing-loading' step shows that the elution of the generator through the in-house made NaCl cartridge converts quantitatively the  $^{68}Ga^{3+}$  into anionic form which can be adsorbed quantitatively on an anion exchange resin. And the reproducible recovery yield of better than 90% shows that the commercial weak anion exchanger Oasis WAX (30 mg) is a promising resin which can be used for routine concentration of  $^{68}Ga$  eluate.

These results are better than those obtained with some other anion exchangers (AG 1-X8; AG 1-X4; AG 1-X2), and they are similar to the results obtained with strong anionic resin (Chromafix, 45 mg described by Velikyian et al.).<sup>1</sup>

#### Radionuclidic purity (RNP)

Ten eluates were purified using the new anionic purification method. Three of them were eluted more than 48 h after the last generator elution (eluate no 1, 2 and 3). Results of the  $^{68}$ Ge breakthroughs calculated as described above are shown in the Table 3.

R. Ben Azzouna et al.

<sup>68</sup>Ge breakthroughs of untreated eluates are not in conformity with the European Pharmacopeia limit (Impurities: maximum 0.001% of the total radioactivity at the end of elution).<sup>21</sup>

The radionuclidic purities (the ratio between activities of  $^{68}$ Ga vs total activity in the eluate (in %)) of the purified eluates with the new anionic purification method conform with European Pharmacopeia specifications (RNP > 99.9%) including the eluates obtained more than 72 h after the last generator elution.

Table 2. Automated characterization of the new anionic

purification method using the 30-mg weak anion Oasis

	Retention	Desorption	Recovery
No	(%)	(%)	(%)
1	95.95	94	90.2
2	98.9	90.4	89.3
3	99.1	92.1	91.2
4	99.5	91.6	91.1
5	99	92.6	91.7
6	98.1	91.8	90
7	98.9	92.9	91.8
8	99.2	94.2	93.4
9	98.8	93.8	92.6
10	99.8	89.4	88.8
Average ± SD	99±1	$92 \pm 2$	91 ± 1



Figure 5. (A) HPLC chromatogram of the eluate mixed with HCl 30%. (B) HPLC chromatogram of the eluate passed through the in-house NaCl cartridge before its loading into the Oasis Wax cartridge. HPLC: column: ACE<sup>®</sup> 100 Å C18 (150 mm × 4.6 mm; 3 µm; 100 Å); solvent A: water, 0.1% TFA; solvent B: acetonitrile, 0.1% TFA; flow rate: 1 mL/min; gradient: 0–2 min isocratic 5% B, 5–35% B linear gradient 20 min, 35–5% B linear gradient 2 min; main peak of [<sup>68</sup>Ga Cl<sub>4</sub>]<sup>-</sup> at 2.4 min.

www.jlcr.org

Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

J. Label Compd. Radiopharm 2015

R. Ben Azzouna et al.

(A)

## Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals

 Table 3.
 68 Ge breakthroughs of three untreated eluates (A) and 10 purified eluates (B) with the new anionic purification method using the 30-mg weak anion Oasis WAX column

No	Time of the last elution	<sup>68</sup> Ge breakthrough (%)
<b>T1</b>	-244	2.05 02
11	<u></u> <u></u> <u></u> 224 h	3.8E-03
T2	≤24 h	2.47E-03
T3	≤24 h	1.77E-03
Average <sup>68</sup> Ge breakthroughs of unti	eated eluates $(n = 3)$ :	2.68E-03
(B)		
1	>72 h	2.21E-04
2	>72 h	2.79E-04
3	>72 h	2.06E-04
4	≤24 h	2.99E-05
5	≤24 h	3.24E-05
6	≤24 h	3.98E-05
7	≤24 h	2.38E-05
8	≤24 h	2.91E-05
9	≤24 h	4.99E-05
10	≤24 h	3.92E-05
Average:		9.50E-05
Average if $t_{eluate} > 72 h (n = 3)$ :		2.35E-04
Average if $t_{eluate} \leq 24 h (n = 7)$ :		3.49E-05

Table 4. Average results of five automated runs using the new anionic purification methods

Parameter	Test method	Eur. Ph. specification (Edotreotide monograph) <sup>23</sup>	Average $\pm$ SD
Radiochemical purity (%)	Radio-HPLC	≥91	$\begin{array}{c} 99.29 \pm 0.24 \\ 3.45E {-} 05 \pm 8E {-} 06 \\ 4.12 \pm 0.08 \end{array}$
<sup>68</sup> Ge breakthrough (%)	Eur. Phar. RNP-Test B	<1.E−03	
pH	pH meter	4.0−8.0	

Therefore, the new anionic purification method can be adopted for routine purification of  $[{}^{68}{\rm Ga}]{-}{\rm eluate}.$ 

#### Labelling of DOTA-conjugated peptide (DOTANOC) using the new anionic purification method based on the in-house made NaCl cartridge

Quality control parameters were all within specifications (Table 4); radiochemical purity, as determined by instant thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography (Figure 6), exceeded 99% in all cases; <sup>68</sup>Ge breakthrough is about 30 times better than the European Pharmacopeia limit. The average radiochemical yield for the five automated productions is more than 87%, which is better than the yield reported by Blom et al. (77 ± 3%).<sup>22</sup> The new method does not use organic solvents. Therefore, gas chromatography assays for organic solvents are not required for this method, which reduces the obligatory controls after release of final product.

The total duration of the automated synthesis was 13 min. This short duration is suitable for routine production of  $^{68}$ Ga-labelled DOTANOC for clinical use.

The final product is isoosmolar to the human plasma and does not need any further dilution before injection. The final pH of the reaction mixture was determined to be  $4.12 \pm 0.08$ . The product can be injected directly. The neutralization by the addition of supplementary buffer before intravenous injection is not necessary.



Figure 6. Typical HPLC chromatogram of <sup>68</sup>Ga-DOTANOC using the in-house made NaCl cartridge labelling procedure.

## Labelling of NODAGA-conjugated peptide using the new anionic purification method

The average results of five automated productions of [ $^{68}$ Ga]-NODAGA-conjugated peptide using the NaCI-cartridge based anionic method are shown in Table 5.

J. Label Compd. Radiopharm 2015

Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

## Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals

**Table 5.** Average results of five automated productions of <sup>68</sup>Ga-labelled NODAGA-conjugated peptide using the new anionic purification methods

	Test	
Parameter	method	Average ± SD
Radiochemical purity (%)	Radio-HPLC	99.57 ± 0.16
<sup>68</sup> Ge breakthrough (%)	Eur. Phar. RNP-Test B	$2.45E - 05 \pm 1.72E - 06$
рH	pH meter	$4.49 \pm 0.02$



Figure 7. Typical HPLC chromatogram of  $^{66}$ Ga-NODAGA- $\beta$ -alanine-R824 using the in-house made NaCl cartridge labelling procedure.

Radiochemical purity, as determined by instant thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography (Figure 7), exceeded 99% in all cases; the <sup>68</sup>Ga-labelled products were used directly, with no subsequent purification steps, such as solid-phase extraction. The average radiochemical yield for the five automated productions is 90.67  $\pm$  1.23%.

The purification and the labelling method based on the Inhouse made NaCl cartridge is a promising approach to develop <sup>68</sup>Ga-NODAGA-conjugated peptides.

## Conclusion

We have developed a rapid and effective <sup>68</sup>Ga-eluate anionic purification and concentration method which avoids the use of corrosive HCl, combines the three standard steps (elution, anionizing and loading) in a single step, provides high <sup>68</sup>Ga recovery and removal of <sup>68</sup>Ge and offers the possibility to use generator until 20 months after the calibration date.

The NODAGA and DOTA conjugated peptides radiolabelled to

#### R. Ben Azzouna et al.

<sup>68</sup>Ga with our approach were obtained in high radiochemical purity (more than 99%), with radiochemical yields greater than 85% using the automated procedure. Therefore, the <sup>68</sup>Galabelled products can be used directly, with no subsequent purification steps. Thus, the new method obviates the need for ethanol, which eliminates the required quality control of the final product by gas chromatography.

## Acknowledgements

This study was granted by BPI through IMOVA project.

#### References

- [1] I. Velikyan, G. J. Beyer, B. Langstrom, *Bioconjug. Chem.* 2004, 15, 3, 554–560.
- [2] D. Mueller, I. Klette, R. P. Baum, Recent Results Cancer Res. 2013, 194, 77–87.
- [3] I. Velikyan, Theranostics. 2014, 4, 1, 47-80.
- [4] F. Rosch, Appl. Radiat. Isot. 2013, 76, 24-30.
- [5] M. Fani, J. P. Andre, H. R. Maecke, *Contrast Media Mol. Imaging* 2008, 3, 2, 67–77.
  [6] W. A. Breeman, M. De Jong, E. De Blois, B. F. Bernard, M.
- [6] W. A. Breeman, M. De Jong, E. De Blois, B. F. Bernard, M. Konijnenberg, E. P. Krenning, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2005, 32, 4, 478–485.
- [7] E. De Blois, H. Sze Chan, C. Naidoo, D. Prince, E. P. Krenning, W. A. Breeman, *Appl. Radiat. Isot.* **2011**, *69*, 2, 308–315.
- [8] M. Gabriel, C. Decristoforo, D. Kendler, G. Dobrozemsky, D. Heute, C. Uprimny, P. Kovacs, E. Von Guggenberg, R. Bale, I. J. Virgolini, J. Nucl. Med. 2007, 48, 4, 508–518.
- [9] M. Asti, G. De Pietri, A. Fraternali, E. Grassi, R. Sghedoni, F. Fioroni, F. Roesch, A. Versari, D. Salvo, Nucl. Med. Biol. 2008, 35, 6, 721–724.
- M. Ocak, M. Antretter, R. Knopp, F. Kunkel, M. Petrik, N. Bergisadi, C. Decristoforo, *Appl. Radiat. Isot.* **2010**, *68*, 2, 297–302.
   K. P. Zhernosekov, D. V. Filosofov, R. P. Baum, P. Aschoff, H. Bihl, A. A.
- 11] K. P. Zhernosekov, D. V. Filosofov, R. P. Baum, P. Aschoff, H. Bihl, A. A. Razbash, M. Jahn, M. Jennewein, F. Rosch, J. Nucl. Med. **2007**, 48, 10, 1741–1748.
- [12] F. Belosi, G. Cicoria, F. Lodi, C. Malizia, S. Fanti, S. Boschi, M. Marengo, *Curr Radiopharm.* **2013**, *6*, 2, 72–77.
   [13] F. W. Strelow, *Talanta* **1988**, *35*, 5, 385–395.
- [14] D. Mueller, I. Kletting, P. Baum, M. Gottschaldt, M. K. Schultz, W. a. P. Breeman, *Bioconjug. Chem.* 2012, *23*, 1712–1717.
- [15] M. Petrik, M. Ocak, M. Rupprich, C. Decristoforo, J. Nucl. Med. 2010, 51, 3, 495.
- [16] G. J. Meyer, H. Macke, J. Schuhmacher, W. H. Knapp, M. Hofmann, Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 2004, 31, 8, 1097–1104.
- [17] D. Müller, I. Klette, R. P. Baum, World J. Nucl. Med. 2011, 10, 77–78.
   [18] M. K. Schultz, D. Mueller, R. P. Baum, G. Leonard Watkins, W. A.
- Breeman, Appl. Radiat. Isot. 2013, 76, 46–54. [19] J. Schuhmacher, W. Maier-Borst, Int. J. Appl. Radiat. Isot. 1981, 32,
- [19] J. Schuhmacher, W. Maler-Borst, Int. J. Appl. Radiat. Isol. 1981, 32, 31–36.
   [20] G. Burten, S. Laurent, E. Langelet, S. Ballet, O. Murariu, O. Bourseauw.
- [20] C. Burtea, S. Laurent, E. Lancelot, S. Ballet, O. Murariu, O. Rousseaux, M. Port, L. Vander Elst, C. Corot, R. N. Muller, *Mol. Pharm.* 2009, *6*, 6, 1903–1919.
- [21] E. Pharmacopeia, Gallium (<sup>68</sup>Ga) Chlor. Sol. Radiolabelling. Monograph. N° 2464 2011, 23, 3, 508–509.
- [22] E. Blom, J. Koziorowski, Appl. Radiat. Isot. 2012, 70, 6, 980–983.
   [23] E. Pharmacopeia, Gallium (<sup>68</sup>Ga) Edotreotide Inject. Monograph. N° 2482. 2011, 23, 2, 310–313.

www.jlcr.org

Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

J. Label Compd. Radiopharm 2015
#### 4.1.2.3. Elution fractionnée

L'éluat du générateur de qualité pharmaceutique présente certes l'avantage d'être conforme chimiquement aux spécifications de la pharmacopée européenne, seulement la récupération quantitative de l'activité nécessite l'utilisation d'un volume de 5 mL d'éluant selon les recommandations du fabricant. [222] Ce volume est assez élevé et conduit à une faible concentration en <sup>68</sup>Ga. Ainsi, il est souvent nécessaire de recourir à la concentration de la solution radioactive afin d'obtenir des rendements élevés en composé radiomarqué. [17] De toutes les méthodes de concentration décrites dans la littérature (utilisation de résines échangeuses de cations [57], résines échangeuses d'anions [55], une combinaison des deux, élution fractionnée), cette dernière est la seule compatible avec une utilisation simple sans module de synthèse. Cette méthode a été décrite entre autres par Velykian et coll. [27]. Les rendements de concentration obtenus varient de 60 à 65% [27] à 80% de l'activité totale dans un volume de 1mL. [43]

Dans notre étude, nous avons effectué une optimisation de l'élution fractionnée en vue d'avoir une fraction avec une activité volumique la plus élevée possible.

Les résultats du rendement de concentration et de la pureté radionucléidique de la fraction retenue pour le marquage sont représentés dans le tableau suivant :

Echantillon	Rendement de concentration (%)	% <sup>08</sup> Ge	PRN (%)
1	90.8	3,05E-05	99,99
2	92.9	1.03E-05	99,99
3	92.7	9.29E-06	99,99
4	93.8	1.11E-05	99,99
5	91.1	7.69E-06	99,99
6	92.6	1.37E-05	99,99
7	93.3	1.36E-05	99,99
Movenne	92.46	1.37E-05	99.99

1.11

Tableau 17. Elution fractionnée (rendement de concentration et pureté radionucléidique)

Plus de 90% de l'ensemble de l'activité récupérable au niveau du générateur a pu être concentrée dans un volume de  $\sim 2$  mL.

7.69E-06

7.69E-06

Les teneurs en <sup>68</sup>Ge au niveau de ces fractions sont toutes conformes aux spécifications de la pharmacopée européenne (<sup>68</sup>Ge% < 0.001%). Cette fraction peut de ce fait être utilisée directement pour le marquage de vecteurs au gallium 68 sans une étape de pré-purification préalable de l'éluat.

Ecart type

L'évaluation de la pureté radionucléidique a été effectuée sur un générateur en fin de vie (11 mois après la date de calibration). Cette méthode peut donc être utilisée tout au long de la durée de vie du générateur.

Cette méthode a été utilisée dans la suite de ce travail pour le marquage au gallium 68 d'un polysaccharide ciblant la P-sélectine.

### 4.1.2.4. Elution sous-vide

Malgré la simplicité de l'élution fractionnée, celle-ci nécessite l'utilisation d'une pompe pilotable automatiquement. Dans l'optique de mettre au point des méthodes de marquage au <sup>68</sup>Ga exclusivement manuelles et qui soient non exposantes, accessibles à tous les centres équipés d'enceintes blindées haute énergie, et pouvant être appliquées pour le marquage de vecteurs formulés sous forme de kits, une méthode d'élution sous-vide du générateur de gallium 68 de qualité pharmaceutique a été mise en place. Cette méthode a permis de réaliser une élution de 95% de l'activité du générateur récupérable par la méthode recommandée par le fabricant avec seulement 2,5 mL d'éluant (vs les 5 mL nécessaires avec la méthode standard). L'utilisation de cette méthode a été également validée pour le marquage de DOTA et NODAGA-peptides avec des puretés radiochimiques élevées sans la moindre exposition des extrémités du manipulateur durant les étapes d'élution et de marquage contrairement aux méthodes manuelles décrites dans la littérature.

Le travail a été accepté pour une communication sous forme de e-Poster Walks au congrès de l'EANM (European Association of Nuclear Medicine) qui aura lieu à Barcelone du 15 au 19 octobre 2016. Le travail a donné lieu aussi à un article qui a été soumis à la revue « Nuclear Medicine Communications » (Manuscript number: NMC-11-2109R1) :

# <u>Article 3</u>: <sup>68</sup>Ga vacuum elution approach for direct peptide radiolabelling (Accepté)

<sup>68</sup>Ga "vacuum elution and concentration approach" for direct radiolabelling of DOTA and NODAGA conjugated peptides. *Nucl. Med. Commun.* 

Rana Ben Azzouna, Sébastien Leygnac, Faisal Al-Shoukr, François Rouzet, Denis Guilloteau and Dominique Le Guludec.

Manuscrint Number	NMC-11-2109R1
Full Title:	68Ga "vacuum elution approach" for direct radiolabelling of DOTA and NODAGA
i un muo.	conjugated peptides.
Article Type:	Original Study
Keywords:	68Ge/68Ga generator; vacuum elution; peptide; NODAGA; DOTA; direct labelling; PET
Corresponding Author:	Rana BEN AZZOUNA Bichat Claude Bernard University Hospital Paris, FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Bichat Claude Bernard University Hospital
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Rana BEN AZZOUNA
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Rana BEN AZZOUNA
	Sébastien Leygnac
	Faisal Al-Shoukr
	François Rouzet
	Denis Guilloteau
	Dominique Le Guludec
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	FRANCE
Abstract:	The 68Ge/68Ga generator is of increasing interest for clinical PET. The arrival on the market of the pharmaceutical grade generator which provides an eluate with chemical and radiochemical purities in conformity with the Eur. Pharmacopeia. specifications, makes possible the direct labelling of vectors. The kit formulation strategies using single vial productions can improve the access of hospitals and imaging centres which are not equipped with costly automated synthesis modules to the 68Ga-radiopharmaceutical production. The manual radiosynthesis of 68Ga requires handling of a relatively high amount of radioactivity, resulting in a high radiation dose to the hand. Moreover, the elution of 68Ga/68Ge generator with 5mL of HCI as recommended by the manufacturer leads to a low 68Ga concentration which can decrease the efficiency of the labelling procedure. The aim of our approach is to circumvent these disadvantages and to offer an alternative to the hand elution and labelling for a routine production of 68Ga-radiopharmaceuticals. The "vacuum elution approach" developed in this work makes possible - the elution of 95% of the available generator activity with 2.5mL of eluent; - the direct labelling of DOTA and NODAGA conjugated peptides with high radiochemical (> 97% for all cases) and radionuclidic (100%) purities, without hand exposure to the radiations during the preparation steps.

Manuscript (All Manuscript Text Pages, including Title Page, References and Figure Legends) Title Page Full title: <sup>68</sup>Ga "vacuum elution approach" for direct radiolabelling of DOTA and NODAGA conjugated peptides. Short title : 68Ga vacuum elution approach for direct peptide radiolabelling Authors: Rana Ben Azzouna a,b,c,d,\*, Sébastien Leygnac a,b,c, Faisal Al-Shoukr a,b,c, François Rouzet <sup>a,b,c</sup>, Denis Guilloteau <sup>e</sup> and Dominique Le Guludec <sup>a,b,c</sup>. a: Nuclear Medicine Department and DHU FIRE, Bichat-Claude Bernard University Hospital, AP-HP, Paris, France b :UMR 1148 Inserm, Paris, France c : Federation de Recherche en Imagerie Multimodale, Paris 7 University, Paris, France d: Pharmacy Department, Bichat Claude Bernard University Hospital, APHP, Paris, France e : Inserm, U930, François Rabelais University, CHRU, Tours, France \* Corresponding author : Rana Ben Azzouna : rana.benazzouna@gmail.com

# Abstract

The <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator is of increasing interest for clinical PET. The arrival on the market of the pharmaceutical grade generator which provides an eluate with chemical and radiochemical purities in conformity with the Eur. Pharmacopeia. specifications, makes possible the direct labelling of vectors. The kit formulation strategies using single vial productions can improve the access of hospitals and imaging centres which are not equipped with costly automated synthesis modules to the <sup>68</sup>Ga-radiopharmaceutical production. The manual radiosynthesis of <sup>68</sup>Ga requires handling of a relatively high amount of radioactivity, resulting in a high radiation dose to the hand. Moreover, the elution of <sup>68</sup>Ga/<sup>68</sup>Ge generator with 5mL of HCl as recommended by the manufacturer leads to a low <sup>68</sup>Ga concentration which can decrease the efficiency of the labelling procedure.

The aim of our approach is to circumvent these disadvantages and to offer an alternative to the hand elution and labelling for a routine production of <sup>68</sup>Ga-radiopharmaceuticals. The "vacuum elution approach" developed in this work makes possible - the elution of 95% of the available generator activity with 2.5mL of eluent; - the direct labelling of DOTA and NODAGA conjugated peptides with high radiochemical (> 97% for all cases) and radionuclidic (100%) purities, without hand exposure to the radiations during the preparation steps.

#### Keywords

<sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator; vacuum elution; NODAGA; DOTA; peptide; direct labelling; PET

# Introduction

Among functional imaging techniques, PET (positron emission tomography) stands out as a powerful modality with high sensitivity, resolution, dynamic scanning and that can generate the most accurate quantitative results. [1], [2]

In the last few years metal PET isotopes such as <sup>68</sup>Ga have gained increased interest for labelling of vectors such as peptides. [3] <sup>68</sup>Ga with rather high positron energy could be expected to perform with lower resolution as compared to <sup>18</sup>F. However both computational analysis and experimental measurements demonstrated equally high quality images for these two radionuclides. Therefore, <sup>68</sup>Ga is an excellent alternative to <sup>18</sup>F. [2] Furthermore, since <sup>68</sup>Ga is available from <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator, it allows hospitals to have daily access to <sup>68</sup>Ga without expensive cyclotron facilities.

A European pharmaceutical-grade generator has recently received marketing authorisation. [4] The chemical and radiochemical purities of this generator (in conformity with the Eur. Pharmacopeia specifications) [5] make possible the labelling of vectors without the prepurification of the eluate from its metallic impurities.

Recently, kit formulation strategies using single vial productions have arisen. In the following published methods, elution was performed manually, or eluate had to be handled and/or additional components (buffer, vectors...) had to be added to the vial containing the eluate:

- To label NODAGA-conjugated compounds, a fractioned elution of the generator was done and 1 mL containing 240 to 340 MBq was collected. The pH of the solution was adjusted by adding a sodium acetate solution to the vial containing the eluate. The NODAGA-conjugated protein was finally added to the radioactive mixture. [6]

- Ebenhan et al. eluated the generator with 2-3 mL of 0.1 M HCl and for labelling, 1 mL generator eluate was then added to the single vial kit containing the DKFZ-PSMA-11. [7]

- The labelling of DKFZ-PSMA-11was carried out by the addition of a small volume of sodium acetate solution or buffer to 1-2 mL of the eluate followed by the addition of the vector solution and the incubation at 85°C for 10 minutes. [8]

- For labelling of BAPEN, Yang et al. added 1mL of the eluate to the kit vial. The vial was then shaken vigorously and kept at room temperature for 10 minutes. A post-labelling purification was needed (using a Sep-pak Alumina-N light cartridge). [9]

The manual radiosynthesis of <sup>68</sup>Ga requires the handling of a relatively high amount of radioactivity, resulting in a high dose to the hand. To circumvent this problem, some authors continue to use automated process to label components conditioned in a single vial kit. [10] But described methods cannot be adopted in hospitals and imaging centres which are not equipped with costly automated synthesis modules.

Therefore, a vacuum elution and concentration method equivalent to that used with <sup>99</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc generator can be a convenient alternative. Five millilitres of 0.1 M chloride acid are needed to elute all of the available <sup>68</sup>Ga activity. [11] This large primary <sup>68</sup>Ga eluate volume is a disadvantage because it leads to a low <sup>68</sup>Ga concentration which can disturb the labelling procedure. [12] The concentration of the eluate is necessary in order to improve the labelling yield.

Herein, we describe a vacuum-concentrated elution of the pharmagrade generator and the use of this eluate to perform a direct labelling of peptides conjugated with the most commonly used chelator (DOTA) and NODAGA, a derivative from NOTA which is considered to be the "gold standard" for Ga<sup>3+</sup> chelation. [13]

NODAGA-c(RGDyK) and DOTATOC were used as models. Labelling was performed without any irradiation of the hands. High radiochemical and radionuclidic purities were obtained.

# Experimental

An Eckert and Ziegler <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga pharmaceutical grade generator (Berlin, Germany) was used beyond 12 months after the calibration date. Vacuum elution optimization experiments were performed up to 15 months after calibration date. Dosimetry measurements and peptides labelling were performed 16 months after the calibration date. Reference's activities obtained by the manufacturer's elution method were between 280 and 370 MBq.

# Vacuum elution and concentration optimization

A conical vial filled under nitrogen with a variable volume of 0.1M hydrochloric acid solution (BioXtra, Sigma-Aldrich, Germany) (1, 1.5, 2, 2.5, 3 and 4 mL (n=3)) was connected to the inlet-line of the generator. A plastic spike was adapted to the outlet-line of the generator. An evacuated sterile collection vial (30 mL vacuum, GE Healthcare) was placed inside a collection vial shield. When the plastic spike (outlet-line) is inserted into the collection vial, the chloride solution passes through the column by the action of vacuum. Elution is complete when all starting volume of the hydrochloric acid solution is inside the collection vial. The elution flow rate was estimated (1.6±0.07 mL/min). Activity was measured at the end of elution by means of a radionuclide activity calibrator (Scintidose, LemerPax) and compared to references activities which are obtained when the generator is eluted as recommended by the manufacturer. In this last case, elution was performed with 5 mL of eluent (0.1M HCl) and with a volume rate of 2 mL/minute. The recovery yield was expressed as % of eluted 68Ga with vacuum approach from the total 68Ga activity present at the end of the elution when the generator is eluted as recommended by the manufacturer. [11] Radionuclidic purities (the ratio between activities of <sup>68</sup>Ga vs. total activity in the eluate (in %)) were determined. <sup>68</sup>Ge breakthrough was expressed as the ratio between activities of <sup>68</sup>Ge vs. total activity in the eluate (in %). The total activity was counted with a dose calibrator (Scintidose, LemerPax) immediately after the end of elution. The <sup>68</sup>Ge contamination was determined by measuring the activity of the eluate more than 48 h after collection using a gamma counter (Wallac 1480 WIZARD® 3" NaI(Tl) scintillation detector, PerkinElmer®).

# Direct radiolabelling of NODAGA or DOTA conjugated peptides with the 'vacuum elution and concentration approach'

#### Formulation

The use of an appropriate formulation during the radiolabelling step is essential in order to maximize the labelling yield and avoid formation of colloidal <sup>68</sup>Ga(OH)<sub>3</sub>. Such labelling solution should be non-toxic, should not interfere with gallium ions and should preferentially have a weak metal complexing capacity in order to avoid formation of colloidal gallium. In addition, all components in the final product should be allowed for human use. We have chosen to use the sodium acetate solution, since it is available in a pharmaceutical grade (thus approved for human use). [14]

1M sodium acetate solution was prepared using sodium acetate trihydrate BioUltra ≥99.5% (Sigma-Aldrich, Germany) and Water TraceSELECT® (Fluka Analytical. Sigma-Aldrich-Switzerland).

The quantity of the solution necessary to have a pH of 4 (for DOTA conjugated peptides labelling) and 4.5 (for NODAGA-conjugated peptides labelling) when mixed with 2.5 mL of eluate were determined.

NODAGA-conjugated peptide solution

NODAGA-c(RGDyK) was described as a promising vector which can be used for imaging of tumor angiogenesis if labelled with a suitable isotope. [3] It was used in this work as a model in order to validate the "vacuum elution approach" for a direct labelling of NODAGA-conjugated peptides.

Twenty nanomoles of NODAGA-c(RGDyK) (ABX GmbH (advanced biochemical compounds, Radeberg, Germany)) ( $20\mu$ L of 1mg/mL solution in Water TraceSELECT<sup>®</sup>, Fluka Analytical. Sigma-Aldrich-Switzerland) were mixed with 440 $\mu$ L of 1M sodium acetate solution.

## DOTA-conjugated peptide solution

DOTATOC is one of the most common somatostatin analogs which are used for the neuroendocrine tumours imagery. [15] It is used in this work as a model in order to validate the "vacuum concentration approach" for a direct labelling of DOTA-conjugated peptides. Fifty nmoles of DOTA-D-Phe1-Tyr<sup>3</sup>-Octreotide (Edotreotide from Polypeptide Group) (70  $\mu$ L of 1mg/mL solution in Water TraceSELECT<sup>®</sup>, Fluka Analytical. Sigma-Aldrich – Switzerland) were mixed with 320  $\mu$ L of 1M sodium acetate solution.

#### Assembly for the "vacuum elution, concentration and labelling" approach

A conical vial filled with 2.5 mL of 0.1M hydrochloric acid solution was connected to the inlet-line of the generator. A three way valve was connected to the outlet-line of the generator. A plastic spike was adapted in one way of the valve and a syringe filled with the peptide solution prepared as described above and purged was adapted to the last free way of the valve. (Fig.1) The evacuated collection vial was placed into a dry-heater when DOTATOC labelling was performed and inside a collection vial shield (Medi24 PHE, Lead glass of thickness 25 mm, Medisystem) when NODAGA-c(RGDyK) peptide has to be labelled. We operate manually. The valve is turned firstly to connect the syringe and the plastic spike. When the plastic spike is inserted into the collection vial, the whole peptide solution passes inside the evacuated collection vial by the action of vacuum.

The valve is then turned in order to connect the collection vial to the outlet-line of the generator. The 2.5 mL of chloride solution are passed through the generator column by the action of vacuum and collected in the evacuated collection vial. The labelling of NODAGA-c(RGDyK) peptide occurs instantly at room temperature. DOTATOC labelling solution is incubated 7 minutes at 95°C. In both cases, the labelling was performed without hand mixing.

#### Quality control

The End of Synthesis (EOS) activity was measured by means of a radionuclide activity calibrator (Scintidose, LemerPax).

The pH of the final product was checked by pH paper and the radiochemical purity was determined by HPLC system from Dionex (DIONEX UltiMate 3000) consisting of HPLC pump, quaternary gradient unit, LPG-3400 SD DIONEX; autosampler, WPS-3000 SL DIONEX; multiwavelength detector, DAD-3000 DIONEX; column oven, TCC-3000 DIONEX and a radio detector, HERM LB 500 Berthold, Germany, coupled in series. Data acquisition and handling were performed using Chromeleon software, DIONEX.

The following HPLC conditions were used: ACE® column 100 Å C18 with the dimensions  $150 \text{mm} \times 4.6 \text{ mm}$ , 3-µm particle size. We applied gradient elution with the following

parameters: A) H2O, 0.1% TFA; B) acetonitrile, 0.1% TFA; with UV detection at 220 nm; flow was 1 mL/min; 0–2 min isocratic 10% B, 10–40% B linear gradient 8 min, 40–10% B linear gradient 2 min. Retention times (tR) for the radio-HPLC signal of <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(RGDyK) and of <sup>68</sup>Ga-DOTATOC were respectively 6.67±0.02 min and 10.27±0.005 min. The radionuclidic purity was verified by gamma counter (Wallac. 1480 WIZARD® 3" Gamma Counter PerkinElmer®) more than 48 hours after the end of synthesis.

# Comparative evaluation of dosimetry using the manual elution with syringe vs the 'vacuum elution approach'

The radiation exposure of the labeling procedure was evaluated for the manual elution and for the vacuum elution. For each method, two cases were considered, namely labelling at room temperature and labelling with the dry-heater.

The procedure was performed in a high-energy shielded cell (Lemer Pax, France) which allows the whole body exposure to be negligible. When the labelling is performed at room temperature, the evacuated collection vial is protected in a high-energy lead glass shield (Medi24 PHE, Medisystem). When a dry-heater is used, the vial is placed in the heater without any additional shield.

The radiation sources are the evacuated collection vial filled with  $^{68}$ Ga (half-life ~ 67.8 min, emission of positrons with mean energy 0.836 MeV and of 511 keV annihilation photons) and the outlet-line of the generator which is connected to the collection vial.

With the manual elution method, the operator is exposed to radiations during the whole elution step, the buffer addition step, the hand mixing step (using a remote handling claw) and the activity measurement step.

In stark contrast to this situation, the only step of the vacuum elution method during which the operator is exposed to radiation is the activity measurement.

The whole-body and hand dose exposures were estimated from measurements performed on the operator. The whole-body dose was estimated from the personal dose equivalent  $H_p(10)$  measured with an electronic radiation dosimeter (MGP 2000XB, Mirion Technologies Inc.) held at chest level. The dose to the hand was estimated from the personal dose equivalent  $H_p(0.07)$  measured with an electronic dosimeter (NED, Unfors Inc.) held on the middle finger on the hand which was the closest to the radioactive material.

# **Results and discussion**

#### Vacuum elution approach

During the optimization experiments we evaluated the recovery yield of the activity collected by vacuum elution using different volumes of 0.1 M HCl as eluent of the pharmagrade generator (n=3 per volume). Radionuclidic purities were also evaluated. Results are shown in table 1.

Figure 2 shows that the elution yield increases as the volume of eluent increases. The maximum yield is reached from an HCl solution volume of 2.5 mL and remains constant with higher volumes.

This volume was adopted for the peptides labelling.

# Direct radiolabelling of NODAGA or DOTA conjugated peptides with the 'vacuum elution approach'

NODAGA-conjugated peptide

The labelling of NODAGA-c(RGDyK) was performed at pH 4.5. Four hundred and forty microliters of 1M sodium acetate solution are necessary to have a pH of 4.5 when mixed with 2.5 mL of <sup>68</sup>GaCl<sub>3</sub> solution.

The average results of three production of <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(RGDyK) peptide using the "vacuum elution" approach are shown in table 2.

Radiochemical purity, as determined by high-performance liquid chromatography exceeded 99% in all cases. The final product contains sodium acetate which is approved for human use. [14]. Radionuclidic purities of the final product are in conformity with European Pharmacopeia specifications (RNP>99.9%). The average radiochemical yield of the three preparations is more than 93%.

#### DOTA-conjugated peptide

The labelling of DOTATOC was performed at pH 4. Three hundred and twenty microliters of 1M sodium acetate solution are necessary to have a pH of 4 when mixed with 2.5 mL of <sup>68</sup>GaCl<sub>3</sub> solution.

The average results of three preparation of <sup>68</sup>Ga-DOTATOC using the "vacuum elution and concentration" approach are shown in table 3.

Quality control parameters were all within specifications; radiochemical purity, as determined by high-performance liquid chromatography exceeded 97% in all cases; <sup>68</sup>Ge breakthrough is 600 times better than the European Pharmacopeia limit. The average radiochemical yield for the three preparations is about 94%. The preparation can be injected directly without further purifications.

The vaccum elution approach of the pharmaceutical grade generator can be adopted for routine labelling of NODAGA or DOTA-conjugated peptides.

# Comparative evaluation of dosimetry using the manual elution with syringe vs the 'vacuum elution and concentration approach'

The whole-body dose was below the dosimeter detection level  $(1 \ \mu Sv)$  for the two methods. Table 4 presents the estimated dose to the hand Hp(0.07) for the manual elution method and for the vacuum elution approach using a three-way valve as described above. The estimation is made for the process at room temperature and when a heating is required.

The measurements were made 16 months after the calibration date of  ${}^{68}$ Ga generator and scaled for the activity obtained at the calibration date and for an elution time of 150s (Elution as recommended by the manufacturer with 5mL of 0.1M HCl and at a rate no greater than 2ml/minute). The dose can be linearly scaled to the activity of the vial at end of elution A and to the duration of elution t:  $H_p = \{ H_p(elution) \ge t / t_{ref} + H_p(buffer) + H_p(mixing) + H_p(A measurement) \} xA / A_{ref}$  with  $A_{ref} = 1200 \text{ MBq}$  and  $t_{ref} = 150 \text{ s}$  and where the doses received at each step are given in table 4.

The dose to the hand in the vacuum method is the same for the process at room temperature and when a heating is required. The dose to the hand with the manual method is 4 times higher than with the vacuum method for the elution at room temperature and 8 times higher when a heating is required and therefore no shielding is in place.

# Conclusion

The work described here demonstrates that when the "vacuum elution approach" is used for the labelling of DOTA or NODAGA conjugated molecules as described above, it is possible to produce <sup>68</sup>Ga-labelled peptides with high radiochemical and radionuclidic purities without the need of costly equipment and with no irradiation of the hands during the preparation steps. This method can be used for the routine labelling of molecules formulated as single vial kit.

For routine application of the "vacuum elution approach", the method has to be evaluated by the manufacturer throughout the life of the generator to be sure that vacuum elution does not alter the titanium dioxide column and does not reduce the life of the generator. Moreover, for a clinical use, the chemical purity of the vacuum eluate has to be evaluated.

# References

[1] Alavi A, Lakhani P, Mavi A, Kung JW, Zhuang H. PET: a revolution in medical imaging. Radiol Clin North Am 2004;42:983–1001. doi:10.1016/j.rcl.2004.08.012.

[2] Velikyan I. Prospective of <sup>68</sup>Ga-radiopharmaceutical development. Theranostics 2013;4:47–80. doi:10.7150/thno.7447.

[3] Oxboel J, Schjoeth-Eskesen C, El-Ali HH, Madsen J, Kjaer A. <sup>64</sup>Cu-NODAGAc(RGDyK) Is a Promising New Angiogenesis PET Tracer: Correlation between Tumor Uptake and Integrin  $\alpha_V\beta_3$  Expression in Human Neuroendocrine Tumor Xenografts. Int J Mol Imaging 2012;2012:379807. doi:10.1155/2012/379807.

[4] Ma MT, Cullinane C, Imberti C, Baguña Torres J, Terry SYA, Roselt P, et al. New Tris(hydroxypyridinone) Bifunctional Chelators Containing Isothiocyanate Groups Provide a Versatile Platform for Rapid One-Step Labeling and PET Imaging with <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup>. Bioconjug Chem 2016;27:309–18. doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00335.

 [5] E. Pharmacopeia. Gallium (<sup>68</sup>Ga) Chloride Solution for Radiolabelling. Monograph. N° 2464, 23, 3, 508–509 2011.

[6] Wängler C, Wängler B, Lehner S, Elsner A, Todica A, Bartenstein P, et al. A universally applicable <sup>68</sup>Ga-labeling technique for proteins. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med 2011;52:586–91. doi:10.2967/jnumed.110.082198.

[7] Ebenhan T, Vorster M, Marjanovic-Painter B, Wagener J, Suthiram J, Modiselle M, et al. Development of a Single Vial Kit Solution for Radiolabeling of <sup>68</sup>Ga-DKFZ-PSMA-11 and Its Performance in Prostate Cancer Patients. Mol Basel Switz 2015;20:14860–78. doi:10.3390/molecules200814860.

[8] Satpati D, Shinto A, Kamaleshwaran KK, Sane S, Banerjee S. Convenient Preparation of [<sup>68</sup>Ga]DKFZ-PSMA-11 Using a Robust Single-Vial Kit and Demonstration of Its Clinical

Efficacy. Mol Imaging Biol MIB Off Publ Acad Mol Imaging 2016; 18: 420-7 doi:10.1007/s11307-016-0943-z.

[9] Yang BY, Jeong JM, Kim YJ, Choi JY, Lee Y-S, Lee DS, et al. Formulation of <sup>68</sup>Ga BAPEN kit for myocardial positron emission tomography imaging and biodistribution study. Nucl Med Biol 2010;37:149–55. doi:10.1016/j.nucmedbio.2009.10.010.

[10] Eppard E, Wuttke M, Nicodemus PL, Rösch F. Ethanol-Based Post-processing of Generator-Derived <sup>68</sup>Ga Toward Kit-Type Preparation of <sup>68</sup>Ga-Radiopharmaceuticals. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med 2014;55:1023–8. doi:10.2967/jnumed.113.133041.

[11] Eckert & Ziegler Radiopharma GmbH. GalliaPharm, Summury of product characteristics 2015.

[12] Velikyan I, Beyer GJ, Långström B. Microwave-supported preparation of <sup>68</sup>Ga bioconjugates with high specific radioactivity. Bioconjug Chem 2004;15:554–60. doi:10.1021/bc030078f.

[13] Price EW, Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. Chem Soc Rev 2014;43:260–90. doi:10.1039/C3CS60304K.

[14] Bauwens M, Chekol R, Vanbilloen H, Bormans G, Verbruggen A. Optimal buffer choice of the radiosynthesis of <sup>68</sup>Ga-Dotatoc for clinical application. Nucl Med Commun 2010;31:753–8. doi:10.1097/MNM.0b013e32833acb99.

[15] Maxwell JE, Howe JR. Imaging in neuroendocrine tumors: an update for the clinician. Int J Endocr Oncol 2015;2:159–68. doi:10.2217/ije.14.40.

# Legends for illustrations

# Figure 1. Assembly for vacuum elution and concentration approach for <sup>68</sup>Ga-peptide labelling.

(A) Connection of the different components which are necessary for the "vacuum elution and concentration approach"; (B) Step1: When the syringe containing the mixture (peptide + sodium acetate) is connected to the evacuated collection vial, the transfer of the solution to the vial occurs by the action of vacuum; (C) Step 2: The vacuum elution of gallium 68 occurs when the outlet-line of generator is connected to the evacuated collection vial.

**Figure 2.** Schematic representation of the elution recovery of the Pharmaceutical grade generator when eluted with vacuum elution and concentration approach. The recovery yield was expressed as % of eluted <sup>68</sup>Ga with vacuum approach from the total <sup>68</sup>Ga activity present at the end of the elution when the generator is eluted as recommended by the manufacturer.





Table 1

Elution	Average recovery $\pm$ sd	Average breakthrough	Average RNP (%)
volume (mL)	(%)	(%)	
1	50±2.6	2.52E-06	100
1.5	82±1.7	1.68E-06	100
2	90±2.3	3.47E-06	100
2.5	95±1.0	4.51E-06	100
3	94±1.4	3.89E-06	100
4	95±1.2	3.68E-06	100

Table 1. Vacuum elution optimization of the pharmaceutical grade generator (n=3 per

#### Table 2

# Table 2. Average results of three preparations of <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(RGDyK) using the vacuum elution and concentration method

Parameter	Test method	Average ±sd
Radiochemical purity (%)	Radio-HPLC	99.7 ±0.5
<sup>68</sup> Ge breakthrough (%)	Eur. Phar. RNP-Test B	2.19E-06 ± 3.14.E-07
Radionuclidic purity (%)	Eur. Phar. RNP-Test B	100 ± 0.0
pH	pH strip	4
Activity of final product (MBq)	Ionization chamber	269.7±3.3

#### Table 3

		Eur. Ph. Specification	
Parameter	Test method	(Edotreotide	Average ±sd
		monograph) [18]	
Radiochemical			
purity (%)	Radio-HPLC	≥91	$98.0 \pm 0.5$
68Ge breakthrough	Eur. Phar. RNP-	4 5 63	
(%)	Test B	<1.E-03	$1.62.E-06 \pm 3.47.E-07$
Radionuclidic purity	Eur. Phar. RNP-		
(%)	Test B	>99.9	$100 \pm 0.0$
рН	pH strip	4-8	4
Activity of final			
product (MPc)	Dose calibrator	###	269.70±3.34

# Table 4

Table 4. Dose to the hand  $H_p(0.07)$  in  $\mu$ Sv estimated during the labelling process at the calibration date of the  ${}^{68}$ Ge/ ${}^{68}$ Ga generator, for an average eluted activity of 1 200 MBq and an elution duration of 150s.

	Room Te	mperature	Heat	ing
Step	Manual	Vacuum	Manual	Vaccum
Elution	39	0	117	0
Buffer addition	13.8	0	13.8	0
Mixing	4.7	0	4.7	0
Activity	10.4	10.4	10.4	10.4
measurement	19.4	19.4	19.4	19.4
Total Hp(0.07)			1510	
(µSv)	/6.9	19.4	154.9	19.4

?

# 4.1.3. Mise au point d'une méthode automatique de production de traceurs marqués au gallium 67 en vue des études de biodistribution, stabilité, pharmacocinétique ...

Le développement de traceurs marqués au gallium 68 nécessite comme pour tout autre traceur des validations *in vitro* (stabilité de marquage, détermination de l'affinité pour la cible...) et *in vivo* (stabilité *in vivo*, biodistribution, pharmacocinétique...). Certaines explorations sont chronophages et la période physique du gallium 68 (~ 68 minutes) s'avère parfois insuffisante pour permettre de mener à bien certaines études. Le gallium 67 ( $T_{1/2}=3,26$  jours) constitue un outil indispensable pour la mise au point de ces investigations.

Le gallium ne peut se fixer au niveau d'un vecteur que s'il existe sous forme chimique Ga<sup>3+</sup>. Or, en Europe, le gallium 67 ne peut être accessible aux services hospitaliers que sous forme de complexe de citrate de gallium. Le développement de traceurs marqués au gallium 67, nécessite de ce fait une étape préalable de décomplexation du gallium de son citrate. La méthode décrite par Šasnár et coll. [224] permet de séparer le gallium du citrate par un simple chargement sur une colonne de silice. La récupération du gallium se fait par élution par de faibles volumes d'acide chlorhydrique 0,1 M. Le gallium est ainsi récupéré sous forme de chlorure de gallium 67 (même forme chimique que le produit d'élution des générateurs <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga) directement utilisable pour le marquage des vecteurs d'intérêt.

Nous nous sommes proposé dans ce qui suit de mettre en place une méthode automatique de production de <sup>67</sup>Ga reproductible et pouvant être utilisée pour le marquage de divers vecteurs conjugués à des chélatants adéquats. (NODAGA, DOTA...).

Nous avons commencé par mettre en place une méthode de contrôle qualité par chromatographie sur couches minces afin de pouvoir contrôler l'efficacité des séparations du citrate de son gallium et de sa récupération sous forme de chlorure de gallium 67.

La phase stationnaire utilisée est constituée de bandelettes ITLC-SG Pall, et la phase mobile retenue après l'essai de plusieurs solutions, est une solution d'acétate de sodium 0,4M pH 4,5 ; nous avons analysé d'une part les solutions mères de citrate de gallium 67 fournies par iba molecular (A) et des solutions de chlorure de gallium 68 issus des générateurs <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga (B). Les radiochromatogrammes obtenus sont représentés au niveau de la Figure 32.

Ces chromatogrammes montrent que le citrate de gallium a un Rf =1 alors que le chlorure de gallium a un Rf =0.



Figure 32. Radiochromatogrammes d'une solution de citrate de gallium 67 (A) et d'une solution de chlorure de gallium 68 (B) analysés par ITLC-SG et une solution d'acétate de Na 0,4M pH 4,5.

L'ajout d'un excès de citrate de sodium au niveau d'un éluat <sup>68</sup>GaCl<sub>3</sub> et l'analyse dans les mêmes conditions donne le radiochromatogramme suivant :





Ceci confirme que le citrate de gallium migre au niveau du front du solvant dans les conditions chromatographiques employées.

Nous avons procédé par la suite à une optimisation manuelle de la méthode de Š asnár et coll. La solution commerciale de citrate de gallium est diluée avec de l'eau ultrapure (TraceSELECT®, Fluka Analytical. Sigma-Aldrich-Switzerland) qsp 10 mL. Le mélange est chargé sur une cartouche de silice (Sep-Pak® Vac 1cc (100mg), Waters, Irlande). La cartouche est rincée par 2 × 5 mL d'eau ultrapure pour enlever le citrate. L'opération de dilution et de chargement est répétée une deuxième fois si nécessaire. L'activité retenue est éluée par une solution HCl 0,1M (BioXtra, Sigma-Aldrich, Germany). Le rendement d'adsorption est exprimé par le rapport entre l'activité de <sup>67</sup>Ga retenue au niveau de la cartouche de silice et l'activité totale de la solution de citrate de gallium à charger. Le rendement de désorption est le pourcentage de l'activité éluée de la cartouche de silice par rapport à l'activité retenue. Le rendement de production est le pourcentage de l'activité éluée

par rapport à l'activité initiale de la solution de citrate de gallium à charger. Les activités ont été mesurées dans un activimètre (scintidose, LemerPax).

Les résultats obtenus sont représentés au niveau du tableau suivant :

Volume du <sup>67</sup> Ga-citrate (mL)	Activité du <sup>67</sup> Ga-Citrate (MBq)	<sup>67</sup> Ga adsorbé au niveau de la cartouche de silice (MBq)	Rendement d'adsorption (%)	Activité éluée (MBq)	Rendement de désorption (%)	Rendement de production de <sup>67</sup> GaCl <sub>3</sub> (%)	PRC (%)
0,9	150,8	134,8	89,39	131,65	97,66	87,3	99,6
0,84	124	104,9	84,60	102,3	97,52	82,5	99 <mark>,</mark> 83
1	173,2	151,6	87,53	148,6	98,02	85,8	98,38
1	159,6	142,9	89,54	141,46	98,99	88,63	99,99
3	503,24	475,5	94,49	468,7	98,57	93,14	99,89
		Moyenne ± sd	89,11±3,61		98,15±0,62	87,47±3,90	99,54±0,66

Tableau 18. Préparation du chlorure de gallium 67 à partir de solutions de citrate de gallium.

Les solutions récupérées à la sortie de la cartouche de silice, contrôlées par CCM dans les mêmes conditions que précédemment donnent le profil chromatographique suivant :



La méthode employée permet de préparer quantitativement (>80%) à partir des solutions de citrate de gallium, du chlorure de gallium 67 de pureté radiochimique > 99%.

Nous avons procédé dans un deuxième temps à l'automatisation de cette méthode en utilisant le module de synthèse MiniAllInOne de Trasis. Le diagramme d'automatisation est présenté au niveau de la Figure 33. La vitesse de chargement a été fixée après plusieurs essais à 0,5 mL/min. Cette vitesse assure un rendement de chargement quantitatif (93,6±0,4%). Le volume d'élution a également été optimisé. La méthode automatique permet de récupérer 97,4±1,9% de l'activité accrochée dans 0,6 mL de HCl 0,1M. Le rendement moyen de production de chlorure de gallium 67 à partir de citrate de gallium 67 est donc de 91,2±1,3%. La PRC des solutions récupérées étaient de 99,6±0,6%.



Figure 33. Diagramme de production automatique de <sup>67</sup>GaCl<sub>3</sub> à partir de citrate de gallium 67 utilisant le module de synthèse MiniAllInOne de Trasis.

Des essais supplémentaires de la méthode automatique mise en place sont nécessaires pour confirmer sa reproductibilité.

Le chlorure de gallium obtenu par cette méthode a été utilisé pour le marquage de peptide et de polysaccharide conjugué au NODAGA.

Ce travail a été présenté sous forme de communication orale le 9 octobre 2015 lors des premières rencontres du réseau français de jeunes imageurs (FINYS) à Paris.

# 4.2. Deuxième partie: Développement de traceurs TEP

Dans cette deuxième partie des travaux de thèse, nous allons mettre en application les méthodes mises en place dans la première partie pour le marquage des vecteurs d'intérêt. Nous commencerons par les analogues de la somatostatine et la mise en place du marquage du DOTANOC au gallium 68 en vue de son utilisation dans un essai clinique multicentrique. Les résultats préliminaires de cet essai seront présentés. Un deuxième analogue de la somatostatine présentant des avantages chimiques par rapport aux DOTA-peptides sera également marqué et des études d'affinité pour les récepteurs de la somatostatine seront détaillées. Pour le ciblage de la PS, un travail de sélection du ligand d'intérêt sera présenté avant de passer aux opérations de marquage et de caractérisation *in vitro* et *in vivo* du radiotraceur. Nous terminerons enfin avec le ciblage de la P-sélectine avec le fucoïdane.



# 4.2.1. Mise au point d'analogues de la somatostatine marqués au <sup>68</sup>Ga

# 4.2.1.1. <sup>68</sup>Ga-DOTANOC – Dossier de médicament expérimental et étude clinique multicentrique



# 4.2.1.1.1. Substance active : <sup>68</sup>Ga-DOTANOC

Figure 34. Structure chimique du DOTANOC PM= 1455,7 Da (DOTANOC Acétate)

Le <sup>68</sup>Ga-DOTANOC ou <sup>68</sup>Ga-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*N*,*N*,*N*,*N*-tetraacetic acid-(DOTA)-1-Nal3-octreotide est un analogue de la somatostatine de nouvelle génération présentant l'avantage par rapport aux analogues de la somatostatine de la génération précédente (<sup>111</sup>In-pentétréotide) d'avoir une affinité plus large pour les récepteurs de la somatostatine (affinité élevée pour sst<sub>2</sub>, <sub>3</sub> et <sub>5</sub>). [219] Le <sup>68</sup>Ga étant un émetteur de positons, l'imagerie au <sup>68</sup>Ga-DOTANOC offrirait donc une meilleure résolution et une meilleure sensibilité que la scintigraphie conventionnelle, tout en étant moins irradiante et plus confortable pour le patient. En effet, En raison de la période physique courte du <sup>68</sup>Ga, une imagerie plus précoce après injection avec un excellent rapport signal/bruit serait possible [225]

Comparé aux deux autres analogues de la somatostatine de nouvelle génération les plus utilisés en clinique, l'affinité du <sup>68</sup>Ga-DOTANOC pour les sst<sub>2</sub> est plus élevée que celle du <sup>68</sup>Ga-DOTATOC et plus faible que celle du <sup>68</sup>Ga-DOTATATE. Il présente l'avantage d'avoir une affinité beaucoup plus élevée pour les sst<sub>3</sub> et sst<sub>5</sub> ce qui permet de cibler des tumeurs exprimant différemment un ou plusieurs de ces récepteurs. [144], [215] La dosimétrie aux organes non spécifiques (foie, moelle et reins) est par ailleurs plus faible pour le <sup>68</sup>Ga-DOTATOC ET <sup>68</sup>Ga-DOTATATE. [226]

Le peptide utilisé est produit par ABX selon les bonnes pratiques de fabrication (GMP), conditionné dans des flacons unitaires de 50µg et qualifié par la société pharmaceutique Iason<sup>®</sup> qui a assuré également les études de toxicité.

## 4.2.1.1.2. Objectifs de l'étude clinique

La mise au point de la production hospitalière automatique du <sup>68</sup>Ga-DOTANOC s'inscrit dans le cadre de l'« Etude diagnostique comparative multicentrique et prospective de la TEP/TDM au <sup>68</sup>Ga-DOTANOC et des procédures d'imagerie conventionnelle (scintigraphie à l'OctréoScan® et TDM/IRM) dans le bilan des tumeurs endocrines gastro-entéro-pancréatiques » dont le promoteur est le CHU de Nantes et l'investigateur principal est le Docteur Catherine ANSQUER.

Cette étude a pour but d'étudier les performances diagnostiques de la TEP/TDM au <sup>68</sup>Ga-DOTANOC dans les tumeurs endocrines gastro-entéro-pancréatiques (TE-GEP), en la comparant prospectivement aux autres techniques utilisées en routine clinique chez des patients porteurs de ces tumeurs: scintigraphie à l'OctréoScan® avec TEMP/TDM systématique, TDM multiphase, ± IRM ou échoendoscopie selon l'atteinte d'organe. Les résultats attendus sont une confirmation de la supériorité de la TEP au <sup>68</sup>Ga-DOTANOC par rapport à la scintigraphie à l'OctréoScan®, avec potentiellement un impact sur la prise en charge thérapeutique des patients. De tels résultats pourraient conduire à substituer dans un futur proche, ce nouvel examen à la scintigraphie à l'OctréoScan® dans l'exploration des TE-GEP. [227] La validation de l'utilisation des analogues de la somatostatine dans son application la plus fréquente (donc en cancérologie) nous aidera aussi dans la mise au point et le passage dans le futur à des applications dans des pathologies cardio-vasculaires qui constituent l'axe principal de recherche de l'équipe de médecine nucléaire de Bichat Claude Bernard.

Deux sites ont initialement participé à cette étude : Nantes et Angers. Pour pouvoir contribuer à cette étude, un dossier de médicament expérimental a été mis en place à Bichat Claude Bernard.

#### 4.2.1.1.3. Matériels et méthodes

#### a) Dossier de médicament expérimental - site Bichat Claude Bernard

Le générateur de qualité chimique (Obninsk® d'Eckert & Ziegler) a été utilisé. Une prépurification de l'éluat avant le marquage étant donc nécessaire. Une méthode de production automatique basée sur la purification cationique de l'éluat au moyen d'une résine échangeuse de cations (colonne Strata-XC de matrice -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>H<sup>+</sup> s'inspirant des méthodes décrites par Petrik et coll. [228] et Ocak et coll. [48] a été mise en place sur un module de synthèse Mini All InOne de Trasis<sup>®</sup> selon le diagramme de synthèse suivant :



**Figure 35. Diagramme de production de la substance active** <sup>68</sup>**Ga-DOTANOC** Extrait de *MiniAllInOne - Specific Application Manual -68Ga-DOTA-Peptide - Cationic Acetone- HCl - Bichat (Doc. Ref. : 001264).* 

Une transposition de la méthode de production fut nécessaire étant donné l'utilisation de module de synthèse présentant des caractéristiques différentes de celui utilisé par le site investigateur principal (Modular-Lab<sup>®</sup> d'Eckert & Ziegler).

Une première étape de cette étude a consisté à caractériser la matière première obtenue par cette méthode de purification (générateur chimique et pharmaceutique) conformément à la monographie de la pharmacopée européenne « solution de chlorure de gallium pour radiomarquage ». [41]

Pour réaliser le marquage du DOTANOC, les préparations suivantes ont été réalisées :

Désignation	Préparation
Eluant pour la	- HCl ultrapure 30% Merck 1.01514.0500 0,21 mL
XC	- H <sub>2</sub> O ultrapure Fluka 95305 2,23 mL
(HCl 0,02M,	- acétone 99,5% puriss.p.a, Fluka 32201qsp 100mL
acétone 98%)	Conservation entre 2 et 8°C, à l'abri de la lumière pendant une <b>période &lt; 5 jours</b>

Désignation	Préparation
Tampon acétate	1) Préparation de deux solutions :
de sodium 0,2M, pH 4	* <u>acétate de sodium (NaOAc) 0,2M</u> :
-	- sodium acétate trihydraté, sigma aldrich 71188 2,721g
	- H <sub>2</sub> O puris.p.a FLUKA 95305 qsp 100mL
	* <u>acide acétique (AcOH) 0,2 M</u> :
	- solution d'acide acétique glacial 99,99% sigma-aldrich 338826 : 1,145 mL
	- H <sub>2</sub> Oqsp 100mL
	2) Mélange des deux solutions : 82 mL de AcOH 0,2M + 18mL de NaOAc 0,2M
	3) Contrôle du pH : le <b>pH</b> doit être de $4 \pm 0,2$
	Le tampon doit être conservé entre 2 et 8°C.
DOTANOC	Le lyophilisat de DOTANOC (50 $\mu$ g ; acétate de sodium ; conservation à -20°C)
(solution de pentide)	est repris avec 100 $\mu L$ d'eau ultra-pure (puriss. p.a FLUKA 95305) afin d'avoir
0,5mg/mL	une concentration finale de 0,5 mg/ml. La totalité de la solution est utilisée pour la
	radiosynthèse.
	Cette préparation est utilisée extemporanément.

Le procédé de synthèse de la substance active adopté comporte les étapes suivantes :

- Transfert du mélange (peptide (solution à 0,5mg/mL) + 2 mL de la solution d'acétate de sodium 0,2M pH 4) au niveau du flacon de réaction ;

Conditionnement de la cartouche échangeuse de cations avec 2mL d'éthanol 96%, puis avec
3 mL de NaCl 0,9% ;

- Elution du générateur <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga par 5 mL d'une solution HCl 0,1M et chargement de l'éluat sur la résine échangeuse de cations ;

Elution de la cartouche échangeuse de cations avec 1 mL du mélange (HCL 0,02M/acétone 98%) vers le flacon de réaction ;

- Marquage : 400 secondes à 95°C

 Conditionnement de la cartouche C18 (Waters) avec 2mL d'éthanol 96%, puis avec 4 mL de NaCl 0,9%

Dilution de la solution de marquage avec du NaCl 0,9% et son chargement sur la C18. Le
 <sup>68</sup>Ga-DOTANOC est retenu au niveau de la C18

- Rinçage de la C18 avec du NaCl 0,9% afin d'éliminer le <sup>68</sup>Ga non complexé ;

 Elution de la C18 vers le flacon de produit fini via le filtre stérilisant avec 0,8mL d'éthanol à 96%; - Dilution du produit par du sérum physiologique (qsp 10mL).

Afin d'automatiser l'ensemble de ces étapes, les cassettes suivantes ont été conçues :



Figure 36. Diagramme schématique des cassettes de production automatique du <sup>68</sup>Ga-DOTANOC au niveau du module de synthèse MiniAllInOne de Trasis.

Trois productions ont servi à la validation de la méthode (Dossier de lots).

Un mediafill test et une détermination de la biocharge ont été réalisés pour la validation microbiologique du procédé de production.

Pour l'évaluation de la biocharge, une synthèse complète a été réalisée dans les conditions réelles sans filtration finale. Après décroissance du flacon du produit fini (au moins 48 heures après la fin de production), le contrôle a été réalisé par le laboratoire de contrôle du département de la pharmacie de Bichat Claude Bernard. Sous une hotte à flux d'air laminaire, un millilitre de produit a été prélevé aseptiquement et filtré en utilisant une rampe de filtration munie d'un disque de porosité 0,45 µm. Le filtre a été ensuite déposé sur une gélose TSA

(milieu gélosé B de la Ph. Eur) et mis à incuber pendant 5 jours à 30-35°C. Un autre millilitre a été filtré comme précédemment et le filtre a été déposé sur une gélose sabouraud (milieu gélosé C de la Ph. Eur.) pendant 5 jours à 20-25°C.

Pour la réalisation du Mediafill test, le procédé de production a été effectué en remplaçant le contenu des récipients renfermant les réactifs nécessaires à la production de la substance active par du bouillon Trypcase soja afin de mettre en évidence un éventuel développement microbien, révélateur d'une contamination et ainsi d'une faille dans le maintien de l'asepsie du protocole. La stérilité du milieu de culture contenu dans le flacon du produit fini a été vérifiée en l'incubant 7 jours entre 20 et 25°C puis 7 jours entre 30 et 35°C.

# b) Production du <sup>68</sup>Ga-DOTANOC pour l'étude clinique multicentrique

Quatorze productions ont été réalisées à Bichat Claude Bernard dans le cadre de l'étude clinique multicentrique. Pour chaque production, les contrôles de qualité suivants ont été réalisés :

	Critères de qualité	Spécifications		
	Contrôles libératoires			
1	Activité recueillie	□ 150MBq en fin de fabrication		
2	Test d'intégrité du filtre	2 bars		
3	Caractères organoleptiques	Solution Claire et incolore		
4	Volume	10 mL (volume maximal injectable chez l'homme)		
5	pH	4,5-7		
6	PRC par HPLC	>90%		
	Contrôles p	ost-libératoires		
7	Stérilité (after release)	Stérile (conformément à la méthode de la Ph. Eur)		
8	Teneur en <sup>68</sup> Ge (after release)	< 0,001% de l'activité totale à libération		
9	Endotoxines (after release)	175UI/10mL. (volume maximum injectable de 10mL)		
		17,5UI/mL		
10	Ethanol (after release)	< 79g/L (< 10%V/V).		
11	Acétone résiduelle (after	< 7,15 g/L (< 50 mg par jour d'après ICH		
	release)	guideline on residual solvant ; 1994)		

L'activité du produit fini est mesurée avec un activimètre calibré pour le <sup>68</sup>Ga (Scintidose, LemerPax). Le pH du produit fini est contrôlé avec du papier pH. La pureté radiochimique est déterminée par chromatographie liquide haute pression (CLHP) en utilisant une chaîne Dionex Ultimate 3000 (pompe quaternaire LPG-3400 SD DIONEX, échantillonneur automatique WPS-3000 SL DIONEX, un détecteur à barrette de diodes DAD-3000 DIONEX, un four à colonnes TCC-3000 DIONEX) et un détecteur de radioactivité HERM LB 500 de Berthold, couplé en série avec la chaîne de chromatographie liquide.

Les conditions chromatographiques suivantes ont été utilisées : colonne C18, Acclaim® 120Å ( $4.6 \times 150 \text{ mm}$ ), particule de taille 5µm. Gradient d'élution : A) H2O, 0.05% TFA; B)

????

acétonitrile, 0.05% TFA ; détecton UV à 220 nm ; débit 1mL/min. 0-2 min : 10% B en isocratique ; 20 min de gradient linéaire 10-90% ; 2 min de gradient linéaire 90-10% B.

Les endotoxines bactériennes ont été déterminées par le LAL test.

Les rendements de marquage sont exprimés par le rapport de l'activité du produit fini (décroissance corrigée à l'heure de fin d'élution) sur l'activité théorique maximale éluable à partir du générateur.

# 4.2.1.1.4. Résultats et discussion

### a) Lots de validation

Des résultats de caractérisation d'éluats purifiés par la méthode cationique sont présentés au niveau du tableau suivant :

Paramètre	Méthode	Spécifications	Résultats
Caractères	Contrôle visuel	Solution incolore et	Solution limpide et incolore
organoleptiques		exempte de particules	
	Papier		
pH	indicateur de	□2	1-2
	pН		
Identification du			
radionucléide $(t_{1/2})$ en	Activimètre	62-74 min	$68,58 \pm 0,84$
min			
Pureté radionucléidique	Activimètre et		
(%)	spectrométrie	>99,999%	100
(70)	gamma		
Teneur en Fe <sup>3+</sup>	ICP-AES	<10µg/GBq	$0,27 \pm 0,09*$
Teneur en Zn <sup>2+</sup>	ICP-AES	<10µg/GBq	1,46 ± 1,38*

Tableau 19. Caractérisation d'éluats purifié par méthode cationique

(\*)pharmagrade generator

Les résultats des productions des lots de validation sont représentés au niveau du Tableau 20.

Le rendement de production moyen (±sd) est 61,1±6,42 %

Tableau 20. Résultats des lots de validation du dossier de médicament expérimental	<sup>8</sup> Ga-DOTANOC
--	-------------------------

Paramètre	Méthode	Spécifications	Lot 1	Lot 2	Lot 3
Caractères	Contrôle vieuel	Solution limpide	Limpide et	Limpide et	Limpide et
organoleptiques	Controle visuel	et incolore	incolore	incolore	incolore
Identification de la					
substance active	HPLC	TR=11,3 min	11,321	11,313	11,325
(min)					
Identification du					
radionucléide (t <sub>1/2</sub> )	Activimètre	62 – 74 min	67,44	68,38	69,12
(min)					
	Papier				
pH	indicateur de	4,5 à 7,0	6-7	6-7	6-7
	pН				
		Maintien de la			
TIF	2 bars	pression maint	maintenues	naintenues maintenues	2 bars maintenus
		appliquée au	mannenues		
		filtre			

Paramètre	Méthode	Spécifications	Lot 1	Lot 2	Lot 3
PRC (%)	HPLC	≥ 90,0%	100	100	100
<sup>68</sup> Ge (%)	Activimètre et spectrométrie gamma	<0,001%	5.66 E-7	6.14 E-7	5.65 E-7
Activité du produit fini (MBq)	Activimètre	□150 MBq	228 MBq	202 MBq	206 MBq
Activité volumique (MBq/mL)	Activimètre		22,8	20,2	20,6
Stérilité	Ensemencement	Stérile	Stérile	Stérile	stérile
Endotoxines bactériennes	LAL test	$\leq$ 17,5 EU/mL	<0,125 UI/mL	<0,125 UI/mL	<0,125 UI/mL
Ethanol (% v/v)	CPG	$\leq$ 10,0% v/v	3,9	3,2	3,1
Acétone	CPG	< 7,15 g/L	ND*	ND*	ND*

(\*) ND : non détectée

L'évaluation de la biocharge a donné OUFC dans tous les cas.

Les bouillons issus des mediafill test sont restés limpides durant les 14 jours d'incubation.

Aucune pousse microbienne n'est apparue pour chacun des 3 tests.

Tous ces résultats ont permis de conclure que le processus de production et de filtration finale du <sup>68</sup>Ga-DOTANOC mis en place conduit à un produit conforme aux spécifications.

# b) Résultats des productions pour l'essai clinique-Site Bichat Claude Bernard

Les résultats des productions de <sup>68</sup>Ga-DOTANOC réalisés à Bichat Claude Bernard dans le cadre de l'essai clinique multicentrique sont représentés au niveau du Tableau 21.

Paramètre	Résultat		
Caractères organoleptiques	Solution limpide incolore		
Activité du produit fini (MBq)	350,84 ±64,58		
Rendement (moyenne±sd (%))	53±8,86		
TIF	conforme		
Vol° (mL)	9-10		
pH	6-7		
PRC (%)	99,98 ±0,07		
<sup>68</sup> Ge (%)	$1,21E-07 \pm 9,42E-08$		
Stérilité	stérile		
Endotoxines bactériennes	<0,125 UI/mL		
Ethanol (g/L)	$35,08 \pm 8,79$		
Acétone (g/L)	<0,1		

Tableau 21. Résultats des productions du <sup>68</sup>Ga-DOTANOC pour l'essai clinique multicentrique (n=14)

Les produits obtenus sont conformes aux spécifications.

Les puretés radiochimiques obtenues (99,98±0,07%) sont supérieures à celles obtenues par Petrik et coll. (93,8±1,1%). Les rendements de marquage obtenus sont en contrepartie inférieurs à ceux décrits par ces mêmes auteurs. (69 ±1,4%). [228] Au vu des résultats de la teneur du produit fini en éthanol, le volume d'éthanol utilisé pour la récupération du <sup>68</sup>GaDotanoc peut être augmenté en vue d'augmenter la quantité de peptide récupéré à partir de la cartouche de purification du produit fini.

# c) Résultats préliminaires de l'étude clinique multicentrique

Les résultats de vingt-neuf patients (Sites Nantes et Angers) ayant des tumeurs endocrines digestives différenciées (TED) ont été analysés. Ces patients ont bénéficié dans un intervalle de 2 mois, d'un TDM thoraco-abdomino-pelvien 4 phases, d'une scintigraphie à l'Octréoscan<sup>®</sup> avec TEMP/TDM corps entier à 24h et d'une TEP/TDM au <sup>68</sup>Ga-DOTANOC pour bilan initial (n=16), suspicion de récidive (n=10) ou recherche d'un primitif inconnu (n=3). Les examens étaient interprétés en aveugle avec pour gold standard (GS), les données histologiques, iconographiques et du suivi >6 mois, en considérant un maximum de 5 lésions par organe.

Au total, 138 lésions étaient détectées par l'imagerie, incluant 105 lésions confirmées à ce jour selon le GS. La TEP détectait toutes les lésions, excepté deux ganglions identifiés uniquement à l'histologie et un insulinome pancréatique détecté par la TDM. L'Octréoscan<sup>®</sup> ne détectait pas de lésion supplémentaire. Les sensibilités par lésion des différentes procédures d'imagerie sont résumées dans le tableau suivant :

	Sensibilité (en %)			
	Octréoscan <sup>®</sup>	TDM	<sup>68</sup> Ga-DOTANOC TEP	
Pancréas	50	85	95	
Duodénum/Intestin	20	40	100	
Ganglions	57	87	87	
Foie	69	95	100	
Carcinose	0	33	100	
Os	100	100	100	

Tableau 22. Résultats préliminaires de la sensibilité de la TEP au <sup>68</sup>Ga-DOTANOC par rapport à la TDM et à la scintigraphie à l'Octréoscan<sup>®</sup>.

Les résultats préliminaires confirment donc la sensibilité supérieure de la TEP au <sup>68</sup>Ga-DOTANOC comparativement au bilan conventionnel optimisé, dans l'exploration des TED. Ces résultats sont à consolider par l'analyse de l'ensemble des données relatives aux 120 patients inclus dans l'étude y compris les 14 patients de Bichat Claude Bernard.

Ces résultats préliminaires concordent avec les résultats publiés précédemment dans la littérature : Yodphat Krausz et coll. ont démontré que le <sup>68</sup>Ga-DOTANOC permet de détecter plus de foyers tumoraux que l'<sup>111</sup>In-DTPA-Octréotide et est mieux toléré par les patients. [229] Ambrosini et coll. ont démontré les excellentes performances diagnostiques de la TEP au <sup>68</sup>Ga-DOTANOC avec pour conséquence une modification de la stadification de la tumeur

ou de la prise en charge thérapeutique des patients dans 55,5% des cas par rapport à l'imagerie conventionnelle. [230] Prasad et coll. ont démontré la supériorité du <sup>68</sup>Ga-DOTANOC par rapport à l'Octréoscan<sup>®</sup> dans la détection des tumeurs neuroendocrines primaires inconnues (39% en plus). [231] Fanti et coll. ont démontré que le <sup>68</sup>Ga-DOTANOC fournit des informations supplémentaires par rapport à l'imagerie conventionnelle dans 7 cas sur 14 des tumeurs neuroendocrines explorées. Des résultats particulièrement intéressants ont été obtenus dans les cas de phéochromocytomes. [232]

Pour illustrer la supériorité du <sup>68</sup>Ga-DOTANOC, nous fournissons à titre d'exemple, un cas clinique de tumeur neuroendocrine pancréatique opérée avec radiofréquence de deux nodules hépatiques. La TDM et l'IRM montrent deux nodules hépatiques avec une suspicion de métastases hépatiques. La scintigraphie à l'Octréoscan<sup>®</sup> réalisée à Beaujon ne montre pas de foyer d'hyperfixation pathologique dans le foie ou ailleurs. La TEP au <sup>68</sup>Ga-DOTANOC réalisée à Bichat a démontré des foyers d'hyperfixation au niveau des ganglions mésentériques et au niveau des anses grêles (Figure 37).



Figure 37. Imagerie au <sup>68</sup>Ga-DOTANOC vs <sup>111</sup>In-Octreoscan® chez un patient présentant une tumeur neuroendocrine pancréatique avec suspicion de métastases hépatiques.

# 4.2.1.2. <sup>68</sup>Ga-NODAGANOC

Comme décrit dans le paragraphe « Critères de choix du chélatant du gallium », le NOTA permet de former avec le  $Ga^{3+}$  à température ambiante des complexes thermodynamiquement beaucoup plus stables que les complexes DOTA-Ga. L'un des dérivés du NOTA, le NODAGA présente en plus l'avantage de préserver la sphère de coordination du gallium (gallium hexacoordonné) et donc de former des complexes plus stables que le NOTA. L'analyse des données d'affinité de la littérature pour un peptide, le TOC a montré aussi que le peptide conjugué au NODAGA a une affinité pour sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub> et sst<sub>5</sub> plus élevée que celle du même peptide (antagoniste de la somatostatine), lorsque celui-ci est conjugué au NODAGA, l'activité retenue au niveau des reins, pancréas et des surrénales est plus faible que celle du même peptide conjugué au DOTA. [211], [233] Les avantages que présente l'analogue de la somatostatine NODAGA font que nous nous sommes intéressés au développement préclinique du NODAGANOC pour l'imagerie TEP.

Avec l'arrivée sur le marché des générateurs de <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga fabriqués selon les bonnes pratiques de fabrication et donnant des éluats conformes aux spécifications de la pharmacopée européenne, nous avons opté pour les méthodes de marquage directes sans passer par une étape de prépurification de l'éluats et donc sans avoir besoin d'équipements onéreux (synthétiseurs automatiques).



#### 4.2.1.2.1. Structure chimique

Figure 38. Structure chimique du NODAGANOC

MM= 1426,7 g/mole

# 4.2.1.2.2. Matériels et méthodes

# a) Radiomarquage au <sup>68</sup>Ga

# Première technique :

La première technique utilisée pour le marquage est l'élution fractionnée optimisée décrite plus haut.

Cinquante microlitres d'une solution à 1mg/mL dans de l'eau ultrapure fluka (35 nmoles) ont été mélangés avec 800µL de tampon acétate d'ammonium 1M pH 4,4. Le générateur est élué avec 5 mL de HCl 0,1M. Seule une fraction de 2mL concentrant plus de 90% de l'activité totale du générateur est récupérée directement au niveau du flacon de réaction.

Le mélange est incubé 5 minutes à température ambiante

# Deuxième technique :

La deuxième technique testée est celle qui est décrite au niveau de la publication « "vacuum elution and concentration approach" for direct radiolabelling of DOTA and NODAGA conjugated peptides » présentée plus haut.

La méthode utilisée pour le marquage de l'analogue de la somatostatine est la même que celle utilisée pour le marquage du NODAGA-c(RGDyK) : 20 nmoles de peptide ont été mélangés avec 440 µL de tampon acétate de sodium 1M. Le mélange est transféré au niveau d'un flacon sous-vide. Un flacon conique contenant 2,5mL de HCl 0,1 M et rempli sous azote est placé à l'entrée du générateur. L'élution sous vide est effectuée en connectant l'entrée du générateur avec le flacon sous-vide renfermant le mélange (peptide-tampon). Le produit de marquage est contrôlé immédiatement après la fin de l'élution.

Contrôles de qualité :

Les pH des solutions ont été déterminés en utilisant du papier pH

Le contrôle de la pureté radiochimique s'est fait avec chromatographie liquide haute pression en utilisant la chaîne Dionex couplée en série avec le détecteur de radioactivité Berthold décrits ci-dessus.

Les conditions chromatographiques suivantes ont été utilisées : colonne ACE® 100 Å C18 (150mm× 4.6 mm, taille des particules 3 □m). Le gradient suivant a été utilisé : A) H2O, 0.1% TFA; B) acétonitrile, 0.1% TFA; débit : 1mL/min ; 0-2 min : 10%B en isocratique ; 8min de gradient linéaire 10-40% B ; 2 minutes de gradient linéaire 40-10% B.

#### b) Evaluation de l'affinité de la molécule pour les récepteurs de la somatostatine

Les cellules AR4-2J ont été utilisées pour l'étude de l'affinité du NODAGANOC pour les récepteurs de la somatostatine. Ces cellules sont issues d'adénocarcinome pancréatique chimio-induit de rat et expriment les ARNm de tous les sst à l'exception des sst<sub>4</sub>. Elles constituent donc un bon modèle expérimental pour l'étude *in vitro* de l'affinité des analogues de la somatostatine pour ces sous-types de récepteurs. [234]

Les cellules ont été cultivées à 37°C dans un milieu de culture RPMI 1640 supplémenté avec de la glutamine 2 mM, 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et des antibiotiques (Streptomycine 0,1 mg/mL, Pénicilline 100UI) (Gibco, France), sous une atmosphère humidifiée (95% d'air ; 5% de  $CO_2$ ). [235] Ces cellules ont été réparties dans des plaques de culture de 12 puits à raison de 500000 cellules par puit. Une expérience de compétition entre le NODAGANOC et le <sup>68</sup>Ga-DOTANOC a été réalisée. Les valeurs des concentrations inhibitrices 50 (IC<sub>50</sub>) du NODAGANOC ont pu être déterminées.

Les puits ont tout d'abord été rincés avec 1000µL de RPMI contenant 0,2% de BSA (albumine de sérum bovin) puis incubés à 37°C pendant 60 minutes avec 15.10<sup>-9</sup>M de <sup>68</sup>Ga-DOTANOC (marquage selon la même méthode que celle de l'essai clinique) dilué dans du RPMI contenant 0,2% de BSA, 1,10-Phenanthroline 0,8mM, en présence de concentrations croissantes (de 1,7.10<sup>-12</sup>M à 10<sup>-6</sup>M) de la molécule à tester froide, le NODAGANOC.

Après le lavage des puits à deux reprises avec du RPMI froid contenant 0,2% de BSA (afin de stopper la liaison du traceur aux récepteurs de la cellule), les cellules ont été lysées avec 1000µL de NaOH 0,1N par puit et le contenu de chaque puit a été alors collecté séparément au niveau de tubes. Le comptage s'est fait au moyen d'un compteur gamma (Wallac. 1480 WIZARD® 3□Gamma Counter PerkinElmer®). La liaison non spécifique a été évaluée en présence de 10<sup>-6</sup>M de NODAGANOC.

L'expérience a été répétée trois fois.

L'analyse des données a été effectuée avec le logiciel « GraphPad Prism ».

#### c) Evaluation de la stabilité du marquage in vitro

La stabilité du marquage a été évaluée à température ambiante pendant 2h après la fin du marquage par CLHP selon les mêmes conditions décrites plus haut.

La stabilité du produit marqué a été également testée au niveau du sérum humain (100 $\mu$ L). Un marquage au <sup>67</sup>Ga a été effectué (35 nmoles marqués avec 158MBq de <sup>67</sup>GaCl<sub>3</sub> obtenu selon la méthode décrite au niveau du paragraphe « Mise au point d'une méthode automatique de

production de traceurs marqués au gallium 67 en vue des études de biodistribution, stabilité, pharmacocinétique... ». L'équivalent de 3 MBq a été incubé dans le plasma à 37°C. Des échantillons de 20µL ont été prélevés aux temps d'incubation suivants : T5' T15' T30' T60' T90' et T120'. Après précipitation des protéines au méthanol, et filtration du surnageant, le méthanol a été évaporé sous flux d'azote. Les échantillons ont été analysés par CLHP en utilisant la même méthode que précédemment.

# 4.2.1.2.3. Résultats et discussion

# a) Radiomarquage

# Première technique

Le marquage avec l'acétate d'ammonium et l'élution fractionnée a donné les résultats suivants :

	A(PF) (MBq)	AS (MBq/nmole)	Rendement (%)	pН	PRC (%)
Marquage 1	674.1	19.26	79.5	4	94.34
Marquage 2	594.6	16.99	90.3	4	96.54
Marquage 3	571.6	16.33	85.1	4	96.17
moyenne	613.43	17.53	84.97	4.00	95.68
écart type	53.78	1.54	5.40	0.00	1.18

# Deuxième technique

Un essai de marquage avec l'élution sous-vide a donné les résultats suivants :

A(PF) = 279.3 MBq

AS= 14 MBq/nmole

PRC=100%

Un radiochromatogramme typique du <sup>68</sup>Ga-NODAGANOC est représenté au niveau de la Figure 39.



Figure 39. Radiochromatogramme typique du <sup>68</sup>Ga-NODAGANOC obtenu par « vacuum elution ».

#### b) Evaluation de l'affinité de la molécule pour les récepteurs de la somatostatine

Les CI<sub>50</sub> du NODAGANOC pour les cellules AR4-2J ont été mesurées après 60 minutes d'incubation à 37°C. L'analyse des données avec le logiciel GraphPad Prism a donné la courbe de compétition suivante :



L'analyse de cette courbe donne une IC<sub>50</sub> du NODAGANOC égale à 1,2  $\pm$ 0.5nM

Les mesures d'affinité présentes dans la littérature traitent essentiellement de la mesure de l'affinité des analogues pour les récepteurs isolés. Le résultat obtenu sur les cellules AR4-2J n'est pas directement comparable avec ces données. Une étude de l'affinité du DOTATOC pour les cellules CHO-SSTr2, C6-SSTr2, Jurkat-SSTr2, et Jurkat surexprimant les sst<sub>2</sub> a été effectuée par H. Zhang et coll. et a démontré que les concentrations inhibitrices 50 du <sup>nat</sup>Ga-DOTATOC sont similaires pour toutes les cellules et égales à 4,3±1,6 nM. [236] Comparées aux CI50 du Ga-DOTATOC sur les récepteurs sst<sub>2</sub> isolés (IC<sub>50</sub>= 2,5±0,5 [208]), ces dernières
sont plus élevées. L'affinité sur des cellules est plus faible que celle étudiée sur récepteurs isolés.

L'affinité nanomolaire du produit pour les cellules AR4-2J surexprimant 4 sous-types de récepteurs de la somatostatine font du NODAGANOC un vecteur potentiellement intéressant pour le développement d'un traceur TEP pour les pathologies surexprimant ces récepteurs.

# c) Evaluation de la stabilité in vitro

A température ambiante :

		Temps de contrôle				
		T0	T1h	T2h	T 3h	T4h
DDC(0/)	Méthode 1	95,68	93,94	91.31	89.37	85.41
PKC (70)	Méthode 2	100	ND	95,39	ND	ND

La baisse de la pureté radiochimique est accompagnée par l'apparition d'une impureté au temps de rétention 11,87±0,01 min.

La pureté radiochimique du produit reste conforme aux spécifications de la pharmacopée européenne (monographie Edotréotide [121]) deux heures après la fin du marquage quel que soit la méthode de marquage utilisée.

Dans le plasma humain :

Temps (min)	0	5	15	30	60	90	120
PRC (%)	100	100	100	100	100	100	100

Le produit est stable après incubation à 37°C dans le plasma humain pendant deux heures.

# 4.2.1.2.4. Perspectives

Des études de la biodistribution du <sup>68</sup>Ga-NODAGANOC et de son affinité pour les sous-types de récepteurs isolés de la somatostatine nous fourniraient des informations complémentaires sur l'intérêt potentiel de ce peptide dans le ciblage des récepteurs de la somatostatine. Sa validation sur un modèle de tumeur neuroendocrine et de pathologie cardio-vasculaire avec une composante inflammatoire (athérosclérose, myocardite) sera faite dans le futur. La praticité de la méthode de marquage mise en place fait du NODAGANOC un candidat potentiel pour le développement d'un kit radiopharmaceutique.

Le travail effectué sur le NODAGANOC a été valorisé sous forme d'abstract qui a été accepté pour une participation sous forme de communication orale au Theranostics World Congress 2016 qui se tiendra à Melbourne du 7 au 9 novembre 2016

# 4.2.2. Développement de traceurs de la phosphatidylsérine

# 4.2.2.1. Sélection du ligand pour le développement d'un traceur TEP

Nous nous sommes proposé dans un premier temps de sélectionner le vecteur pour le développement de traceur TEP ciblant la PS. Nous nous sommes intéressés naturellement à l'Annexine étant donné son affinité nanomolaire pour la cible d'intérêt. Nous avons commencé par effectuer une comparaison entre la forme la plus largement utilisée en scintigraphie monophotonique à savoir l'Annexin A5 recombinante conjuguée au groupement hydrazinonicotinamide (HYNIC) et un mutant qui a été développé par Tait et coll., l'annexine V-128 [237] qui présente un site de complexation de <sup>99m</sup>Tc unique sous forme d'extension oligopeptidique au niveau N-terminal (Ala-Gly-Gly-Cys-Gly-His) donc du côté opposé de la séquence de liaison à la PS, ainsi qu'une mutation ponctuelle Cys316Ser. La forme conjuguée à l'HYNIC, a été utilisée avec succès dans plusieurs études. Elle présente cependant plusieurs limites principalement une forte captation au niveau des reins qui conduit à une forte irradiation et peut constituer une limitation pour imager l'abdomen. Structurellement, la production de cette forme est peu reproductible et conduit à des produits hétérogènes. En effet, le couplage des groupes N-succinimidyl-HYNIC peut se faire au hasard au niveau des groupes amines de plusieurs résidus lysine dont certains sont présents tout proche ou au niveau de la séquence de liaison aux membranes, ce qui peut engendrer une perte d'affinité pour la cible. [158] L'annexin V-128 utilisée présente en plus l'avantage d'être produite selon les bonnes pratiques de fabrication.

La comparaison entre les deux formes a été effectuée par Khadija Ben Ali au cours de son master 2, sur des modèles d'endocardite infectieuse et de myocardite auto-immune chez le rat et a donné lieu à la publication suivante :

# <u>Article 4</u>: Preclinical validation of <sup>99m</sup>Tc-annexin A5-128

# (Publié)

Preclinical validation of <sup>99m</sup>Tc-annexin A5-128 in experimental autoimmune myocarditis and infective endocarditis: comparison with <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-annexin A5, *Mol. Imaging*, vol. 13, 2014.

K. Benali, L. Louedec, **R. Ben Azzouna**, O. Merceron, P. Nassar, F. Al Shoukr, A. Petiet, D. Barbato, J.-B. Michel, L. Sarda-Mantel, D. Le Guludec and F. Rouzet.

**RESEARCH ARTICLE** 

# Preclinical Validation of <sup>99m</sup>Tc–Annexin A5-128 in Experimental Autoimmune Myocarditis and Infective Endocarditis: Comparison with <sup>99m</sup>Tc–HYNIC–Annexin A5

Khadija Benali, Liliane Louedec, <mark>Rana Ben Azzouna</mark>, Olivier Merceron, Pierre Nassar, Faisal Al Shoukr, Anne Petiet, Donato Barbato, Jean-Baptiste Michel, Laure Sarda-Mantel, Dominique Le Guludec, and Francois Rouzet

#### Abstract

Hydrazinonicotinamide-annexin A5 (HYNIC-Anx), a 99m technetium (<sup>99m</sup>Tc)-labeled agent targeting phosphatidylserine, proved to be sensitive for the detection of apoptosis and thrombosis but is no longer available for clinical use. A mutant of human annexin designed for direct <sup>99m</sup>Tc labeling (referred to as Anx A5-128) showed improved binding affinity to phosphatidylserine and is expected to be used in humans. We compared both radiotracers with regard to pharmacokinetics and diagnostic ability in animal models. Biodistribution studies were performed in normal rats. Radiolabeled Anx A5-128 and HYNIC-Anx were compared in cardiovascular settings involving phosphatidylserine expression: experimental autoimmune myocarditis and infective endocarditis. Initial blood clearance was faster for Anx A5-128 than for HYNIC-Anx, and tissue biodistribution was similar overall for both tracers. The diagnostic sensitivity of Anx A5-128 was excellent and comparable to that of HYNIC-Anx. Anx A5-128 showed biodistribution and diagnostic ability similar to those of the HYNIC-Anx derivative, supporting its translation to clinical use.

A NNEXIN A5 is an endogenous protein (36 kDa) that specifically binds with nanomolar affinity to phosphatidylserine (PS) exposed by apoptotic cells and activated platelets.<sup>1,2</sup> Radiolabeled annexin A5 (Anx) has been successfully evaluated as a molecular imaging agent of apoptotic cells and thrombus, with many potential clinical applications in oncology, cardiovascular diseases, and rheumatology.<sup>1</sup> The most widely used compound designed to 99m technetium (<sup>99m</sup>Tc) labeling has been achieved by conjugation of the hydrazinonicotinamide (HYNIC) chelating group with recombinant human Anx A5 (rh-Anx)<sup>1</sup> in preclinical studies (for a review, see Boersma and colleagues<sup>1</sup> and Rouzet and colleagues<sup>2</sup>), healthy volunteers,<sup>3</sup> and various oncologic settings in humans.<sup>4–8</sup> However, Tait and colleagues showed that random

DOI 10.2310/7290.2014.00049

© 2014 Decker Intellectual Properties



amine-directed modification of Anx, such as HYNIC derivatization, was associated with multiple molecular species and finally reduced its overall membrane-binding affinity.<sup>9</sup> Additionally, preformulated radiolabeling kits (formerly supplied by Theseus Imaging Corp., Worcester, MA) are no longer available for clinical use.<sup>1</sup>

Mutants of rh-Anx were developed for direct sitespecific 99m Tc labeling by the addition of a unique 99m Tcchelating oligopeptide sequence at their N-terminus.<sup>10</sup> The N-terminal region of Anx is located on the concave face of the molecule, opposite the binding site,<sup>11</sup> resulting in unaltered membrane-binding affinity compared to wildtype rh-Anx.9 One of those derivatives, referred to as Anx A5-128, showed increased in vivo binding on apoptotic cells compared to HYNIC-Anx.9 Moreover, 99m Tc labeling of this new Anx derivative is quite straightforward, with good radiochemical purity, and Good Manufacturing Practices (GMP) grade Anx A5-128 kits designed for <sup>99m</sup>Tc labeling are undergoing the agreement process for human use in the United States and Europe (Atreus Pharmaceuticals, Ottawa, ON). Additionally, several clinical trials designed to assess Anx A5-128 in various settings are about to begin, and precise preclinical validation is mandatory.

Since preclinical validation has been obtained with HYNIC-Anx, but clinical studies will be carried out with

Molecular Imaging, 2014: pp 1-10

From Inserm, U1148, and Paris Diderot University, Paris, France; Department of Nuclear Medicine, Bichat-Claude Bernard Hospital, AP-HP, Paris, France; Fédération de Recherche en Imagerie Multimodale, Paris Diderot University, Paris, France; and Advanced Accelerator Applications - via Ribes 5 - 10010 - Colleretto Giacosa, Turin, Italy.

Address reprint requests to: François Rouzet, MD, PhD, Inserm, U1148, 46 rue Henri-Huchard, 75877 Paris Cedex 18, France; e-mail: francois.rouzet@bch.aphp.fr.

### Benali et al

the new Anx A5-128 variant, it is necessary to ascertain whether both forms of radiolabeled Anx are comparable with regard to biokinetics and diagnostic ability in animal models. Diagnostic value has been evaluated in cardiovascular settings in which radiolabeled Anx is likely to meet clinical demand, representative of the two biological pathways involving PS exposure: (1) experimental autoimmune myocarditis because it is associated with cardiomyocyte and lymphocyte apoptosis,<sup>12–15</sup> which is likely to be associated with therapy efficacy,<sup>16</sup> and (2) infective endocarditis because the relationship between focal Anx uptake and platelet activation in vegetations has been previously evidenced.<sup>17,18</sup>

### Methods

### **Experimental Models**

The procedures and animal care complied with the principles of animal care formulated by the National Society for Medical Research. This study was conducted under the authorization of the French Directorate of Veterinary Services (No. 75-214) and the approval of the animal ethics committee of our institution.

### Experimental Autoimmune Myocarditis

Experimental autoimmune myocarditis was induced in 12 male Lewis rats by immunization with purified rat cardiomyosin.<sup>19</sup> Animals were housed and treated in accordance with institutional guidelines for animals.

*Myosin purification* Cardiac rat myosin was purified according to the Shiverick technique.<sup>20</sup> Cardiac myosin purity was checked by polyacrylamide gel electrophoresis. The protein concentration was measured using the Bradford technique, and myosin was then emulsified with phosphate-buffered saline (PBS) to obtain a final solution of 4 mg/mL and was stored in aliquots at  $-20^{\circ}$ C.

*Rat immunization* To induce autoimmune myocarditis, purified myosin was first emulsified with an equal volume of complete Freund adjuvant supplemented with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco) to a final concentration of 2 mg/mL (solution A). Myosin was replaced by an equivalent volume of PBS added to the complete Freund adjuvant/*M. tuberculosis* solution for control rats (solution B). Six hundred micrograms of rat cardiomyosin in solution A was injected subcutaneously in Lewis rats at

day 0 and day 7 (experimental autoimmune myocarditis group), whereas an equivalent volume of solution B was used for the control group (n = 16).

### Infective Endocarditis in Rats

Infective endocarditis was induced in 12 male Wistar rats (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) as described previously.<sup>17</sup> In brief, a polyethylene catheter was inserted into the left ventricle through the right carotid artery in anesthetized rats (ketamine/xylazine). The catheter remained indwelling throughout the experiment to induce an aseptic thrombotic vegetation formation on the aortic valves. Twentyfour hours after catheterization, rats underwent bacterial inoculation (10<sup>8</sup> colony-forming units of *Enterococcus faecalis* JH2-2) by the left jugular vein under halothane anesthesia.

### Annexin Labeling Procedure

### HYNIC-Anx

Freshly eluted sodium pertechnetate (1,110–1,850 MBq) and 50 µg stannous tricine buffer (pH 6) were added to a vial containing 275 µg recombinant human HYNIC-Anx A5 (National Cancer Institute BRB Preclinical Repository, Frederick, MD) and left to incubate for 15 minutes at room temperature. The quality control was performed with instant thin-layer chromatography developed in acid citrate dextrose buffer. The radiochemical purity was 89.5  $\pm$  1.3% (n = 20).

### Anx A5-128

Anx A5-128 was provided (Atreus Pharmaceuticals and Advanced Accelerator Applications, Saint-Genis Pouilly, France) as lyophilized radiolabeling kits manufactured according to GMP quality requirements, taken from a batch intended for first-in-human administration. The material was shipped within 6 months after manufacturing. A single-dose vial contains 400 µg of Anx A5-128, 10 µg of stannous chloride as a reducing agent, and other excipients. For radiolabeling, freshly eluted sodium pertechnetate (1,110-1,850 MBq in 0.6-1 mL) was added to the vial and left to incubate for 1.5 hours at room temperature according to the manufacturer's instructions. The quality control was performed with instant thin-layer chromatography developed in acid citrate dextrose buffer. The radiochemical purity was 96.9  $\pm$  0.9% (n = 20). To check for potential high-molecular-weight impurities, the solution was filtered through a 0.22 µm filter (Millex-GV filter, 0.22 µm, 4 mm)

Validation of 99m Tc-Labeled Anx A5-128

in a series of eight radiolabeling procedures of Anx A5-128. The radioactivity loss was 3.7  $\pm$  1.6%, corresponding to the dead volume of the filter (< 10  $\mu L$  according to the manufacturer's specifications).

Both precursors were stored at  $-40^{\circ}$ C and used within 6 months of receipt.

### **Biodistribution Studies**

### Blood Clearance Assessment

Twelve male Wistar rats were anesthetized with urethane (1.22 g/kg). A catheter was inserted into the left carotid for blood sampling. Each animal received a single intravenous injection (penis vein) of  $43.6 \pm 9.2$  MBq (corresponding to  $15.7 \pm 3.3$  µg of protein) <sup>99m</sup>Tc-Anx-128 (n = 6) or  $47.3 \pm 4.2$  MBq (corresponding to  $11.7 \pm 1.0$  µg of protein) <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Anx (n = 6) in a 250 µL volume. Blood samples (250 µL) were taken 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, and 240 minutes postinjection. For each sample, one aliquot of 100 µL was taken for well counting (Cobra II, Packard, Meriden, CT).

### Tissue Biodistribution of <sup>99m</sup>Tc-Anx-128 and <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Anx

Two groups of male Wistar rats (weight 320-335 g) were injected with an activity of  $49.9 \pm 8.5$  MBq (corresponding to 18.0  $\pm$  3.1 µg of protein) <sup>99m</sup>Tc-Anx-128 (n = 6) or 54.2  $\pm$  6.6 MBq (corresponding to 13.4  $\pm$  1.6 µg of protein)  $^{99m}$ Tc-HYNIC-Anx (n = 6). Animals were euthanized with pentobarbital overdose 60 minutes after intravenous injection of tracer, and relevant organs and tissues were harvested, washed, and weighed. Each tissue and the injected solution were aliquoted for well counting. After correction for residual activity in the injection site and radioactive decay, the results were expressed as the percentage of administered dose per gram of organ (%ID/g) and by the percentage of administered dose per organ (%ID/organ). Blood, muscles, bone, and skin (and hairs) were assumed to represent, respectively, 6%, 40%, 10%, and 18% of the body weight.17

### **Imaging Procedures**

### Myocarditis Model

Imaging was performed 3 weeks after immunization. The natural history of acute autoimmune myocarditis over weeks allows considering the absence of significant disease progression in a time span of a few days. Consequently, each myocarditis rat has been injected (60 MBq) and imaged sequentially with both tracers (<sup>99m</sup>Tc–HYNIC-Anx first in six animals) 2 days apart, assuming that myocardial injury would have remained stable during this period. Additionally, a group of controls was injected with either <sup>99m</sup>Tc–HYNIC-Anx or <sup>99m</sup>Tc–Anx A5-128 (n = 8 for each tracer).

### Endocarditis Model

Imaging was performed 4 days after bacterial inoculation. Due to the rapid progression of the disease, sequential imaging of the same animal was not feasible. Therefore, endocarditis models were injected (60 MBq) with either one of the tracers (n = 6 for each tracer).

### Acquisition and Reconstruction Parameters

Helical single-photon emission computed tomography/ computed tomography (SPECT/CT) was performed under intraperitoneal pentobarbital (4 mg/100 g body weight) anesthesia with a four-headed multiplexing multipinhole camera (NanoSPECT/CT plus, Bioscan Inc., Washington, DC). Each head was equipped with a tungsten collimator (rat whole body - high resolution). Flat-panel detector CT was performed first (tube voltage 55 kV, tube current 145 mAs), and then the helical SPECT acquisition was performed with the following parameters: helical scan with 28 projections/ rotation plus circular scan at the beginning and at the end of the scan range, matrix size  $256 \times 256$ , zoom 1.14 (pixel size 1 mm<sup>2</sup>). SPECT data were reconstructed using HiSPECT (Bioscan Inc.) iterative reconstruction software on a dedicated workstation and visualized using InVivoScope software with coregistration of SPECT and CT images.

### Data Analysis

*Myocarditis model* Scintigrams were assessed visually to determine the presence of a focal or diffuse tracer uptake in the myocardium. For in vivo quantification, activity (kBq per voxel) was measured in regions of interest drawn over focal uptake when present or encompassing the left ventricular myocardium (midportion) in the absence of focal uptake and the lung to serve as background activity.

*Endocarditis model* Scintigrams were assessed visually to determine the presence of a focal tracer uptake in the heart and measured as previously indicated. The ratio between myocardium to lung activity (uptake ratio) was calculated.

### Benali et al

### Autoradiography

4

After completion of SPECT/CT, animals were euthanized with pentobarbital overdose. Tissue samples were frozen and cut into transverse sections of 20 µm thickness, which were exposed in a digital beta imager (BetaIMAGER, Biospace Lab, Paris, France) for 8 hours.

### Myocarditis Model

Quantification was performed by calculating the ratio between the activity (mean counts/mm<sup>2</sup>) of the left ventricular section in the myocarditis models and in controls.

### Endocarditis Model

Quantification was performed by calculating the ratio between the activity (mean counts/mm<sup>2</sup>) of the vegetation and the activity of a region of interest drawn on normal myocardium remote from the vegetation.

### Histology and Immunohistochemistry

At sacrifice, transverse sections were frozen for one part (autoradiography) and fixed in buffered paraformaldehyde (4% v/v, 48 hours) for the other to obtain better morphologic definition. Fixed tissues were embedded in paraffin and sectioned at 5  $\mu$ m thickness. Sections were stained with hematoxylin-eosin for morphologic analysis of cells and nuclei. In myocarditis, sections from both immunized and control rats were used for apoptotic assessment using the Apostain assay (Alexis Corp., Lausen, Switzerland).

### Statistical Analysis

Continuous data were expressed as mean and standard deviation and compared by use of unpaired Student *t*-test in myocarditis (12 myocarditis and 8 controls) and as median and range and compared by use of the nonparametric Mann-Whitney U test in endocarditis (n = 6) (*MedCalc* version 12.5, MedCalc Software, Ostend, Belgium). The level of significance was set at p < .05.

### Results

### Blood Clearance and Tissue Biodistribution

After intravenous injection, blood clearance of both tracers followed a two-compartment model (Figure 1). Initial blood clearance ( $\alpha$  component) was more rapid for <sup>99m</sup>Tc–Anx A5-128 with an effective half-life of 10.5 minutes

(accounting for 87% of the injected activity) versus 18 minutes (accounting for 90% of the injected activity) for <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Anx. The slow component was 217 minutes (accounting for 13% of the injected activity) for <sup>99m</sup>Tc-Anx-128 and 153 minutes (accounting for 10% of the injected activity) for <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Anx. The blood activity of <sup>99m</sup>Tc-Anx-128 was consistently lower than that of <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Anx at each time point (p < .05) but remained below 5% of the injected dose from 30 minutes after injection for both tracers.

For both tracers, the highest concentrations were found in kidneys (and urine) and then liver, spleen, and muscles (Table 1). Bone marrow presented a mild tracer uptake, which was also detectable on SPECT. It should be noted that the physiologic uptake was very low on myocardium and brain. Tissue biodistribution assessed 60 minutes after injection showed a lower uptake of <sup>99m</sup>Tc–Anx A5-128 compared to HYNIC-Anx in liver and thyroid, whereas the uptake was greater with <sup>99m</sup>Tc–Anx A5-128 in heart and lungs.

### Myocarditis

Visual analysis of SPECT/CT was positive with both tracers in all animals with myocarditis and negative in controls (Figure 2 and Figure 3). The general pattern was a moderate and heterogeneous myocardial tracer uptake in myocarditis rats, with additional intense focal uptake in 8 of 12 rats. In case of additional focal uptake, their location and intensity were similar with both tracers (see Figure 3, A and B). Quantitative analysis of myocardial focal uptake/ lung ratio in myocarditis and control groups was  $1.7 \pm 0.6$ versus  $1.0 \pm 0.3$ , respectively (p = .006), with <sup>99m</sup>Tc– HYNIC-Anx and  $1.7 \pm 0.5$  versus  $1.2 \pm 0.2$ , respectively (p = .003), with <sup>99m</sup>Tc–Anx A5-128. Uptake ratios were not significantly different between tracers in the myocarditis and control groups (Figure 4).

Autoradiography showed diffuse Anx myocardial uptake with more intense and focal hot spots in the myocardium of rats with myocarditis, whereas the uptake was faint and uniform in controls. Histologic analysis showed injured myocytes that disappeared and mononuclear cell infiltrates diffusely distributed throughout the myocardium, with clusters frequently located in the subepicardium. Comparative analysis of autoradiography and histology performed on the same slices showed colocalization of Anx uptake (whatever the form) and myocardial damage (see Figure 3, C and D), characterized by myocyte disappearance and immune cell infiltrates (see



Figure 3, E-G). Both injured cardiomyocytes and immune cell infiltrates were positive for Apostain.

### Infective Endocarditis

Macroscopic examination at sacrifice showed that leftsided vegetations were localized mainly on the aortic valves but could also be observed on the aortic wall along the catheter path and in the left ventricle (apex), as previously described.17 Visual analysis of SPECT/CT was positive with both tracers in all endocarditis rats. This focal uptake was intense in the aortic valve area and could be associated with foci localized in the ascending aorta or left ventricular apex (Figure 5, A and B). Quantitative analysis of vegetation uptake on SPECT was (median and range) 2.5 (1.4-9.6) with 99mTc-HYNIC-Anx versus 4.7 (2.1-8.7) with  $^{99m}$ Tc-Anx A5-128 (p = .3) (Figure 6A). Vegetation to remote myocardium ratio on autoradiography was (median and range) 8.1 (2.8-31) with 99mTc-HYNIC-Anx and 11 (2.2–24) with  $^{99m}$ Tc–Anx A5-128 (p = .4) (Figure 6B).

Comparative analysis of autoradiography and histologic slices demonstrated localization of Anx uptake (whatever the tracer) at the peripheral layer of vegetations, corresponding to the site of vegetation growth through platelet recruitment from the blood pool (Figure 5, C-E), without significant positive cell for apoptosis, as previously described.17,18

### Discussion

This study shows that Anx A5-128 is comparable to HYNIC-Anx as a molecular imaging agent of exposed PS with regard to biodistribution and diagnostic ability in rat models of cardiovascular diseases. Blood clearance of Anx A5-128 is more rapid than that of HYNIC-Anx, but

without a significant impact on contrast of images. The diagnostic sensitivity was excellent for both tracers, with an abnormal uptake detectable in all animals with autoimmune myocarditis or infective endocarditis. The first model is characterized by an acute autoimmune injury of the myocytes containing myosin associated with immune cell infiltrate within the myocardium (see Watanabe and colleagues<sup>21</sup> for a review). In our experiments, both injured myocytes and immune cells could be positive for Apostain, providing evidence that both cell types could expose PS on their membrane and bind Anx, due to antibody-mediated myocyte injury leading to myocyte death for one part and immune cell maturation involving both immune cell proliferation and selection through apoptosis of nonrelevant cells for another part. In humans, evidence of cardiomyocytes' membrane leakage in acute myocarditis was obtained in vivo by use of indium 111labeled antimyosin antibodies.<sup>22</sup> In such patients, antimyosin antibody uptake pattern was either diffuse or focal and not systematized, comparable to that obtained with Anx in the present study.

5

The model of infective endocarditis is characterized by the development of active vegetations, involving platelet aggregates, which highly expose PS as a link between platelet activation and fibrin formation,17,18 generating intense uptake of Anx A5 in the absence of significant apoptosis.2

### **Blood** Clearance

The most striking difference between Anx A5-128 and HYNIC-Anx was blood clearance, mainly the rapid component during the first hour after injection. Less than 2% of the injected activity of Anx A5-128 remained in the blood pool 30 minutes after intravenous injection, which confers an advantage for the tracer in early imaging,

?????

6		Benali et al					
Table 1. Tissue Biodistribution of <sup>99m</sup> Tc-Anx A5-128 and <sup>99m</sup> Tc-HYNIC-Anx, 1 Hour after Intravenous Injection							
	% Injected Activity/	'g of Organ (%IA/g)	% Injected Activ	ity/Organ (%IA/organ)			
	<sup>99m</sup> Tc-Anx 128	99mTc-HYNIC-Anx	<sup>99m</sup> Tc-Anx 128	99mTc–HYNIC- Anx			
Liver*	$0.25 \pm 0.053$	$1.65 \pm 1.50$	$2.80 \pm 0.77$	$14.78 \pm 8.70$			
Spleen	$0.45 \pm 0.11$	$0.227 \pm 0.075$	$0.39 \pm 0.12$	$0.195 \pm 0.064$			
Heart*	$0.021 \pm 0.006$	$0.009 \pm 0.004$	$0.022 \pm 0.006$	$0.010 \pm 0.004$			
Lungs*	$0.08 \pm 0.01$	$0.032 \pm 0.012$	$0.10 \pm 0.02$	$0.050 \pm 0.016$			
Brain	$0.001 \pm 0.0005$	$0.002 \pm 0.001$	$0.002 \pm 0.001$	$0.003 \pm 0.002$			
Muscle	$0.014 \pm 0.012$	$0.007 \pm 0.003$	$1.43 \pm 1.23$	$0.96 \pm 0.43$			
Bones	$0.032 \pm 0.0093$	$0.009 \pm 0.003$	$0.79 \pm 0.14$	$0.28 \pm 0.084$			
Skin	$0.022 \pm 0.019$	$0.010 \pm 0.002$	$1.05 \pm 0.91$	$0.57 \pm 0.13$			
Thyroid**	$0.046 \pm 0.030$	$0.13 \pm 0.04$	$0.001 \pm 0.001$	$0.003 \pm 0.001$			
Testis	$0.007 \pm 0.003$	$0.005 \pm 0.002$	$0.018 \pm 0.09$	$0.015 \pm 0.004$			
Stomach	$0.037 \pm 0.043$	$0.046 \pm 0.029$	$0.07 \pm 0.09$	$0.093 \pm 0.069$			
Kidneys	$3.98 \pm 0.24$	$3.08 \pm 0.75$	$9.2 \pm 1.1$	$8.9 \pm 1.6$			
Blood***	$0.05 \pm 0.04$	$0.19 \pm 0.08$	$0.72 \pm 0.55$	$3.36 \pm 1.60$			
Urine	$0.88 \pm 1.4$	$1.12 \pm 1.12$	ND	ND			

ND = not determined.

p < .02; p = .04; p = .04; p = .03.

particularly in cardiac and vascular applications. In our previous work aiming to assess the diagnostic ability of HYNIC-Anx in endocarditis, we found that the contrast was optimal between 1 and 2 hours after injection.<sup>17</sup> In previous studies evaluating Anx A5-128 uptake in animal models of apoptosis, data acquisition (in vitro and in vivo) was also performed 60 minutes after injection.<sup>9,23</sup> However, this may not apply to tissues such as tumors, where penetration of imaging agents is necessary.

Extensive biodistribution of HYNIC-Anx in rats has been reported by Ohtsuki and colleagues, with a blood clearance pattern similar to ours.<sup>24</sup> Conversely, we found some differences in tissue biodistribution such as kidney and spleen uptake, whereas liver, lung, and blood-pool activity were comparable. To date, there are no published data of tissue biodistribution of Anx A5-128 in rats, but we found a quite similar uptake to that reported by Tait and colleagues in mice for kidney and spleen.<sup>23</sup> However, they



Figure 2. Representative images in control rats. No abnormal uptake was detectable on SPECT/CT in the heart area either with  $^{99m}$ Tc-Anx A5-128 (A) or with  $^{99m}$ Tc-HYNIC-Anx (B). On autoradiography of a myocardial slice, the tracer uptake was faint and homogeneous with both tracers (C, D).



Validation of 99m Tc-Labeled Anx A5-128

2.5 p=0.8 2.0 Uptake Ratio 1.5 1.0 p=0.003 0.5 p=0.006 p=0.1 0 Myocarditis Controls Myocarditis Controls Anx A5-128 HYNIC-Anx

**Figure 4.** Comparison of uptake ratios in rat models of experimental autoimmune myocarditis (n = 12) injected sequentially with <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Anx and <sup>99m</sup>Tc-Anx A5-128 (2 days apart, <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Anx first in six animals) and in controls (n = 8 for each tracer). Data are presented as mean and 95% confidence interval.

and colleagues,<sup>24</sup> thus suggesting a species-related difference. The slightly greater thyroid uptake with <sup>99m</sup>Tc– HYNIC-Anx compared to <sup>99m</sup>Tc–Anx A5-128 is likely to be related to lower radiochemical purity.

### **Diagnostic Ability**

Figure 3. Experimental autoimmune myocarditis in rat (SPECT/CT) 3 weeks after immunization. Images are normalized for maximal activity (kBq)/pixel because the greatest value is outside the cardiac area. Acquisitions were performed 1 hour after intravenous injection of <sup>99m</sup>Tc-Anx A5-128 (A) or <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Anx (B) 2 days apart in the same animal (the natural history of acute autoimmune myocarditis over weeks allows considering the absence of significant disease progression in a time span of a few days). Comparable focal uptake is detectable on the anterior wall with both tracers (arrow). Comparative analysis of autoradiography (C) and histology (D, hematoxylin-eosin stain, ×10 original magnification; E, inlet ×40 original magnification) on the same slice showing colocalization of annexin uptake (99mTc-HYNIC-Anx) and areas of myocyte damage, edema, and cell infiltration. The background of Apostain staining was low in the control heart (negative controls, F; ×40 original magnification), whereas it was intense in tissue areas characterized by myocyte disappearance and immune cell infiltrates (G; ×40 original magnification). Both injured cardiomyocytes and immune cell infiltrates were positive for Apostain.

reported eightfold greater renal uptake for HYNIC-Anx compared to Anx A5-128. We did not find such a difference, and in our study, renal uptake was comparable for both forms, in the range of values reported by Ohtsuki The site-specific labeling of the new variant Anx A5-128 at the N-terminus of the protein, distant from the binding site, was associated with an increase in PS binding affinity and greater uptake in vivo on the apoptotic cells of mice liver after treatment with cyclophosphamide, compared to HYNIC derivatization.9 The faster blood clearance of Anx A5-128 (see Tait and colleagues<sup>23</sup> and the present study) is likely to result in the lowest background activity and potentially better image contrast compared to HYNIC-Anx. The present study shows uptake ratios greater with Anx A5-128 than with HYNIC-Anx consistently in apoptosis and thrombus, but without a significant difference. Although larger samples may have allowed us to reach significance, the difference remains small between both tracers, for three main reasons: (1) even if the binding affinity of HYNIC-Anx is slightly lower than that of Anx A5-128, it is still in the nanomolar range, allowing stable binding of the imaging agent to the target; (2) the remaining activity of HYNIC-Anx in the blood pool 1 hour after injection is only around 3% of the injected activity, with a very limited impact on image contrast; and (3) on

?



Figure 5. Infective endocarditis in rat (SPECT/CT). Both acquisitions were performed 1 hour after intravenous injection of <sup>99m</sup>Tc–Anx A5-128 (A) or <sup>99m</sup>Tc–HYNIC-Anx (B), in different animals. A focal uptake is detectable in the aortic valve area with both tracers (*arrow*). Comparative analysis of autoradiography (C) and histology (D, hematoxylin-eosin stain, ×10 original magnification; E, Alcian blue stain, ×40 original magnification) on adjacent slices showing localization of annexin uptake (<sup>99m</sup>Tc–Anx A5-128) matching with vegetations (*arrow*) on the aortic valve and aorta root. LV = left ventricular.

normal myocardium, nonspecific binding measured as tissue activity in control animals was slightly greater with Anx A5-128 compared to HYNIC-Anx. Taken together, these results show that the new Anx variant provides images of quality at least equivalent to HYNIC form, with excellent diagnostic value.

# **Clinical Applications**

Our group<sup>14</sup> and others<sup>12</sup> reported on the increased HYNIC-Anx uptake in acute and subacute animal models of myocarditis and on the correlation of HYNIC-Anx cardiac uptake and number of apoptotic cells in this setting. There is a clinical demand for better diagnosis and characterization of inflammatory cardiac diseases that is not met by current diagnostic tools.25 Cardiac magnetic resonance does not allow for precise identification of immune injury or early therapy monitoring,<sup>26</sup> and fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) is hampered by physiologic cardiac uptake of the tracer. As well, although diagnosis of endocarditis relies on clinical data, biology, and echocardiography, recent studies using whole body scanning with FDG-PET showed that half of septic embolisms were not detected by morphologic imaging alone.<sup>27,28</sup> Even if FDG-PET is now readily available in routine practice, its diagnostic value is likely to be hampered by the physiologic uptake of the tracer by heart and brain. In this regard, by targeting specifically PS exposed on the membrane surface, radiolabeled Anx offers the advantage of being devoid of significant cardiac and cerebral uptake, thus allowing us to perform a comprehensive evaluation of the disease in a single scan. Clinical translation of Anx imaging is therefore strongly desirable, and the present study supports its assessment in diseases such as myocarditis or endocarditis. However, these settings are relatively rare, and further validation in conditions affecting larger populations is required. Hence, a large body of preclinical data supports the potential clinical usefulness of radiolabeled Anx to target apoptosis in monitoring the response to therapy in cancer<sup>1</sup> and rheumatoid and other autoimmune diseases.<sup>29,30</sup> In the setting of atherothrombosis, Anx uptake may be regarded as a marker of plaque vulnerability by targeting both apoptotic cells (such as macrophages and smooth muscle



**Figure 6.** Comparison of uptake ratios between <sup>99m</sup>Tc–Anx A5-128 and <sup>99m</sup>Tc–HYNIC-Anx in infective endocarditis models (n = 6 in each group). The results are presented as box plots for SPECT (A) and autoradiography (B) and show no significant difference between tracers.

?

Validation of 99m Tc-Labeled Anx A5-128

cells) and activated platelets as key components of intraluminal thrombus.<sup>31</sup>

### Conclusions

The present study showed that Anx A5-128 was comparable to HYNIC-Anx with regard to biodistribution and diagnostic ability in a model of apoptosis (myocarditis) and in a model of platelet activation (endocarditis) in rats. Blood clearance of Anx A5-128 is more rapid than that of HYNIC-Anx, but without a significant impact on contrast of images. This study suggests that the new variant Anx A5-128 may represent an attractive alternative to HYNIC-Anx and supports the clinical translation of radiolabeled Anx A5-128 imaging.

### Acknowledgments

We would like to thank Atreus Pharmaceuticals and Advanced Accelerator Applications for supplying the Anx A5-128 labeling kits and the National Cancer Institute BRB Preclinical Repository for supplying the HYNIC-Anx labeling kits.

Financial disclosure of authors: Donato Barbato is an employee of Advanced Accelerator Applications.

Financial disclosure of reviewers: None reported.

#### References

- Boersma HH, Kietselaer BL, Stolk LM, et al. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. J Nucl Med 2005;46:2035–50.
- Rouzet F, Sarda-Mantel L, Michel JB, Le Guludec D. Molecular imaging of platelet activation in thrombus. J Nucl Cardiol 2009;16: 277–86, doi:10.1007/s12350-009-9053-5.
- Kemerink GJ, Liu X, Kieffer D, et al. Safety, biodistribution, and dosimetry of 99mTc-HYNIC-annexin V, a novel human recombinant annexin V for human application. J Nucl Med 2003;44:947–52.
- van de Wiele C, Lahorte C, Vermeersch H, et al. Quantitative tumor apoptosis imaging using technetium-99m-HYNIC annexin V single photon emission computed tomography. J Clin Oncol 2003;21:3483–7, doi:10.1200/JCO.2003.12.096.
- Kartachova M, Haas RL, Olmos RA, et al. In vivo imaging of apoptosis by 99mTc-Annexin V scintigraphy: visual analysis in relation to treatment response. Radiother Oncol 2004;72:333–9, doi:10.1016/j.radonc.2004.07.008.
- Rottey S, Slegers G, Van Belle S, et al. Sequential 99mTchydrazinonicotinamide-annexin V imaging for predicting response to chemotherapy. J Nucl Med 2006;47:1813–8.
- Loose D, Vermeersch H, De Vos F, et al. Prognostic value of 99mTc-HYNIC annexin-V imaging in squamous cell carcinoma of the head and neck. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2008;35:47–52, doi:10.1007/s00259-007-0577-0.
- Hoebers FJ, Kartachova M, de Bois J, et al. 99mTc HYNIC-rh-Annexin V scintigraphy for in vivo imaging of apoptosis in patients with head and neck cancer treated with chemoradiotherapy. Eur J

Nucl Med Mol Imaging 2008;35:509-18, doi:10.1007/s00259-007-0624-x.

- Tait JF, Smith C, Levashova Z, et al. Improved detection of cell death in vivo with annexin V radiolabeled by site-specific methods. J Nucl Med 2006;47:1546–53.
- Tait JF, Brown DS, Gibson DF, et al. Development and characterization of annexin V mutants with endogenous chelation sites for (99m)Tc. Bioconjug Chem 2000;11:918–25, doi:<u>10.1021/</u> <u>bc000059v</u>.
- Huber R, Berendes R, Burger A, et al. Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins. J Mol Biol 1992;223:683–704, doi:10. 1016/0022-2836(92)90984-R.
- Tokita N, Hasegawa S, Maruyama K, et al. 99mTc-HYNICannexin V imaging to evaluate inflammation and apoptosis in rats with autoimmune myocarditis. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2003; 30:232–8, doi:<u>10.1007/s00259-002-1006-z</u>.
- Saraste A, Arola A, Vuorinen T, et al. Cardiomyocyte apoptosis in experimental coxsackievirus B3 myocarditis. Cardiovasc Pathol 2003;12:255–62, doi:10.1016/S1054-8807(03)00077-2.
- Peker C, Sarda-Mantel L, Loiseau P, et al. Imaging apoptosis with (99m)Tc-annexin-V in experimental subacute myocarditis. J Nucl Med 2004;45:1081–6.
- Arumugam S, Thandavarayan RA, Veeraveedu PT, et al. Modulation of endoplasmic reticulum stress and cardiomyocyte apoptosis by mulberry leaf diet in experimental autoimmune myocarditis rats. J Clin Biochem Nutr 2012;50:139–44, doi: 10.3164/jcbn.11-44.
- Arumugam S, Thandavarayan RA, Veeraveedu PT, et al. Beneficial effects of edaravone, a novel antioxidant, in rats with dilated cardiomyopathy. J Cell Mol Med 2012;16:2176–85, doi:10.1111/ j.1582-4934.2012.01526.x.
- Rouzet F, Dominguez Hernandez M, Hervatin F, et al. Technetium 99m-labeled annexin V scintigraphy of platelet activation in vegetations of experimental endocarditis. Circulation 2008;117: 781–9, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.718114.
- Augustin P, Alsalih G, Launey Y, et al. Predominant role of host proteases in myocardial damage associated with infectious endocarditis induced by Enterococcus faecalis in a rat model. Infect Immun 2013;81:1721–9, doi:10.1128/IAL00775-12.
- Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M, et al. A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. Clin Immunol Immunopathol 1990; 57:250–62, doi:10.1016/0090-1229(90)90039-S.
- Shiverick KT, Thomas LL, Alpert NR. Purification of cardiac myosin. Application to hypertrophied myocardium. Biochim Biophys Acta 1975;393:124–33, doi:<u>10.1016/0005-2795(75)90222-6</u>.
- Watanabe K, Sukumaran V, Veeraveedu PT, et al. Regulation of inflammation and myocardial fibrosis in experimental autoimmune myocarditis. Inflamm Allergy Drug Targets 2011;10:218–25, doi:10.2174/187152811795564091.
- Sarda L, Colin P, Boccara F, et al. Myocarditis in patients with clinical presentation of myocardial infarction and normal coronary angiograms. J Am Coll Cardiol 2001;37:786–92, doi:10.1016/S0735-1097(00)01201-8.
- Tait JF, Smith C, Blankenberg FG. Structural requirements for in vivo detection of cell death with 99mTc-annexin V. J Nucl Med 2005;46:807–15.

10	Benali	et al	
24.	Ohtsuki K, Akashi K, Aoka Y, et al. Technetium-99m HYNIC- annexin V: a potential radiopharmaceutical for the in-vivo detection of apoptosis Fur L Nucl Med 1999-26:1251-8. doi:10	27.	Van Riet J, Hill EE, Gheysens O, et al. (18)F-FDG PET/CT for early detection of embolism and metastatic infection in patients with infective endocarditic. Fur L Nucl Med Mol Imaging 2010;37:1189-
25.	1007/s002590050580. Habib G, Hoen B, Tornos P, et al. Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version	28.	97, doi:10.1007/s00259-010-1380-x. Vos FJ, Bleeker-Rovers CP, Sturm PD, et al. 18F-FDG PET/CT for detection of metastatic infection in gram-positive bacteremia.
	2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by the European Society of Clinical Microbiology	29.	J Nucl Med 2010;51:1234–40, doi:10.2967/jnumed.109.072371. Post AM, Katsikis PD, Tait JF, et al. Imaging cell death with radiolabeled annexin V in an experimental model of rheumatoid
26	and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer. Eur Heart J 2009; 30:2369–413, doi:10.1093/eurheartj/ehp285. Moon H. Park HE. Kang L et al. Noninvasive assessment of	30.	arthritis. J Nucl Med 2002;43:1359–65. Wunder A, Schellenberger E, Mahmood U, et al. Methotrexate- induced accumulation of fluorescent annexin V in collagen- induced arthritis. Mol Imaging 2005;4:1–6
201	myocardial inflammation by cardiovascular magnetic resonance in a rat model of experimental autoimmune myocarditis. Cir- culation 2012;125:2603–12, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.	31.	Zhao Y, Zhao S, Kuge Y, et al. Attenuation of apoptosis by telmisartan in atherosclerotic plaques of apolipoprotein E-/- mice: evaluation using technetium 99mTc-annexin A5. Mol Imaging 2012;13:200. 0

La valeur diagnostique des deux formes est comparable. Cependant, il n'y a pas de diminution des captations non spécifiques pour l'annexine V-128. En effet il n'existe pas de différence statistiquement significative au niveau des captations rénale et hépatique des deux traceurs. Pour une utilisation en TEP, Li et coll. ont marqué l'annexin V-128 au fluor 18 en utilisant le réactif de marquage (N-[4-[(4-[18F]fluorobenzylidene)aminooxy]butyl]maleimide) (<sup>18</sup>F-FBABM) sans perte d'affinité pour la cible. Aucun essai *in vivo* n'a cependant été effectué. [238]

Notre étude a démontré par ailleurs que la clairance sanguine est plus rapide pour l'annexine V-128 ce qui constitue un avantage pour le traceur dans l'imagerie précoce, en particulier dans les applications cardiaques et vasculaires. Ceci pourrait cependant constituer une limite pour la diffusion efficace dans les sites tumoraux qui nécessite souvent un temps de séjour plus lent au niveau sanguin. C'est ce qui s'est produit par exemple avec le dérivé Cys-Annexine A5 qui a été marqué au gallium 68 avec une synthèse chimique multiétapes lente et nécessitant plusieurs étapes de purification. Le radiomarquage s'est fait par couplage au <sup>68</sup>Ga-maléimide dont le marquage se fait au préalable. La molécule testée chez un modèle de souris immunodéprimée greffée de cellules dérivées de lymphome de Burkitt a montré une clairance sanguine rapide avec une forte fixation au niveau rénal. La fixation tumorale chez les souris avant traitement chimiotoxique et avant radiothérapie était minime et la délimitation de la tumeur impossible par imagerie TEP. Ce signal a augmenté après traitement, mais seule une analyse concomitante TEP/IRM a permis de délimiter les tumeurs. [239]

Malgré la haute affinité de l'annexine pour la PS, les résultats peu prometteurs voire limités obtenus en imagerie TEP jusqu'ici, les chimies de marquages lentes, assez complexes et

coûteuses, les fixations non spécifiques très prononcées et la possible immunogénicité des protéines nous ont fait opté pour l'essai de développement d'un vecteur peptidique pour l'imagerie TEP de la PS.

# 4.2.2.2. <sup>68</sup>Ga-P04087

Afin de développer un traceur peptidique de PS pour l'imagerie TEP, nous nous sommes intéressés aux peptides isolés par technique de phage display par Burtea et coll. [160] :

Peptide	Séquence peptidique	CI <sub>50</sub> (M)
R824	PGDLSR	1,33. 10 <sup>-8</sup>
R825	DAHSFS	8,16.10 <sup>-7</sup>
R826	LIKKPF	1,48.10 <sup>-8</sup>

L'affinité a été déterminée par compétition de ces peptides avec l'annexine V.

La société GUERBET a entrepris dans le cadre du projet IMOVA ou Imagerie MOléculaire Vasculaire de l'Athérothrombose (c'est un projet translationnel d'imagerie dont l'objectif est de développer et valider **jusqu'à chez l'Homme en phase 0** de nouveaux **produits d'imagerie moléculaire** (PIM) de **l'athérothrombose** en associant les complémentarités des **différentes techniques d'imagerie** IRM, SPECT et TEP), des études de stabilité de ces peptides vis-à-vis de la dégradation protéolytique (études Guerbet, DR-11-00882-RAP; Guerbet, DR-12-00563-RAP; Guerbet, DR-12-00580-RAP).

Nous avons utilisé le peptide retenu sur la base des données de stabilité et d'affinité pour la PS pour la synthèse du vecteur pour l'imagerie TEP. Un bras espaceur (□-alanine) a été ajouté au niveau de l'extrémité N-terminale du peptide sélectionné et a servi à la conjugaison au chélateur de gallium, NODAGA. Le composé ainsi obtenu est le P04087. Après complexation du gallium, l'affinité du composé Ga-P04087 a été évaluée par ELISA en compétition avec l'annexine V. L'ensemble de ces opérations a été effectué par Alexandre Guez de l'Université Pierre et Marie-Curie. La suite du travail de mise au point de marquage au gallium 68, gallium 67 et de caractérisation du produit *in vitro* et *in vivo* a été effectué à Bichat Claude Bernard.

L'ensemble de ces travaux est décrit au niveau de l'article suivant, soumis à la revue « EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry » (Manuscript number: ERPC-D-16-00014)

# <u>Article 5</u>: Synthesis, gallium labelling and characterization of P04087 (en révision)

Synthesis, gallium labelling and characterization of P04087, a functionalized phosphatidylserine-binding peptide. *EJNMMI Radiopharm. Chem.* 

# R. B. Azzouna, A. Guez, K. Benali, F. Al Shoukr, W. Gonzalez, P. Karoyan F, Rouzet, and

# D. Le Guludec.

EJNMN Synthesis, gallium labe ph	Il Radiopharmacy and Chemistry Iling and characterization of P04087, a functionalized osphatidylserine-binding peptide Manuscript Draft
Manuscript Number:	ERPC-D-16-00014
Full Title:	Synthesis, gallium labelling and characterization of P04087, a functionalized phosphatidylserine-binding peptide
Article Type:	Research
Funding Information:	
Abstract:	Background: Radiolabeled phosphatidylserine (PS)-binding peptides represent an innovative strategy for molecular imaging of apoptosis and thrombus. The hexapeptide PGDLSR was described as a selective and high affinity ligand for PS. In this work, we synthesized and evaluated a gallium labelled-PGDLSR as a potential specific radiopharmaceutical for nuclear imaging. PGDLSR-β-alanine-NODAGA (P04087) was prepared using Fmoc-based synthesis and then chelated to cold gallium, 68Ga and 67Ga. The affinity of Ga-P04087 for PS was evaluated by a competitive binding assay using biotinylated AnnexinV. The in vitro stability of the radiotracer was checked at room temperature and after incubation in human serum at 37°C with and without a metalloprotease inhibitor. The in vivo binding of 67Ga-P04087 to phosphatidylserine was evaluated in a rat model of infective endocarditis. Results: PGDLSR was successfully prepared with a yield of 31%. P04087 was obtained with a yield of 28% and in high chemical purity (>95%). The radiochemical purities of 67Ga-P04087 were in the same order of magnitude (10-7M). The radiolabelled product was stable 24h at room temperature, but was very rapidly degraded in human serum in the absence of a protease inhibitor which had a stabilizing effect. No focal uptake could be detected visually in the cardiac area on SPECT images. On autoradiography however, a focal uptake of 67Ga-P04087 in the valve area was present and histological slices demonstrated localization of peptide binding at the peripheral layer of vegetations. Conclusion: Although the preservation of the peptide affinity to the PS after its conjugation to the NODAGA chelator, and the presence of 67Ga-P04087 uptake on autoradiography, the absence of detectable foci in vivo in the valve area may be attributed to both the low intensity of the signal and the presence of background activity originating from blood pool and surrounding tissues in the living animals. Further modifications are necessary to design a radiolabeled peptide with higher bin
Corresponding Author:	Rana BEN AZZOUNA Bichat Claude Bernard University Hospital Paris, FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Bichat Claude Bernard University Hospital
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Rana BEN AZZOUNA
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Rana BEN AZZOUNA
	Alexandre GUEZ
	Khadija BENALI
	Faisal AL-SHOUKR
	Walter GONZALEZ
	Philippe KAROYAN
Powered by Editorial M	anager® and Hoot Xion Manager® from Aries Systems Corporation

	Dominique LE GULUDEC
Order of Authors Secondary Information:	
uggested Reviewers:	
apposed Paviawars	
Devices of the Edites of the	Janagar and Brady Vian Managar A from Avias Custom - Computing
Powerea by Ealtorial M	ianagei 🛛 anu Frouuzion manager® from Aries Systems Corporation

T

Manuscript	Click here to download Manuscript Manuscript-P04087
Click here to	view linked References
1	<u>Title Page</u>
2 3 4	Title:
5 6 7 8 9	Synthesis, gallium labelling and characterization of P04087, a functionalized phosphatidylserine-binding peptide
10 11 12	Authors:
13 14 15 16 17	Rana Ben Azzouna <sup>a,b,c*</sup> , Alexandre Guez <sup>d</sup> , Khadija Benali <sup>a,b,c</sup> , Faisal Al-Shoukr <sup>a,b,c</sup> , Walter Gonzalez <sup>e</sup> , Philippe Karoyan <sup>d</sup> , François Rouzet <sup>a,b,c</sup> and Dominique Le Guludec <sup>a,b,c</sup>
18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37	<ul> <li><sup>a</sup> Nuclear Medicine Department and DHU FIRE, Bichat-Claude Bernard University Hospital, AP-HP, Paris, France</li> <li><sup>b</sup> UMR 1148 Inserm, Paris, France</li> <li><sup>c</sup> Fédération de Recherche en Imagerie Multimodale, Paris 7 University, Paris, France</li> <li><sup>d</sup> Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, Ecole Normale Supérieure, CNRS, Laboratoire des Biomolécules, Paris, France.</li> <li><sup>e</sup> Guerbet, Research Center, Aulnay-sous-Bois, France</li> </ul>
38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51	
52 53 54 55 56 57 58 59 60 61	* Correspondence : rana.benazzouna@gmail.com
62 63 64 65	1

### Abstract

Background: Radiolabeled phosphatidylserine (PS)-binding peptides represent an innovative strategy for molecular imaging of apoptosis and thrombus. The hexapeptide PGDLSR was described as a selective and high affinity ligand for PS. In this work, we synthesized and evaluated a gallium labelled-PGDLSR as a potential specific radiopharmaceutical for nuclear imaging. PGDLSR-β-alanine-NODAGA (P04087) was prepared using Fmoc-based synthesis and then chelated to cold gallium, <sup>68</sup>Ga and <sup>67</sup>Ga. The affinity of Ga-P04087 for PS was evaluated by a competitive binding assay using biotinylated AnnexinV. The *in vitro* stability of the radiotracer was checked at room temperature and after incubation in human serum at 37°C with and without a metalloprotease inhibitor. The in vivo binding of <sup>67</sup>Ga-P04087 to phosphatidylserine was evaluated in a rat model of infective endocarditis. Results: PGDLSR was successfully prepared with a yield of 31%. P04087 was obtained with a yield of 28% and in high chemical purity (>95%). The radiochemical purities of <sup>67</sup>Ga-P04087 and <sup>68</sup>Ga-P04087 exceed 98% in all cases. IC50 of P04087 and Ga-P04087 were in the same order of magnitude (10<sup>-7</sup>M). The radiolabelled product was stable 24h at room temperature, but was very rapidly degraded in human serum in the absence of a protease inhibitor which had a stabilizing effect. No focal uptake could be detected visually in the cardiac area on SPECT images. On autoradiography however, a focal uptake of <sup>67</sup>Ga-P04087 in the valve area was present and histological slices demonstrated localization of peptide binding at the peripheral layer of vegetations. Conclusion: Although the preservation of the peptide affinity to the PS after its conjugation to the NODAGA chelator, and the presence of <sup>7</sup>Ga-P04087 uptake on autoradiography, the absence of detectable foci in vivo in the valve area may be attributed to both the low intensity of the signal and the presence of background activity originating from blood pool and surrounding tissues in the living animals. Further modifications are necessary to design a radiolabeled peptide with higher binding potencies to PS while possessing enhanced metabolic stability in vivo.

### **Keywords:**

Phosphatidylserine; peptide; NODAGA; gallium; PGDLSR; infective endocarditis

# Background

1

10

11

16

17

The plasma membrane (PM) of a healthy cell generally exhibits an asymmetric distribution of its major phospholipids. Typically, the inner PM leaflet contains essentially all phosphatidylserine (PS), most phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylinositol (PI), with sphingomyelin (SM) largely confined to the outer leaflet, and phosphatidylcholine (PC) distributed equally between both leaflets. (van Meer 1993); (Martin et al. 1995)

Apoptosis induces redistribution of membrane phospholipids of the cell. In fact, apoptosis, is accompanied by changes in PS distribution at the PM (Martin et al. 1995). PS, usually constitutive of inner leaflet of the membrane is then exposed on the outer leaflet. PS exposure is widely considered as an early marker of apoptotic cell death. (Galluzzi et al. 2012), (Kroemer et al. 2009)

- The PS externalization precedes several other events (loss of membrane integrity...) normally associated with this mode of cell death (Martin et al. 1995). This phenomenon allows the recognition of apoptotic cells by macrophages and their phagocytosis.
- Furthermore, in erythrocytes and platelets, PS is normally restricted to the inner leaflet of the bilayer. When platelets are activated or erythrocytes are loaded with Ca<sup>2+</sup>, PS moves transversely across the bilayer to the outer leaflet of the plasma membrane, generating an active surface for assembly of the coagulation factors Va and Xa into the prothrombinase complex (Verhoven et al. 1995). PS exposure occurs also in T-cell activation, without cell death (Kroemer et al. 2009).
- PS is accessible to a potential ligand only during the apoptotic process, platelet or T-cell activations (Rouzet et al. 2009), providing an abundant molecular target for the detection of cellular injury.
- Several ligands were developed as molecular imaging agents of PS. Annexin V, the endogenous ligand of PS (Andree et al. 1990) has been successfully evaluated as a molecular imaging agent of apoptotic cells (Blankenberg et al. 1998) and thrombus (Sarda-Mantel et al. 2006), with many potential clinical applications in oncology, cardiovascular diseases, and rheumatology. (Boersma et al. 2005)
- Annexin V and all protein-ligands (such as synaptotagamin I that binds to phospholipids in cell membranes (Jung et al. 2004)) have however many drawbacks: the cost of production, their antigenicity, and the restrained diffusion to the targeted sites due to their larger size. (Burtea et al. 2009). Moreover, the high liver and kidney uptake levels of Annexin V lead to low target-to-background ratios. (Wuest et al. 2015)
- In order to overcome these disadvantages, peptide based approaches represent a promising 42 43 alternative. Indeed, peptides, mimicking protein secondary structures, can bind with high 44 affinity to proteins. As a result, they can serve as agonists, antagonists and allosterics 45 modulators for many receptors and they also have a lower toxicity than small molecules. 46 (Craik et al. 2013), (Bhat et al. 2015), (Tsomaia 2015). Their major drawbacks remain the 47 poor overall properties regarding metabolic stability, oral bioavailability, membrane 48 49 permeability and conformational stability, limiting their selectivity with the target. 50

Nevertheless, they have an affordable synthesis and can incorporate a wide variety of functional groups. A new generation of therapeutics peptides has emerged, increasing their conformational stability and their pharmacokinetics properties. (Wójcik and Berlicki 2016)

- With this aim, Burtea et al. provided as a valuable alternative to protein-ligands, PS-specific peptides identified by phage display technology and that bind targets with high affinity and specificity: R824 (PGDLSR,  $IC_{50}=1.33\times10^{-8}M$ ), R825 (DAHSFS,  $IC_{50}=8.16\times10^{-7}M$ ) and R826 (LIKKPF,  $IC_{50}=1.48\times10^{-8}M$ ). (Burtea et al. 2009)
- 58 59 60 61 62

51

52 53

54 55

56

57

- 62 63
- 64 65

?????

Thus, if labelled with a suitable radioisotope, these peptides might provide a convenient imaging tool. The <sup>68</sup>Ga has a very favourable positron emission (1880 keV, 90%) for PET imaging, and a short half-life (68 min) suitably matched for imaging with peptide vectors. (Price and Orvig 2014). The availability of <sup>68</sup>Ga from a <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator (<sup>68</sup>Ge t<sub>1/2</sub> = 270 days) allows hospitals economical access to a PET isotope without expensive cyclotron facilities. (Ma et al. 2016)

Herein, after the Fmoc synthesis, the stability study of the three peptides and the selection of the most suitable, we describe the conjugation of the selected peptide with a metal chelator, the characterization of the functionalized peptide and its radiolabelling with <sup>68</sup>Ga and with <sup>67</sup>Ga, a longer-lived isotope of gallium which can be a more suitable tool for preclinical investigations when developing a new Ga-radiotracer.

# Methods

### Synthesis of R824 (PGDLSR), R825 (DAHSFS) and R826 (LIKKPF)

Loading of the first amino acid on 2-chlorotrityl resin

Fmoc-protected amino acids were obtained from commercial suppliers (Senn Chemicals, Iris Biotech GmbH, Fluka, and Novabiochem). The first Fmoc-protected amino acid was loaded on the 2-Cl-trityl resin (Iris Biotech GmbH).

A solution of the Fmoc-Amino Acids (0.3-1.2 eq. relative to the resin, depending on the final loading expected) and Diisopropylethylamine (DIPEA) (4 eq. relative to the Fmoc-amino acid) in dichloromethane (DCM) (10 mL per gram of resin) is added to the DCM-swollen resin. The suspension is shaken at room temperature for 2 hours, then washed with a mixture of DCM, methanol (MeOH) and DIPEA (17:2:1, 3x), DCM (3x), dimethylformamide (DMF) (3x), MeOH (3x), and dried in vacuo.

Synthesis was performed on a 0.25 mmol scale.

### Peptide coupling

The resin-linked peptide is swollen with N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) and then treated with a solution containing the Fmoc-protected amino acid (5 eq.), O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) (5 eq.), N-hydroxybenzotriazole (HOBt) (5 eq.) and DIPEA (10 eq.) in NMP (10 mL per gram of resin). The suspension is shaken for 30 minutes to overnight depending on the amino acid.

For removal of the N-terminal Fmoc groups, the resin is treated first with a 20% solution of piperidine in NMP for 3 minutes and subsequently with a 20% solution of piperidine in NMP for 15 minutes. Finally, the resin is washed with NMP.

The completion of the reaction is monitored by a Kaiser test (Kaiser et al. 1970)

Simultaneous cleavage and deprotection of peptide

The resin is treated with a mixture of trifluoroacetic acid (TFA)-H<sub>2</sub>O- triisopropylsilane (TIS), 95:2.5:2.5 and shaken at room temperature for 2 hours. After removal of the volatile compounds under reduced pressure, the fully deprotected peptide is precipitated by addition of pre-cooled diethyl ether (Et<sub>2</sub>O) and centrifuged for 5 minutes at 6000 rpm. The ether is decanted and the same operation repeated twice. The crude product is lyophilized and finally purified by preparative RP-HPLC using a C18 column. Purity was determined by analytical RP-HPLC on linear gradient 5 to 35% of CH<sub>3</sub>CN (0.1% TFA) in H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) in 30 minutes.

Quality control of the prepared peptides Peptides were characterized by MALDI-TOF Mass Spectrometry (DE-Pro, PerSeptive Biosystems) in positive ion reflector mode using the matrix  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid. The m/z of the protonated molecule (first isotope) are given as theoretical (calculated), experimental (found).

### Selection of the peptide-candidate to be developed as a nuclear contrast agent

A 100 $\mu$ L solutions of R824 (PGDLSR), R825 (DAHSFS) and R826 (LIKKPF) in Hank's medium and 10% FCS (foetal calf serum) were prepared and incubated (in triplicate) during 2 hours at 37°C and away from light. At 0, 1 hour and 2 hours, 100  $\mu$ L were sampled from each tube; 200  $\mu$ L of 0.6M trichloroacetic acid were added. The mixtures were then centrifuged at 20000g for 10 minutes at 4°C. One microliter of each supernatant was then analyzed by LC/ES/MS.

### Synthesis of P04087

 R824-β-alanine was firstly prepared as described above. Coupling of NODAGA is performed with only 3 equivalents of HBTU, HOBt and 6 equivalents of DIPEA as detailed in Figure 1.

### Synthesis of cold gallium-P04087

P04087 was chelated with cold gallium as described in Figure 2.

Gallium(III)chloride (natGa) was purchased from Sigma-Aldrich.

P04087 peptide (18 mg, 14  $\mu$ M) in 2 mL of an acetic acid and sodium acetate buffer (pH = 5.0) was incubated with 31  $\mu$ L of a gallium(III)chloride 0.5 M solution (1.1 eq.), for 15 min at room temperature. Following this incubation period, the sample was directly injected into a q-TOF mass spectrometer.

The quantification of the labeling was determined by calculating the relative peak height of the molecular masses corresponding to the chelated and unchelated peptide.

The purification unit consisted of a Sep-Pak C18 cartridge (Waters, 1 g C18). The C18 was conditioned with 1 mL of absolute ethanol followed by 3 mL deionized water. An aliquot was taken and analyzed by RP-HPLC. The reaction mixture was transferred to the cartridge. After adsorption, 2.5 mL of deionized water was eluted dropwise through the C18 using a syringe. The eluent obtained were pooled and lyophilized for storage and later use.

### Affinity study

The affinity of cold labelled peptide for phosphatidylserine was evaluated by enzymelinked immunosorbent assay.

A competitive binding assay procedure was performed: A 96-well plate (MICROLON plaque 200, med. Binding, F-bottom, GREINER) was coated with 200  $\mu$ L/well of phosphatidylserine (PS) (Avanti Polar Lipids) (dissolved in ethanol (SIGMA ALDRICH) for a final concentration of 100  $\mu$ g/mL). The lipids were dried overnight at room temperature under a ventilation hood, and the plate was washed three times with Ca<sup>2+</sup>-Tween-20 0,05 buffer (10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05% Tween-20) to remove any nonbinding lipids. Next, Blocking Solution (300  $\mu$ L) (Protein-Free (TBS) Blocking Buffer from Thermo Fisher Scientific) was added to each well, and the plates were incubated at room temperature for 1 h on a shaker to block nonspecific binding. Wells were washed with Washing Buffer for 5

?

minutes (twice). Serial dilutions of peptides (from 0.01 nM to 1  $\mu$ M) in Ca<sup>2+</sup> Buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) were incubated at 37 °C for 30 minutes with PS immobilized on microtiter plates. The competitor (biotinylated AnnV: Annexin V-Biotin Reagent from CLINISCIENCES) was then added at a concentration equal to its Kd for PS (5×10<sup>-10</sup> M) and incubated 1 h 30. After rinsing with Ca<sup>2+</sup> buffer, the binding between AnnV-Bt and the target was detected by adding the ABC Standard Peroxidase Staining Kit (Thermo Fisher Scientific) (200  $\mu$ L) over one hour at room temperature. The staining reaction was developed with 200  $\mu$ L/well of ABTS (22 mg ABTS (SIGMA ALDRICH) in 100 mL of 50 mM sodium citrate, pH 4.0 completed with 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (SIGMA ALDRICH). OD405 values were measured using a microplate reader StatFax-2100.

### Radiolabelling with gallium 68

 The <sup>68</sup>Ga was available from a chemical grade <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator system (Cyclotron Co.,Ltd, Obninsk, Russia) where <sup>68</sup>Ge was attached to a column of an inorganic matrix based on titanium dioxide. The pre-treatment of the chemical grade eluate is necessary before the labelling operation. Thus, a synthesizer is needed.

An automated radiolabelling of P04087 with <sup>68</sup>Ga was performed with Fastlab synthesizer (GE Healthcare) using an approach combining the fractioned elution and anionic purification eluate with a Chromafix 30-PS-HCO3 resin (Macharey-Nagel), which was validated by Velikyan et al. (Velikyan et al. 2004).

The generator was eluted by 0.1M HCl solution (sigma-aldrish). The middle fraction was collected and mixed with high concentrated HCl solution (30%, Merck). The obtained gallium chloride was then loaded in the anion exchange resin. The elution of the purified gallium was performed with ultrapure water (500 $\mu$ L) to reactor which contains 65  $\mu$ L of a 1mg/mL P04087 solution in ultrapure water (TraceSELECT, Fluka) mixed with 0.4 M sodium acetate Eur. Phar. buffer, pH 4.6.

The preparation was incubated 5 minutes at room temperature, diluted with saline and then analysed by radio-HPLC without further purification.

The radiochemical purity was determined by HPLC system from Dionex (DIONEX UltiMate 3000) consisting of HPLC pump, quaternary gradient unit, LPG-3400 SD DIONEX; autosampler, WPS-3000 SL DIONEX ; multiwavelength detector, DAD-3000 DIONEX; column oven, TCC-3000 DIONEX and a radio detector, HERM LB 500 Berthold, Germany, coupled in series. Data acquisition and handling was performed using Chromeleon software, DIONEX.

The following HPLC conditions were used: ACE® column 100 Å C18 with the dimensions 150 mm  $\times$  4.6 mm, 3 µm particle size. We applied gradient elution with the following parameters: A) H2O, 0.1% TFA; B) acetonitrile, 0.1% TFA; with UV detection at 220 nm; flow was 1 mL/min; 0-2 min isocratic 5% B, 5-35% B linear gradient 20 min, 35-5% B linear gradient 2 min. Retention time (*t*R) for the radio-HPLC signal was 11.7 ±0.07 min.

### Radiolabelling with gallium 67

Radiolabelling with a longer-living isotope of gallium (i.e the gallium 67) is more convenient for the preclinical investigations in parallel to the design of a new  $^{68}$ Ga-vector.

### Preparation of [67Ga]-chloride from [67Ga]-Citrate

Gallium 67 chloride was prepared from citrate solution (iba molecular) following the method described by Vladimir Scasnar and Johan E. van Lier. The gallium citrate solution

was mixed with two third of its volume of ultrapure water (TraceSELECT®, Fluka Analytical. Sigma-Aldrich-Switzerland. The solution was then filtered manually over a 100 mg Sep-2 3 Pak® Vac 1cc (100mg) silica cartridges (Waters, Ireland) with a plastic syringe. The cartridge was washed two times with 5 mL ultrapure water to remove citrate ions. The retained 4 5 6 7 8 radioactivity was eluted from the cartridge with 1 mL of 0.1 M hydrochloric acid solution (BioXtra, Sigma-Aldrich, Germany) to yield a <sup>67</sup>GaCl<sub>3</sub> solution free from citrate ions that can be used for radiolabelling. (Scasnár and van Lier 1993). The radiochemical purity of the gallium chloride solution was tested by radio-thin layer 9 chromatography using ITLC-SG (PALL), mobile phase: (0.4M sodium acetate pH 4 which 10 was prepared using sodium acetate trihydrate BioUltra  $\geq$  99.5%, sigma-aldrich, Germany, 11 Water TraceSELECT<sup>®</sup>, Fluka Analytical. Sigma-Aldrich – Switzerland. pH was adjusted by 12 13 addition of acetic acid ≥99.99%, Sigma-Aldrich) 14Retention was expressed as % of trapped <sup>67</sup>Ga on the silica cartridge from the total <sup>67</sup>Ga-15 Citrate activity passed through the column. Desorption was expressed as % eluted <sup>67</sup>Ga of 16 total <sup>67</sup>Ga activity trapped on the column. 17 The recovery yield was expressed as % of eluted <sup>67</sup>Ga from the total <sup>67</sup>Ga-citrate solution 18 19 activity passed through the silica cartridge. 20 <sup>67</sup>Ga activity was counted with an ionization chamber (scintidose, LemerPax). 21 22 Radiolabelling of P04087 with gallium 67. 23 24 65 µL of 1mg/mL P04087 solution in 0.4M sodium acetate pH 4.6 were mixed with 25 26  $500\mu$ L of the same buffer (Eur. Pharmacopeia buffer) and the <sup>67</sup>GaCl<sub>3</sub> solution, prepared as 27 described above (activities from 143 to 264 MBq). The preparation was incubated 5 minutes 28 at room temperature. 29 The End of Synthesis (EOS) activity was measured by means of a calibrated radionuclide 30 activity meter (Scintidose, LemerPax). 31 32 33 34 Stability of the gallium radiotracer 35 The stability of the radiolabelled peptide was checked at room temperature 4 and 24 hours 36 after the end of radiolabelling by HPLC using the gradient described above. 37 38 The metabolic stability was checked in human serum at 37°C in presence and in absence of 39 1,10 phenanthroline monohydrate, a well-known metalloprotease inhibitor (Wijayanti et al. 40 2006) at appropriate periods of time (0, 15, 30, 60 min). 41 In two different tubes containing 200µL of human serum plasma previously incubated at 37°C 42 was added 40µL of <sup>67</sup>Ga-P04087 labelling solution. 4µL of 1mg/mL of 1,10 phenanthroline 43 44 monohydrate in ethanol was added only in one of the two tubes. 45 At 0, 15, 30 and 60 minutes, 20µL aliquots were collected and proteins were precipitated with 46 200µL of methanol. Samples were then filtered with 0.2µm Whatman filter (13 mm) and the 47 methanol was then evaporated with a stream of nitrogen. 48 49 The resulting dry residue is dissolved in 200 µL water and then analyzed by C18-radio-HPLC 50 using the equipment mentioned above. 51 52 In vivo binding to phosphatidylserine 53 54 We evaluated the in vivo binding of 67Ga-P04087 to PS in a rat model of infective 55 endocarditis. This model was selected since we previously evidenced the high expression of 56 PS in valve vegetations in relation with platelets activation (Rouzet et al. 2008). The 57 58 procedures and animal care complied with the principles of animal care formulated by the 59 National Society for Medical Research. This study was conducted under authorization of the 60 61 62 63 7 64

French Direction of the Veterinary Services (No. 75-214) and the approval of the animal ethics committee of our Institution. Infective endocarditis was induced in males Wistar rats (Janvier, France) as described previously (Rouzet et al. 2008). In brief, a polyethylene catheter was inserted into the left ventricle through the right carotid artery in anesthetized rats (ketamine / xylazine). The catheter remained indwelling throughout the experiment to induce an aseptic thrombotic vegetation formation on aortic valves. Twenty-four hours after catheterization, rats underwent bacterial inoculation (10<sup>8</sup> colony forming units of Enterococcus faecalis JH2-2) by the left jugular vein under halothane anesthesia. Imaging was performed 4 days after bacterial inoculation. Animals were injected with 60 MBq of <sup>67</sup>Ga-P04087, and underwent whole body SPECT/CT 1 hour later (NanoSPECT/CT plus; Bioscan Inc.). Reconstructed images were assessed visually to determine the presence of a focal tracer uptake in the heart area and quantified using the ratio between myocardium to lung activity (uptake ratio).

After completion of imaging procedure, animals were euthanized with pentobarbital overdose. Tissue samples were frozen and cut into 20  $\mu$ m thickness sections, which were exposed in a digital beta imager (BetaIMAGER, Biospace Lab, Paris, France) for 8 hours. For histologic examination, tissue samples were fixed in buffered paraformaldehyde (4% v/v, 48 hours) to obtain better morphologic definition, embedded in paraffin and sectioned at 5  $\mu$ m thickness. Sections were stained with hematoxylin-eosin for morphologic analysis of cells and nuclei and with Alcian blue coupled with nuclear red to reveal areas of mucoid accumulation and their relation to cell.

# Results

 $\begin{array}{r} 49\\ 50\\ 51\\ 52\\ 53\\ 54\\ 55\\ 56\\ 57\\ 58\\ 60\\ 61\\ 62\\ 63\\ \end{array}$ 

### Synthesis of R824, R825 and R826 peptides

R824, R825 and R826 peptides were obtained as a white powder with a yield of 29-32% and in high chemical purity (>95%). Molecular mass were verified by mass spectrometry (Table 1).

Table 1. M	AS analysis	of R824.	R825 and	R826
Tuble 110	10 analy 515	01 110 - 1,	nono una	11040

Dontido	Saguanaa	Molecular mass		Durity (0/)	Viald (04)	
reptide	sequence	Calculated	found	Furny (70)	<b>1</b> leta (70)	
R826	LIKKPF	745.5	745.5	97	32	
R825	DAHSFS	662.4	662.3	98	29	
R824	PGDLSR	644.3	644.3	98	31	

### Stability study of R824, R825 and R826

Stability results of the three peptides are shown in Table 2

### Table 2. Stability study of R824, R825 and R826

Peptide	Sequence	Media	Temperature (°C)	Time of incubation (h)	Stability Result
R826	LIKKPF	Hanks + 10%FCS	37	2	Total degradation 1h after the start of incubation
R825	DAHSFS	Hanks + 10%FCS	37	2	Stable
R824	PGDLSR	Hanks + 10%FCS	37	2	Stable

While the R826 peptide is quickly degraded (1 h) in Hanks media supplied or not with fetal calf serum (FSC), R824 and R825 appear stable for two hours in the same conditions at a temperature of 37°C. The R824 hexapeptide was selected for further investigations in the design of a contrast agent suitable for nuclear imaging, because of its higher PS affinity compared to R825 (Burtea et al. 2009).

### Synthesis of R824-β-alanine-NODAGA (P04087)

R824 peptide (PGDLSR) was successfully prepared using the Fmoc-based synthesis (31% yield). The NODAGA chelator was conjugated to the peptide R824 *via* a spacer (beta-alanine) at the N-terminus. After purification, the NODAGA conjugated peptide (P04087) was obtained as a white powder with a yield of 28% and in high chemical purity (>95%). Molecular mass were verified by mass spectrometry

### Table 3.MS analysis of R824 and P04087 peptides

Compound	Pontido coquenço	Molecular mass		
Compound	repude sequence	Calculated	Found	
P04087	NODAGA-βAla-PGDLSR	1072.5	1072.4	

### Cold labeling of P04087 peptide with <sup>nat</sup>Gallium(III)chloride

Cold gallium labelling was successfully performed to provide Ga-P04087. HPLC chromatograms of P04087, Ga-P04087 and a mixture of the two compounds are given in the figure 3.

### Affinity study

The affinity of Ga-P04087 was evaluated by ELISA (Figure 4). The annexin V concentration was stable. Concentrations of tested compounds were increased from 0.01 nM to 1  $\mu$ M. The IC<sub>50</sub> of R824 and Ga-P04087 were in the same order of magnitude. Thus, the chemical modifications (the addition of a spacer and a chelator) don't alter the affinity of R824 to its target, i.e the PS.

### Radiolabelling

Preparation of [67]gallium chloride from [<sup>67</sup>Ga]-Citrate

Five preparations of gallium chloride were performed. Prior to each preparation, radiochemical purity of gallium citrate solution was controlled with ITLC-SG using 0.4M sodium acetate (pH 4) as mobile phase. A typical radiochromatogram is shown in figure 5.

The volume of citrate solution passed through the silica cartridge was from 0.84 to 3 mL and activities were from 131 to 517 MBq. The details of experiments are shown in Table 4.

<sup>67</sup> Ga- citrate volume (mL)	67Ga- Citrate activity (MBq)	67Ga activity trapped in silica cartridge (MBq)	Retention yield (%)	Eluted activity (MBq)	Desorption yield (%)	<sup>67</sup> GaCl <sub>3</sub> recovery yield (%)	RCP (%)
0.9	150.8	134.8	89.39	131.65	97.66	87.3	99.6
0.84	124	104.9	84.60	102.3	97.52	82.5	99.83
1	173.2	151.6	87.53	148.6	98.02	85.8	98.38
1	159.6	142.9	89.54	141.46	98.99	88.63	99.99
3	503.24	475.5	94.49	468.7	98.57	93.14	99.89
		Average±SD	89.11±3.61		98.15±0.62	87.47±3.90	99.54±0.66

Radiochemical purity, as determined by instant thin-layer chromatography (Figure 6), exceeded 99% in all cases; the obtained gallium chloride solutions can be used for radiolabelling

Radiolabelling of P04087

Results of radiolabelling of P04087 with gallium 68 are shown in Table 5.

### Table 5. Average results of three productions of <sup>68</sup>Ga-P04087 conjugated peptide

Parameter	Test method	Average ± SD
Radiochemical purity (%)	Radio-HPLC	99.53±0.81
pН	pH meter	4.37±0.32

Results of radiolabelling of P04087 with gallium 67 are shown in Table 6.

### Table 6. Average results of three productions of <sup>67</sup>Ga-P04087 conjugated peptide

Parameter	Test method	Average ± SD
Radiochemical purity (%)	Radio-HPLC	98.84±1.22
pH	pH paper	4.5±0

Radiochemical purities were checked by radio-HPLC. Typical radio-chromatograms are shown in figure 7

Stability of 67Ga-radiotracer

Radiochemical stability of the final radiolabelled product:

The radiochemical purity was checked at room temperature 24 hours after the end of the labeling and was 99.60  $\pm 0.35$  %, no radiolysis breakdown products was observed, highlighting the stability of the final radiolabelled <sup>67</sup>Ga-radiotracer.

# Stability in human serum:

The in vitro stability of the radiolabelled peptide was evaluated in human serum at  $37^{\circ}$ C. As shown in figure 8, without metalloprotease inhibitor, the radiolabelled peptide was quickly degraded. By contrast to the rapid degradation, the addition of a suitable amount of 1.10 phenanthroline monohydrate had a stabilizing effect (the 100% radiochemical purity remains stable throughout the study).

In vivo binding to phosphatidylserine

No focal uptake could be detected visually in the cardiac area on SPECT images. On autoradiography however, a focal uptake of <sup>67</sup>Ga-P04087 in the valve area was present (mean vegetation to remote myocardium ratio: 3.2). Comparative analysis of autoradiography and histological slices demonstrated localization of peptide binding (whatever the tracer) at the peripheral layer of vegetations (Figure 9), corresponding to the recruitment of activated platelets from the blood pool.

# Discussion

Our study describes the design of a peptide-based radiotracer labelled with Gallium isotopes that might represent a promising alternative to protein-based radiotracers, regarding their low toxicity, improved stability, low immunogenicity, affordable synthesis compared to protein production which is expensive (Burtea et al. 2009) and easy incorporation of a wide variety of functional groups. As drug candidate, peptides have also higher activity per mass than proteins. (Burtea et al. 2009).

- With this aim, the Fmoc synthesis of PGDLSR, its conjugation with a metal chelator (NODAGA), the evaluation of its affinity to the phosphatidylserine as a biomarker of apoptotic process and platelet activation, its radiolabelling with <sup>68</sup>Ga and with <sup>67</sup>Ga, the evaluation of its stability in human serum and the evaluation of the *in vivo* binding to PS are reported.
- The use of Fmoc-based synthesis and the conjugation approach described here lead to a conjugated peptide with high chemical purity and which can be labelled with gallium isotopes in high radiochemical purity.
- The affinity studies of our labelled conjugated peptide show that the adding of a spacer and a chelating group in the Peptide N-terminus side don't alter the affinity and binding of R824 to its target. This result is explained if we consider that the N-terminus amine function of the proline residue is not essential for PS-binding. To the best of our knowledge, proline residue was not described as a part of the peptide sequence which play a dominant role in the interaction with PS. (Igarashi et al. 1995). However, our peptide has a lower affinity compared to Annexin A5, another imaging agent targeting the PS.
  - Otherwise, the presence of <sup>67</sup>Ga-P04087 uptake on autoradiography in contrast to the rapid degradation observed in vitro without the metalloprotease inhibitor, point out the discrepancies that could occur between in vitro and in vivo degradation even when low tracer amounts are used in vitro in order to avoid saturation of enzymes (García-Garayoa et al. 2001). These positive autoradiography results extend the findings of histology experimentations on the binding of the agent to PS. However, comparatively to radiolabelled Annexin A5, the contrast was not sufficient to provide a detectable signal. This lack of signal on the SPECT/CT images could have multiple explanations: 1) <sup>99m</sup>Tc-AnnexinV has a stronger affinity to PS comparing to 67Ga-P04087 respectively 6\*10<sup>-9</sup> vs 1.33\* 10<sup>-8</sup> M. 2) the low intensity of the signal caused by the physical proprieties of 67Ga poorly adapted to the gamma camera. 3) The size of vegetations is small (These vegetations have been imaged successfully with other tracers: <sup>99m</sup>Tc-AnnexinV with a ratio of 1.3 for in vivo acquisitions and 2 for autoradiography (Rouzet et al. 2008) ; Annexin A5-128 with similar diagnostic sensitivity than Annexin V (Benali et al. 2014)). 4) <sup>67</sup>Ga-P04087 have a rapid renal elimination (visualization of a renal excretion on the acquisition image realized 5minutes after injection).
    - Since proteins have several disadvantages over peptides (higher manufacturing costs, higher potential immunogenicity, lower stability, lower activity per mass, worse tissue/organ penetration (Burtea et al. 2009), high liver and kidney uptake (Wuest et al. 2015)), the development of peptide-based radiotracers for imaging apoptosis *in vivo* remains an

interesting approach. If the affinity and the stability of peptide ligand are improved, it may be a successful PS-tracer.

# Conclusion

 A novel labelled peptide Ga-NODAGA- $\beta$ -alanine-PGDLSR (Ga-P04087) was synthesized and analysed in vitro and in vivo for its PS-binding properties. Despite of the preservation *invitro* of the peptide affinity to PS after chemical modifications and gallium labelling and although the presence of <sup>67</sup>Ga-P04087 uptake on autoradiography, the absence of detectable foci *in vivo* makes the peptide used in the present study not suitable as radiotracer for imaging of apoptosis *in vivo*.

Protein ligands have high affinity to PS but have many drawbacks. Therefore, development of peptide-based radiotracers for imaging apoptosis *in vivo* remains a significant challenge. Further studies are necessary to design and evaluate novel radiolabelled peptides with higher binding potencies to PS while possessing enhanced metabolic stability in vivo.

# Abbreviations

DCM: dichloromethane; DIPEA: Diisopropylethylamine; DMF: dimethylformamide; FSC: O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium fetal serum; HBTU: calf hexafluorophosphate; HOBt: N-hydroxybenzotriazole; MeOH: methanol; NMP: N-methylphosphatidylcholine; MS: 2-pyrrolidone; Mass spectrometry; PC: PE: phosphatidylethanolamine; PI: phosphatidylinositol; PM: plasma membrane; PS: Phosphatidylserine ; SM: sphingomyelin; TFA: Trifluoroacetic acid ; TIS: triisopropylsilane;

# Acknowledgments

This study was granted by BPI through IMOVA project.

# **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

# Authors' contributions

**RBA** carried out and designed radiochemistry, stability studies, helped to the *in vivo* studies and drafted the manuscript. **AG** carried out the synthesis of the peptides, the cold chelation with gallium, and the affinity studies and helped to draft the manuscript. **KBA** carried out the imaging studies, autoradiography and helped to draft the manuscript. **FAS** designed <sup>67</sup>Ga radiochemistry, designed and carried out stability studies and helped to draft manuscript. **WG** participated in design of the study. **PK**, **FR** and **DLG** conceived of the study and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

# References

Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. J. Biol. Chem. 1990 Mar 25;265(9):4923–8.

1 2 3	Benali K, Louedec L, Azzouna RB, Merceron O, Nassar P, Al Shoukr F, et al. Preclinical validation of 99mTc-annexin A5-128 in experimental autoimmune myocarditis and infective endocarditis: comparison with 99mTc-HYNIC-annexin A5. Mol. Imaging. 2014;13:1–10.
4 5 6	Bhat A, Roberts LR, Dwyer JJ. Lead discovery and optimization strategies for peptide macrocycles. Eur. J. Med. Chem. 2015 Apr 13;94:471–9.
7 8 9 10 11	Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF, Davis RE, Naumovski L, Ohtsuki K, et al. In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1998 May 26;95(11):6349–54.
12 13 14 15	Boersma HH, Kietselaer BLJH, Stolk LML, Bennaghmouch A, Hofstra L, Narula J, et al. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med. 2005 Dec;46(12):2035–50.
17 18 19 20	Burtea C, Laurent S, Lancelot E, Ballet S, Murariu O, Rousseaux O, et al. Peptidic targeting of phosphatidylserine for the MRI detection of apoptosis in atherosclerotic plaques. Mol. Pharm. 2009 Dec;6(6):1903–19.
21 22 23 24	Craik DJ, Fairlie DP, Liras S, Price D. The future of peptide-based drugs. Chem. Biol. Drug Des. 2013 Jan;81(1):136–47.
25 26 27 28 29	Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Cell Death Differ. 2012 Jan;19(1):107–20.
30 31 32 33	García-Garayoa E, Allemann-Tannahill L, Bläuenstein P, Willmann M, Carrel-Rémy N, Tourwé D, et al. In vitro and in vivo evaluation of new radiolabeled neurotensin(8-13) analogues with high affinity for NT1 receptors. Nucl. Med. Biol. 2001 Jan;28(1):75–84.
34 35 36 37 38 39	Igarashi K, Kaneda M, Yamaji A, Saido TC, Kikkawa U, Ono Y, et al. A novel phosphatidylserine-binding peptide motif defined by an anti-idiotypic monoclonal antibody. Localization of phosphatidylserine-specific binding sites on protein kinase C and phosphatidylserine decarboxylase. J. Biol. Chem. 1995 Dec 8;270(49):29075–8.
40 41 42 43	Jung H-I, Kettunen MI, Davletov B, Brindle KM. Detection of apoptosis using the C2A domain of synaptotagmin I. Bioconjug. Chem. 2004 Oct;15(5):983–7.
44 45 46	Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook PI. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. Anal. Biochem. 1970 Apr;34(2):595–8.
47 48 49 50 51	Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ. 2009 Jan;16(1):3–11.
52 53 54 55 56 57	Ma MT, Cullinane C, Imberti C, Baguña Torres J, Terry SYA, Roselt P, et al. New Tris(hydroxypyridinone) Bifunctional Chelators Containing Isothiocyanate Groups Provide a Versatile Platform for Rapid One-Step Labeling and PET Imaging with 68Ga3+. Bioconjug. Chem. 2016 Feb 17;27(2):309–18.
58 59 60 61	Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis
62 63 64 65	13

regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. J. Exp. Med. 1995 Nov 1;182(5):1545-56. van Meer G. Transport and sorting of membrane lipids. Curr. Opin. Cell Biol. 1993 Aug;5(4):661-73. 7 8 Price EW, Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. Chem. Soc. Rev. 2014;43(1):260-90. Rouzet F. Dominguez Hernandez M, Hervatin F, Sarda-Mantel L, Lefort A, Duval X, et al. Technetium 99m-labeled annexin V scintigraphy of platelet activation in vegetations of 13 experimental endocarditis. Circulation. 2008 Feb 12;117(6):781-9. Rouzet F, Sarda-Mantel L, Michel J-B, Le Guludec D. Molecular imaging of platelet 17 activation in thrombus. J. Nucl. Cardiol. Off. Publ. Am. Soc. Nucl. Cardiol. 2009 Apr;16(2):277-86. Sarda-Mantel L, Coutard M, Rouzet F, Raguin O, Vrigneaud J-M, Hervatin F, et al. 99mTc-22 23 annexin-V functional imaging of luminal thrombus activity in abdominal aortic aneurysms. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2006 Sep;26(9):2153-9. Scasnár V, van Lier JE. The use of SEP-PAK SI cartridges for the preparation of gallium chloride from the citrate solution. Eur. J. Nucl. Med. 1993 Mar;20(3):273. 27 28 Tsomaia N. Peptide therapeutics: targeting the undruggable space. Eur. J. Med. Chem. 2015 Apr 13:94:459-70. Velikvan I, Bever GJ, Långström B. Microwave-supported preparation of (68)Ga bioconjugates with high specific radioactivity. Bioconjug. Chem. 2004 Jun;15(3):554-60. Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. J. Exp. Med. 1995 Nov 1;182(5):1597-601. Wijayanti MA, Sholikhah EN, Tahir I, Hadanu R, Jumina, Supargiyono, et al. Antiplasmodial Activity and Acute Toxicity of N-alkyl and N-benzyl-1,10-Phenanthroline Derivatives in Mouse Malaria Model. J. Health Sci. 2006 Dec;52(6):794-9. Wójcik P, Berlicki L. Peptide-based inhibitors of protein-protein interactions. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2016 Feb 1;26(3):707-13. Wuest M, Perreault A, Kapty J, Richter S, Foerster C, Bergman C, et al. Radiopharmacological evaluation of 18F-labeled phosphatidylserine-binding peptides for molecular imaging of apoptosis. Nucl. Med. Biol. 2015 Nov;42(11):864-74. 



















# 4.2.3. Développement d'un traceur polysaccharidique de la P-sélectine

Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet IMOVA (labellisé par le pôle de compétitivité Medicen Paris Région ; projet piloté par l'entreprise Guerbet).

Le fucoïdane de bas poids moléculaire extrait de l'algue brune *Ascophyllum nodosum* par la société Algues et Mer (Ascophyscient<sup>®</sup>) a une affinité nanomolaire pour la P-sélectine et se présente donc comme un ligand intéressant pour le développement de traceurs pour l'imagerie de l'activation plaquettaire et de l'activation endothéliale, deux situations caractérisées par une surexpression de la P-sélectine.

Etant donné son origine naturelle, le produit brut issu de l'extraction forme un ensemble complexe et hétérogène de polysaccharides présentant différents poids moléculaires, et une composition souvent variable. Cette variabilité constitue une limite au développement du produit comme outil thérapeutique ou diagnostique. Le produit brut est par ailleurs riche en acide uronique (20%). Sa composition moyenne en fucoses et en sulfates est inférieure à 50%. Partant du constat que notre produit brut n'est ni homogène ni assez riche en polyfucoses sulfatés, seules structures supposées être responsables de l'activité biologique du fucoïdane, [183], [240] l'équipe du LVTS s'est fixé comme premier objectif de mettre au point une méthode de purification standardisée et reproductible permettant d'obtenir un produit riche en fucoses et en sulfates et débarrassé au maximum de ses espèces macromoléculaires riches en acide uronique.

# 4.2.3.1. Purification et caractérisation physico-chimique du fucoïdane

La méthode de purification utilisée est basée sur la précipitation des structures polyuroniques rémanentes lors de la production du fucoïdane telles que les alginates en utilisant une solution de sel de calcium (acétate de calcium dans notre cas). [241], Les alginates qui sont des acides polyuroniques purs, forment en effet des complexes avec les cations divalents comme le calcium. Les complexes ainsi formés sont insolubles dans l'eau et précipitent ce qui permet leur élimination. L'élimination du calcium qui est un potentiel compétiteur du marquage au gallium se fait par dialyses répétitives contre de l'eau osmosée.

Ce travail de purification et de caractérisation physico-chimique a été effectué par Pierre Saboural. Il a permis d'obtenir un produit de composition plus homogène et plus riche en fucoses et en sulfates avec des caractéristiques physico-chimiques reproductibles. La comparaison des fucoïdanes brut et purifié technétiés selon la méthode de Rouzet et coll. [184] a permis de démontrer que la fixation au niveau du foie et de la moelle est plus faible pour le produit purifié. Sa fixation au niveau de la cible (endothélium activé) est par ailleurs plus intense. Le produit purifié avec le calcium a donc été retenu pour le développement d'un traceur TEP de la P-sélectine.

Le travail de purification et de caractérisation physico-chimique a donné lieu à la publication suivante :

# Article 6: Purification of a low molecular weight fucoidan

(Publié)

Purification of a low molecular weight fucoidan for SPECT molecular imaging of myocardial infarction," *Mar. Drugs*, vol. 12, no. 9, pp. 4851–4867, Sep. 2014.

P. Saboural, F. Chaubet, F. Rouzet, F. Al-Shoukr, R. B. Azzouna, N. Bouchemal, L. Picton,L. Louedec, M. Maire, L. Rolland, G. Potier, D. L. Guludec, D. Letourneur, and C. Chauvierre.
Mar. Drugs 2014, 12, 4851-4867; doi:10.3390/md12094851



Article

# Purification of a Low Molecular Weight Fucoidan for SPECT Molecular Imaging of Myocardial Infarction

Pierre Saboural <sup>1,2</sup>, Frédéric Chaubet <sup>1,2</sup>, Francois Rouzet <sup>1,3,4</sup>, Faisal Al-Shoukr <sup>1,3,4</sup>, Rana Ben Azzouna <sup>1,2,3,4</sup>, Nadia Bouchemal <sup>5</sup>, Luc Picton <sup>6,7</sup>, Liliane Louedec <sup>1</sup>, Murielle Maire <sup>1,2</sup>, Lydia Rolland <sup>8</sup>, Guy Potier <sup>8</sup>, Dominique Le Guludec <sup>1,3,4</sup>, Didier Letourneur <sup>1,2</sup> and Cédric Chauvierre <sup>1,2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Inserm, U1148, LVTS, Paris Diderot University, Bichat-Claude Bernard Hospital, F-75877, Paris, France; E-Mails: pierre.saboural@univ-paris13.fr (P.S.); frederic.chaubet@univ-paris13.fr (F.C.); francois.rouzet@bch.aphp.fr (F.R.); faisal1977@hotmail.fr (F.A.-S.); rana.ben-azzouna@bch.aphp.fr (R.B.A.); liliane.louedec@inserm.fr (L.L.); murielle.maire@univ-paris13.fr (M.M.); dominique.leguludec@bch.aphp.fr (D.L.G.); didier.letourneur@inserm.fr (D.L.)
- <sup>2</sup> Galilée Institute, Paris 13 University, Sorbonne Paris Cité, F-93430, Villetaneuse, France
- <sup>3</sup> Multimodal Imaging Research Federation (FRIM), Paris Diderot University, F-75877, Paris, France
- <sup>4</sup> Nuclear Medicine Department, Bichat-Claude Bernard Hospital, AP-HP, F-75877, Paris, France
- <sup>5</sup> Laboratory CSPBAT, Paris 13 University, Sorbonne Paris Cité, CNRS UMR 7244, SBMB team, F-93017, Bobigny, France; E-Mail: nbouchemal@smbh.univ-paris13.fr
- <sup>6</sup> Laboratory of Polymers Biopolymers Surfaces, Normandie University, Rouen University, F-76821, Mont Saint Aignan, France; E-Mail: luc.picton@univ-rouen.fr
- <sup>7</sup> Laboratory of Polymers Biopolymers Surfaces, CNRS, UMR 6270 and FR3038, F-76821, Mont Saint Aignan, France
- <sup>8</sup> Algues & Mer, Kernigou, F-29242, Ouessant, France; E-Mails: lydia.rolland@algues-et-mer.com (L.R.); guy.potier@algues-et-mer.com (G.P.)
- \* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: cedric.chauvierre@inserm.fr; Tel.: +33-1-4025-7538; Fax: +33-1-4025-8602.

Received: 31 July 2014; in revised form: 5 September 2014 / Accepted: 9 September 2014 / Published: 23 September 2014

**Abstract:** Fucoidans constitute a large family of sulfated polysaccharides with several biochemical properties. A commercial fucoidan from brown algae, containing low molecular weight polysaccharidic species constituted of L-fucose, uronic acids and sulfate groups, was simply treated here with calcium acetate solution. This treatment led to a

purified fraction with a yield of 45%. The physicochemical characterizations of the purified fucoidan using colorimetric assay, MALLS, dRI, FT-IR, NMR, exhibited molecular weight distributions and chemical profiles similar for both fucoidans whereas the sulfate and L-fucose contents increased by 16% and 71%, respectively. The biodistribution study in rat of both compounds labeled with <sup>99m</sup>Tc evidenced a predominant renal elimination of the purified fucoidan, but the crude fucoidan was mainly retained in liver and spleen. In rat myocardial ischemia-reperfusion, we then demonstrated the better efficiency of the purified fucoidan. This purified sulfated polysaccharide appears promising for the development of molecular imaging in acute coronary syndrome.

Keywords: fucoidan; molecular imaging; atherothrombosis; SPECT

#### 1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death in the world [1] and medical imaging is the most widespread and efficient tool for their diagnosis. Molecular imaging is a recent and promising development of medical imaging dedicated to the visualization of the biological processes in vivo. However, the identification of mechanisms at cellular and molecular levels relies on the development of imaging probes that are able to interact with the targeted areas. The biospecificity of these probes is achieved by conjugation with small molecules [2,3], polymers and oligomers [4,5], antibodies, proteins and peptides [6,7], polysaccharides [8,9] or mixed compounds [10]. Fucoidans constitute a family of natural sulfated polysaccharides which have been extensively studied as they exhibit numerous biological activities: anticoagulant, antithrombotic [11], anti-inflammatory [12], anti-angiogenic [13] and anti-tumoral [14], anti-complementary [15,16] and anti-viral [12]. Recently, in purified systems and with human whole blood experiments, a low molecular weight fucoidan from brown algae was found as the most efficient glycosidic ligand of P-selectin, a glycoprotein expressed on the surface of activated platelets and on activated vascular endothelium [17]. This low molecular weight fucoidan was established as a relevant targeting agent for molecular imaging of atherothrombosis, either radiolabeled with technetium-99m (99mTc) for Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) imaging [18] or bound to Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide particles (USPIO) for Magnetic Resonance Imaging (MRI) [19].

Beyond the complete determination of the structures responsible for the interaction of fucoidan with P-selectin, the development of a biospecific probe for clinical molecular imaging of CVD is required to assess the overall fate of fucoidan within tissues and organs. Due to their natural origin and non-standardized methods of purification, fucoidans form a complex family of polysaccharides varying in molecular weight, structure and composition. In order to minimize this natural heterogeneity, previous studies from our laboratory have been performed with the same commercial fucoidan (Ascophyscient<sup>®</sup>) provided by Algues and Mer [17–20]. This work presents a new specific treatment of fucoidan with calcium ions to obtain a purified extract. The molecular weight, structure and composition of the purified fucoidan were determined by physico-chemical techniques such as High Performance Size Exclusion Chromatography (HPSEC), Multi-Angle Laser Light Scattering

4853

(MALLS), viscosimetry, differential Refractive Index (dRI), colorimetric assays, Fourier Transform InfraRed spectroscopy (FT-IR), Nuclear Magnetic Resonance (NMR), and compared to those of the crude fucoidan. After radiolabeling with <sup>99m</sup>Tc according to a previously described method [18], the biodistribution of both fucoidans was assessed in healthy rats. SPECT imaging was then performed in a model of ischemia-reperfusion (I-R) to evaluate the efficiency of the purified fucoidan for *in vivo* detection of ischemic events in rat myocardium.

## 2. Results

#### 2.1. Physico-Chemical Characterizations

#### 2.1.1. Molecular Weight Measurement

The purification treatment of crude fucoidan with aqueous calcium acetate led to a precipitate which was discarded by centrifugation. After dialysis and freeze-drying of the supernatant, purified fucoidan was obtained as a white fluffy powder in 45% average yield. The molecular weight measurements performed by HPSEC-MALLS-dRI showed two overlapping macromolecular populations (Figure 1): Light Scattering chromatograms showed one main peak with a shoulder at 27 min. The molecular weight distribution was linear from 24 to 28.5 min and ranged from 26 to 1 kDa. The respective peak masses were M P1 =  $9.0 \pm 0.1$  kDa and M P2 =  $3.5 \pm 0.1$  kDa for crude fucoidan and M P1 =  $8.8 \pm 0.1$  kDa and M P2 =  $4.0 \pm 0.1$  kDa for purified fucoidan. The Refractive Index chromatogram of purified fucoidan did not present peaks after 30 min, unlike crude fucoidan.

**Figure 1.** Refractive Index (plain line) and Light Scattering (dashed line) chromatograms and molecular mass profile (dotted line) of crude (Left) and purified (Right) fucoidans eluted in 0.1 M LiNO<sub>3</sub> at 0.5 mL/min with Shodex SB-802.5 and SB-803 columns.



Average number  $(M_n)$  and average weight  $(M_w)$  molecular weights of purified fucoidan were increased compared to crude fucoidan but the polydispersity was not modified (Table 1),  $M_w$  being less affected by the purification, that is consistent with the elimination of small molecules by the purification process.

Fucoidans	$\overline{M_n}$ (kDa)	$\overline{M_w}$ (kDa)	$\overline{M_n}/\overline{M_w}$
Crude	$3.5 \pm 0.4$	$6.2\pm0.3$	$1.5\pm0.2$
Purified	$4.9 \pm 0.2$	$7.5\pm0.2$	$1.5\pm0.1$

Table 1. Molecular weights of crude and purified fucoidans.

### 2.1.2. Chemical Composition

L-fucose, uronic acid and sulfate contents assayed by colorimetric methods were gathered in Table 2. Crude fucoidan was mainly composed of L-fucose and sulfate with a lower amount of uronic acid. After the purification step with calcium acetate, purified fucoidan was enriched in L-fucose and sulfate by 71% and 16%, respectively. Moreover, the proportion of other components in fucoidan samples decreased from 37.2% to 15.2%.

Table 2. Composition of the fucoidan samples (w/w % of dried weight).

Fucoidans	L-Fucose	Uronic Acid	Sulfate	Other
Crude	$25.0\% \pm 0.5\%$	$16.1\% \pm 0.9\%$	$21.7\% \pm 2.0\%$	37.2%
Purified	$42.8\%\pm2.2\%$	$16.9\%\pm0.4\%$	$25.1\%\pm0.8\%$	15.2%

## 2.1.3. FTIR Analysis

FT-IR spectra of crude and purified fucoidans (Figure 2) presented similar patterns corresponding to that of sulfated polysaccharides [21–23], a broad band at 3450 cm<sup>-1</sup> (O-H groups stretching), two small sharp bands at 2940 cm<sup>-1</sup> and 2885 cm<sup>-1</sup> (C-H stretching of the pyranose ring and of the methyl group of fucose), two bands at 1600 cm<sup>-1</sup> and 1420 cm<sup>-1</sup> (COOH stretching vibration), a band around 1250 cm<sup>-1</sup> (S=O stretching) and two small bands at 840 cm<sup>-1</sup> and 820 cm<sup>-1</sup> (axial and equatorial C-O-S bending, respectively).

Figure 2. FT-IR spectra of crude (plain line) and purified (dashed line) fucoidans. Arrows indicate the characteristic bands for sulfated polysaccharides.



4854

2.1.4. NMR Analysis

NMR spectra of both compounds also presented the same general features (Figure 3). Signals from anomeric protons H-1 arose from  $\alpha$ -L-fucose residues and uronic acid residues between 5.6 and 5.15 ppm. H-2, H-3 and H-4 of the sulfated fucose could be localized between 4.66 and 4.10 ppm whereas from 4.20 to 3 ppm were H-2, H-3, H-4 and H-5 of unsulfated fucose and uronic acid. Lastly, the two peaks, around 1.2 and 1.35 ppm were assigned to the methyl group of fucose. A single peak at 2.2 ppm might be ascribed to acetyl groups.

**Figure 3.** <sup>1</sup>H-NMR spectra (in 99.8% D<sub>2</sub>O, 500 MHz) of crude (upper) and purified (lower) fucoidans. (A) Anomeric protons from  $\alpha$ -L-Fucose; (B) H-2, H-3 and H-4 of the sulfated fucose; (C) H-2, H-3, H-4 and H-5 of unsulfated fucose and uronic acid; (D) Methyl protons.



4855

4856

## 2.2. In Vivo Studies of the 99m Tc-Radiolabeled Fucoidans

The radiolabeling of crude and purified fucoidans was performed with <sup>99m</sup>Tc according to a previously described procedure [18]. The radiochemical purity was superior to 95% for both fucoidans without any significant difference.

2.2.1. Biodistribution Studies of the Radiolabeled Fucoidans

The uptake of <sup>99m</sup>Tc-crude fucoidan was intense in the rat liver and only faint in the bladder and kidneys (Figure 4, left panel). In contrast, the uptake of purified fucoidan was faint in the liver and intense in both bladder and kidneys (Figure 4, right panel). Quantifications of uptake ratios obtained by SPECT are presented in Figure 5. No free <sup>99m</sup>Tc was detected in thyroid for both compounds indicating a stable complexation even after 2 h *in vivo*. Note that the background signal of the body was higher for purified fucoidan than for crude fucoidan since the images were normalized on the highest pixel signal (in white on the color images).

**Figure 4.** Representative whole body SPECT images of the <sup>99m</sup>Tc-radiolabeled fucoidans: crude (left) and purified (right). The rats (five for crude fucoidan and four for purified fucoidan) were imaged 2 h after injection of 2  $\mu$ g of the samples.



**Figure 5.** Quantification of the biodistribution of crude fucoidan (grey) and purified fucoidan (black) based on the whole body SPECT images obtained 2 h after *i.v.* injection of the <sup>99m</sup>Tc-radiolabeled fucoidans in rats (respectively n = 5 and n = 4) expressed as mean  $\pm$  SD. Three Regions of Interest (ROI) were assessed: the hepatosplenic system (liver + spleen), the urinary system (kidneys + bladder) and the other parts (the hepatosplenic system and the urinary system activities subtracted from whole body activity). \* p < 0.05.



## 2.2.2. Myocardial Ischemia-Reperfusion

In the model of myocardial Ischemia-Reperfusion in rat, purified fucoidan facilitated the *in vivo* detection of the ischemic myocardium with a signal intensity twice that of the crude form (Figure 6). A similar finding was obtained by autoradiography (Figure 7). The ratio of the injured tissue (dark area) activity over the normal myocardium was computed for crude fucoidan  $(4.9 \pm 0.2)$  and for purified fucoidan  $(8.7 \pm 2.1)$ .

**Figure 6.** SPECT/CT (from left to right: sagittal, coronal and axial plane) of myocardial ischemia-reperfusion in rat, acquired 2 h after the injection of the radiolabeled crude fucoidan (A) and purified fucoidan (B). The SPECT color-scale was normalized (max: 20 counts/pixel). The focal uptake of the tracer was localized in the area of ischemia provoked in the left ventricle (white arrow), with a myocardium to background (blood pool) ratio of 1.9 with the crude fucoidan and 3.3 with the purified form.



**Figure 7.** Autoradiography (20  $\mu$ m thickness transverse slices) of the myocardium after injection of the radiolabeled crude fucoidan (**A**) and purified fucoidan (**B**) in an I-R rat model. The uptake of the radiolabeled fucoidans appears in black.



#### 3. Discussions

Fucoidans are interesting bioactive sulfated polysaccharides to be developed for clinical purposes. They are endowed with numerous biological activities, are cheap and their preparations from marine algae allow protocols compatible with industrial constraints without costly specific equipment. However, there is currently no standard method to obtain a bioactive well defined fucoidan from crude carbohydrate extracts. Fucoidans are always obtained as mixtures of macromolecular species, the structures of which depend on many parameters, such as the algal species or the period and location of harvesting and the purification methods [24,25]. Commercial products with the same identification are for instance highly variable in their molecular weight (from 20 to 170 kDa) and composition.

Numerous studies have been published on structure-activity relationships of fucoidans from marine algae [12,26] since this species was identified by Kylin one century ago [27]. Fucoidans belong to the family of fucans including two other carbohydrate species: ascophyllans and sargassans [28]. Fucoidans refer to polysulfated poly-L-fucose, although xylose, glucose, galactose or glucuronic acids can be associated [29], as ascophyllans and sargassans are uronic acid-rich and galactose-rich polysaccharidic species, respectively. Uronic acids are frequently recovered in fucoidans from algae either as co-extracted polysaccharidic structures, or as discrete short branchings [25]. Eventually, repeated simple fucoidan structures can be obtained but always after several purification steps from crude fucoidan extracts [30-33]. To date, only sulfated fucose rich species have been reported to be responsible for the biological properties of fucoidans [11,12]. Recent studies demonstrated that Ascophysicent® (crude fucoidan), a commercially available low molecular weight fucoidan extracted from Ascophyllum nodosum, is a relevant biomarker for the molecular imaging of thrombus and vascular activation in atherothrombotic diseases [18,19]. However, sulfate and fucose represent less than 50 percent of the dry weight of crude fucoidan with a remaining high proportion of uronic acids and other sugars. It is likely that it contains a mixture of bioactive sulfated fucose-based polymers and some polyuronic acids, likely ascophyllan. This work aimed at (i) purifying crude fucoidan by precipitating the polyuronic structures with calcium ions; (ii) compare biodistribution of crude vs. purified fucoidan with regards to the route of blood clearance and (iii) demonstrate that the purification process did not alter radiolabeling efficiency and in vivo binding.

The purification with calcium ions was intended to remove uronic acid chains contained in the crude fucoidan. As the alginates are expected to be removed by the industrial extraction process (data not

4859

shown), it has been thought that the uronic acids came from the ascophyllans, a sulfated polysaccharide with an uronic acid backbone and sulfated polyfucose branchings [34,35], that could be co-extracted with the fucoidan. The uronic acid backbone of ascophyllans would form complexes with calcium ions and then precipitate. Our findings showed that the FT-IR and <sup>1</sup>H-NMR spectra of crude and purified fucoidans presented typical features of a sulfated polysaccharide with sulfation at O-2, O-3 and O-4 positions of L-fucose as previously demonstrated with fucoidan extracts from *A. nodosum* [22,36]. Compared to other fucoidans extracted from *A. nodosum*, crude fucoidan is composed of two low molecular weight species: one with a lower fucose rate and the other with a higher uronic acid rate [29,37,38]. By comparing the quantity of uronic acids to the total quantity of fucose and sulfate groups of crude and purified fucoidans—34.5% and 24.9%, respectively—it appeared that around 10% of uronic acids were removed by the calcium treatment. Moreover, the molecular weight distribution of purified fucoidan was shifted to slightly higher molecular weights as small molecules were removed.

The radiolabeling with <sup>99m</sup>Tc was achieved for both species with a radiochemical purity higher than 95% similar to that of the <sup>99m</sup>Tc-heparin [39]. *In vivo*, <sup>99m</sup>Tc-crude fucoidan was localized in part in the liver and the spleen which are the targeted organs of the reticulo-endothelial system (RES). This *in vivo* data is interesting since low molecular weight fucoidan from *A. nodosum* was reported to have *in vitro* anti-complement activity [16]. The higher accumulation of <sup>99m</sup>Tc-crude fucoidan in the liver and spleen compared to that of <sup>99m</sup>Tc-purified fucoidan could be due to the higher quantity of uronic acids.

Finally, the purification procedure did not affect *in vivo* binding of fucoidan to endothelial cells activated by a transient ischemic event. In the Ischemic-Reperfusion rat model, focal uptakes of the polysaccharides were detectable for both <sup>99m</sup>Tc-crude fucoidan and <sup>99m</sup>Tc-purified fucoidan. Interestingly, it was more intense for the purified fucoidan and the autoradiographies strengthened this observation.

#### 4. Experimental Section

#### 4.1. Polysaccharide and Common Chemicals

Fucoidan was obtained from Algues & Mer (Ascophycient<sup>®</sup>, batch #ASPHY12399, Ouessant, France), DEAE-cellulose resin from Sigma Aldrich and dialysis membrane from Spectra/Por, (MWCO 1 kDa, Dominique Dutscher, France). Common chemicals were purchased in analytical grade from Carlo Erba, Sigma-Aldrich and Fisher Scientific and used without further purifications.

#### 4.2. Molecular Weight Determination

The absolute average molecular weights and molecular weight distributions were determined at room temperature by coupling online a high performance size exclusion chromatograph (HPSEC), a multi-angle laser light scattering detector (MALLS), a viscometer and a differential refractive index (dRI) detector. 0.1 M LiNO<sub>3</sub>, used as carrier, was filtered through a 0.1  $\mu$ m filter unit (Millipore, Billerica, USA), carefully degassed (DGU-20A3R Shimadzu, Kyoto, Japan), and eluted at a 0.5 mL/min flow rate (LC10Ai Shimadzu, Kyoto, Japan). 100  $\mu$ L of a 0.45  $\mu$ m-filtered sample solution (at about 20 mg/mL) were injected with an automatic injector (SIL-20A HT Shimadzu, Kyoto, Japan). The SEC line consisted of an OHpak SB-G guard column for protection and two OHpak SB-802.5 and-803 HQ columns (Showa Denko Europe, Munich, Germany) in series. The column packing was a poly

4860

(hydroxymethacrylate) gel. The MALLS photometer, a DAWN HELEOS II from Wyatt Technology Inc. (Santa Barbara, CA, USA) was provided with a fused silica cell and a Ga-As laser ( $\lambda = 665.8$  nm). The viscometer was a ViscoStar II from Wyatt Technology Inc. (Santa Barbara, CA, USA). The whole collected data: light scattering (LS), dRI and viscosity were analyzed using the Astra v6.0.6 software package. Molar mass were obtained with the Zimm order 1 method using angles between 53.1° and 140°. The concentration of each eluted fraction was determined with dRI (RID10A Shimadzu, Kyoto, Japan) according to the measured values of dn/dc (0.144 mL/g). The determination of the average intrinsic viscosity allowed us to obtain the average hydrodynamic volume (V<sub>h</sub>, *i.e.*, the average hydrodynamic radius R<sub>h</sub>) using the Einstein-Simha equation:  $V_h = \frac{[\eta] \cdot M}{\nu N_A}$  where N<sub>A</sub> is Avogadro's number, M is the molar mass, [η] is the intrinsic viscosity (g/mL), and v is a conformational parameter that takes the value of 2.5 (for spherical random coil).

#### 4.3. Purification of Fucoidan

The purification of fucoidan was achieved after dissolution (160 mg/mL) of crude fucoidan with aqueous calcium acetate (20 mM) during 4 h at 55 °C under magnetic stirring and the pH was constantly adjusted between 6.5 and 7.5. The solution was left at 4 °C overnight and then centrifuged 15 min at 4500 rpm (Allegra X-15R centrifuge, Beckman-Coulter France, Villepinte, France). The supernatant was dialyzed against water (MWCO 1 kDa, Dominique Dutscher, France) and freeze-dried.

#### 4.4. Colorimetric Assay

The colorimetric assay was achieved on microplate and ELx800 Absorbance Microplate Reader (BioTek, Colmar, France) and processed with Gen-5 software (BioTek, Colmar, France).

#### 4.4.1. Fucose

The fucose rate determination was adapted from the Dische method [40]. In a 96-wells plate, 50  $\mu$ L of sample (about 0.3 mg/mL) was mixed with 200  $\mu$ L of sulfuric acid (18 M). The plate was heated during 30 min at 80 °C then left at room temperature for cooling down. 8  $\mu$ L of L-cysteine hydrochloride at 3% (w/v) was added and left to react for 1 h at 4 °C. Then absorbance was computed as follows: OD<sub>fucose</sub> = [OD<sub>405</sub> (sample) – OD<sub>405</sub> (blank)] – [OD<sub>450</sub> (sample) – OD<sub>450</sub> (blank)]. The amount of fucose was determined from a standard curve obtained with L-fucose solutions (25–500  $\mu$ g/mL).

#### 4.4.2. Glucuronic Acid

Glucuronic acid rate determination was adapted from Bitter *et al.* [41]. In a 96-wells plate, 35  $\mu$ L of sample (about 0.3 mg/mL) was mixed with 200  $\mu$ L of sodium tetraborate (0.025 M) in sulfuric acid (18 M). The plate was heated during 30 min at 80 °C then left at room temperature for cooling down. 14  $\mu$ L of carbazol solution at 0.15% (w/v) in ethanol was added and heated 1 h at 80 °C, and then the absorbance was read at 540 nm. The amount of uronic acid was determined from a standard curve obtained with D-glucuronic acid solutions submitted to the same process.

#### 4.4.3. Sulfate

Sulfate rate was obtained by formation of methylene blue after acidic hydrolysis of the samples, reduction of sulfate as hydrogen sulfide ( $H_2S$ ), and formation of methylene blue from N,N-dimethyl phenylene diamine dihydrochloride in strong acidic medium in presence of ferric chloride. Conditions were optimized from Gustafsson [42] and Kuban et al. [43]. Briefly, 100–200 µL of the sample were added to 5 mL of a reducing mixture prepared with 100 mL of concentrated hydroiodic acid, 25 mL of glacial acetic acid and 2.5 g of sodium hypophosphite. The mixture was refluxed during 20 min through a water-cooled condenser under a stream of N2 (100 mL/min) which carried away evolved H<sub>2</sub>S. After bubbling through a gas-washing column (20 mL of Tris buffer 0.1 M, pH 7.2), H<sub>2</sub>S was trapped as zinc sulfide (ZnS) in 30 mL of a solution of zinc acetate prepared by diluting 5 mL at 0.5 M and sodium acetate 0.1 M with 25 mL of deionized water. Eight mL of 16 mM ferric chloride in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 M, and 2 mL of 3.7 mM N<sub>N</sub>-dimethyl-phenylene-diamine dihydrochloride in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 9 M were added to the ZnS solution, and the final volume was adjusted to 50 mL with deionized water. The vial was maintained at room temperature in the dark for 20 min and the absorption was measured at 665 nm with a UV-visible spectrophotometer (Lambda 12, Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). The amount of sulfur was determined from a standard curve obtained with potassium sulfate solutions submitted to the overall process. This method did not require a special treatment of the samples and was not sensitive to ferric ions contrary to sulfur elemental analysis or turbidimetric assays.

#### 4.5. Infrared Spectra

Infrared spectra were acquired between 400 and 4000 cm<sup>-1</sup> with an AVATAR 370 FT-IR spectrometer (Thermo-Nicolet, Villebon, France) with 32 scans/sample and a resolution of 2 cm<sup>-1</sup>. Dry samples were pressed with potassium bromide (2% w/w). Spectra were processed and analyzed with OMNIC v6.1 (Thermo-Nicolet software).

#### 4.6. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

All NMR experiments were conducted on a Bruker AVANCE III spectrometer (BioSpin Bruker, Wissembourg, France) operating at a proton frequency of 500 MHz with a 5 mm gradient indirect detection probe, at a probe temperature of 300 K. The samples were exchanged twice with 99.8% D<sub>2</sub>O with intermediate freeze drying and dissolved in 0.6 mL of 99.96% D<sub>2</sub>O. 1-D proton spectra were acquired with 16 scans and 32 K data points with a spectral width of 5000 Hz. Typical <sup>1</sup>H 9.5  $\mu$ s-pulse length and relaxation delay of 1 s were used. Water signal was suppressed by a presaturation sequence at the water signal frequency.

#### 4.7. Radiolabeling Procedure

The radiolabeling of fucoidan has been performed according to the general process of reduction of pertechnetate ( $TcO_4^-$ ) by stannous ions in order to obtain a complex between a reduced form of <sup>99m</sup>Tc and the ligand. The procedure is the most widely used to produce <sup>99m</sup>Tc-labeled radiopharmaceuticals both in the preclinical and clinical domains [44]. The mechanism of complexation generally accepted involves the formation of positively charged reduced forms of <sup>99m</sup>Tc [Tc(V) and/or Tc(III)] that will

4861

4862

react with negatively charged domains of the ligand [44]. This procedure has already been applied to radiolabeling of polysaccharides such as heparin [45] and dextran [46]. Briefly, <sup>99m</sup>Tc was eluted from a <sup>99</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc generator as an isotonic solution with high specific activity. The sodium pertechnetate (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>Na, between 300 and 400 MBq in <200  $\mu$ L saline, freshly eluted), 1  $\mu$ g stannous chloride (1  $\mu$ g/ $\mu$ L; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and 1  $\mu$ g potassium borohydride (1  $\mu$ g/ $\mu$ L; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) were added to a vial containing 10  $\mu$ g of fucoidan (1 mg/mL), and left to incubate during 1 h at room temperature. The quality control was performed with instant thin-layer chromatography (ITLC) developed in methyl-ethyl-ketone buffer. The radiochemical purity was always superior to 95%. No supplementary purification was performed on the radiolabeled fucoidan.

#### 4.8. Biodistribution and Experimental Model of Myocardial Ischemia-Reperfusion

For both the biodistribution and ischemia-reperfusion rat model, each rat was injected with  $200-500 \ \mu\text{L}$  of  $60-74 \ \text{MBq}$  of radiolabeled fucoidan, corresponding to about 2  $\mu\text{g}$  of fucoidan and the injected dose pH was neutral (7 and 7.5). The rats weighted between 310 and 350 g.

Biodistribution of radiolabeled fucoidans was performed in healthy male Wistar rats (Janvier, France) in order to determine the preferential route of blood clearance after intravenous injection. Since we previously determined that blood clearance of fucoidan was maximal during the first 2 h after administration [18], we set the delay between injection and biodistribution assessment at 2 h. We determined *in vivo* biodistribution of fucoidans by SPECT imaging which is inherently quantitative and is now widely used for this purpose.

Whole body acquisitions were performed under isoflurane anesthesia after intravenous injection (penile vein) of 50 MBq of crude (n = 5) or purified (n = 4) fucoidans. Total body activity was estimated using a volume of interest encompassing the whole field of view, subtracted from residual activity remaining at the injection site (penis). Then, relative organ retention (defined for liver, spleen, left kidney, and bladder) was calculated as the ratio of activity within 3-dimensional volumes of interest over total body activity. Results were then displayed as renal excretion (kidney  $\times 2$  + bladder) and reticulo-endothelial retention (liver + spleen).

The model of myocardial ischemia-reperfusion was performed in four male Wistar rats. The proximal left anterior descending coronary artery was occluded using a suture around a catheter for 20 min, then was reperfused by cutting the suture along the catheter in rats under general anesthesia (ketamine/xylazine) and positive pressure ventilation. Injection of the radiotracer was performed after 2 h of reperfusion. This study was conducted under authorization of the French Direction of the Veterinary Services (No. 2012-15/698-106).

#### 4.9. Imaging Procedures

#### 4.9.1. Acquisition and Reconstruction Parameters

Imaging was performed 2 h after intravenous injection of radiolabeled fucoidans. Helical SPECT/CT scans were performed under isoflurane anesthesia using a 4-headed multiplexing multipinhole camera (NanoSPECT/CT plus, Bioscan Inc., Washington, DC, USA). Each head was

4863

equipped with a tungsten collimator (Rat Whole Body—High sensitivity). Flat-panel detector CT was performed first (tube voltage: 55 kV, tube current: 145 mAs), then whole body SPECT acquisition was performed with the following parameters: helical scan with 28 projections/rotation plus circular scan at the beginning and at the end of the scan range, matrix size:  $256 \times 256$ , zoom: 1.14 (pixel size: 1 mm<sup>2</sup>). SPECT data were reconstructed using the HiSPECT (Bioscan Inc., Washington, DC, USA) iterative reconstruction software on a dedicated workstation, and visualized using InVivoScope software with co-registration of SPECT and CT images.

#### 4.9.2. Data Analysis

Radiolabeled fucoidan biodistribution in healthy rats was carried out in order to establish evidence of the preferential route of blood clearance after intravenous injection. Total body activity was estimated using a volume of interest encompassing the whole field of view, subtracted from residual activity remaining at the injection site (penis). Then, relative organ retention (defined for liver, spleen, left kidney, and bladder) was calculated as the ratio of activity within 3-dimensional volumes of interest over total body activity. Results were then displayed as renal excretion (kidney  $\times$  2 + bladder) and reticulo-endothelial retention (liver + spleen).

Ischemia-reperfusion model scintigrams were assessed visually to determine the presence of a focal tracer uptake in the myocardium.

Autoradiography: after completion of SPECT/CT, animals were euthanized with pentobarbital overdose. Tissue samples were frozen and cut into transverse sections of 20  $\mu$ m thickness which were exposed in a digital  $\beta$ -imager (Beta Imager, Biospace Lab, Paris, France) for 6 h. Quantification was performed by calculating the ratio between the activity (mean counts/mm<sup>2</sup>) of the area at risk and the activity of a region of interest drawn over normal myocardium.

#### 4.10. Statistical Analyses

Statistics were computed with GraphPad Prism v.5 software. Chemical compositions of the samples were compared with a two-tailed *t*-test where p < 0.05 was considered significant. For biodistribution, each sample was compared 2 by 2 in a ROI using a two-tailed Mann-Whitney test and was considered significant at p < 0.05.

## 5. Conclusions

Ascophyscient<sup>®</sup> is a commercially available product extracted from Ascophyllum nodosum mainly composed of fucose, sulfate and uronic acids. After a simple purification step, its composition was enriched in sulfated fucose. The biodistribution of the purified fucoidan in healthy rats was improved ensuring that the renal elimination was favored. Finally, the binding of <sup>99m</sup>Tc-purified fucoidan to the activated endothelium was validated in rat model of myocardial ischemia. As a low cost and easily labeling ligand of ischemic events, this purified fucoidan is promising for the clinical development of a molecular imaging probe for myocardial infarctions.

#### Acknowledgments

This study was supported by Inserm, University Paris 13 and the competitiveness cluster Medicen Paris Region. P.S. is a recipient of the grant from University Paris 13 and IMOVA project founded by FUI/OSEO. The authors would like to thank Thomas Cognet and Fadwa Aït-Ali for their technical assistance, Algues & Mer for the supplying of fucoidan, and Richard Bayles for editing of the manuscript. We also acknowledge the financial supports from FP7 NMP-LA-2012-309820 "NanoAthero", ANR-13-LAB1-0005-01 "FucoChem" and ANR-13-RPIB-0006 "FucoThrombo".

#### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CC, LD, DLG, FC, FR, PS. Performed physico-chemical experiments: PS, NB, LP, MM. Performed radiolabeling: FAS, RBA, FR. Designed, performed and analyzed animal experiments: FR, LL. Contributed materials/reagents: LR, GP. Contributed to writing the manuscript: PS, FC, FR, DL, CC.

#### **Conflicts of Interest**

L.R. and G.P. are employees of Algues & Mer, Kernigou, F-29242, Ouessant, France. The other authors declare no competing financial interest.

#### References

- Finegold, J.A.; Asaria, P.; Francis, D.P. Mortality from ischaemic heart disease by country, region, and age: Statistics from World Health Organisation and United Nations. *Int. J. Cardiol.* 2013, 168, 934–945.
- Lalatonne, Y.; Paris, C.; Serfaty, J.M.; Weinmann, P.; Lecouvey, M.; Motte, L. Bis-phosphonates—Ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles: A platform towards diagnosis and therapy. *Chem. Commun.* 2008, *22*, 2553–2555.
- Corr, S.A.; O'Byrne, A.; Gun'ko, Y.K.; Ghosh, S.; Brougham, D.F.; Mitchell, S.; Volkov, Y.; Prina-Mello, A. Magnetic-fluorescent nanocomposites for biomedical multitasking. *Chem. Commun.* 2006, 43, 4474–4476.
- Masotti, A.; Pitta, A.; Ortaggi, G.; Corti, M.; Innocenti, C.; Lascialfari, A.; Marinone, M.; Marzola, P.; Daducci, A.; Sbarbati, A.; *et al.* Synthesis and characterization of polyethylenimine-based iron oxide composites as novel contrast agents for MRI. *Magn. Resonance Mater. Phys. Biol. Med.* 2009, 22, 77–87.
- Petri-Fink, A.; Chastellain, M.; Juillerat-Jeanneret, L.; Ferrari, A.; Hofmann, H. Development of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells. *Biomaterials* 2005, 26, 2685–2694.
- Xie, J.; Wang, J.; Niu, G.; Huang, J.; Chen, K.; Li, X.; Chen, X. Human serum albumin coated iron oxide nanoparticles for efficient cell labeling. *Chem. Commun.* 2010, 46, 433–435.
- Tsourkas, A.; Shinde-Patil, V.R.; Kelly, K.A.; Patel, P.; Wolley, A.; Allport, J.R.; Weissleder, R. In vivo imaging of activated endothelium using an anti-VCAM-1 magnetooptical probe. Bioconjug. Chem. 2005, 16, 576–581.

?????

- Gao, F.; Cai, Y.; Zhou, J.; Xie, X.; Ouyang, W.; Zhang, Y.; Wang, X.; Zhang, X.; Wang, X.; Zhao, L.; Tang, J. Pullulan acetate coated magnetite nanoparticles for hyper-thermia: Preparation, characterization and *in vitro* experiments. *Nano Res.* 2010, *3*, 23–31.
- Molday, R.S.; MacKenzie, D. Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells. J. Immunol. Methods 1982, 52, 353–367.
- Kievit, F.M.; Veiseh, O.; Bhattarai, N.; Fang, C.; Gunn, J.W.; Lee, D.; Ellenbogen, R.G.; Olson, J.M.; Zhang, M. PEI-PEG-Chitosan-Copolymer-Coated iron oxide nanoparticles for safe gene delivery: Synthesis, complexation, and transfection. *Adv. Funct. Mater.* 2009, *19*, 2244–2251.
- Pomin, V.H. Fucanomics and galactanomics: Current status in drug discovery, mechanisms of action and role of the well-defined structures. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2012, 1820, 1971–1979.
- 12. Berteau, O.; Mulloy, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: Structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology* **2003**, *13*, 29R–40R.
- Ustyuzhanina, N.E.; Bilan, M.I.; Ushakova, N.A.; Usov, A.I.; Kiselevskiy, M.V.; Nifantiev, N.E. Fucoidans: Pro- or antiangiogenic agents? *Glycobiology* 2014, doi:10.1093/glycob/cwu063.
- Kwak, J.Y. Fucoidan as a marine anticancer agent in preclinical development. *Mar. Drugs* 2014, 12, 851–870.
- Blondin, C.; Fischer, E.; Boisson-Vidal, C.; Kazatchkine, M.D.; Jozefonvicz, J. Inhibition of complement activation by natural sulfated polysaccharides (fucans) from brown seaweed. *Mol. Immunol.* 1994, 31, 247–253.
- 16. Tissot, B.; Daniel, R. Biological properties of sulfated fucans: The potent inhibiting activity of algal fucoidan against the human complement system. *Glycobiology* **2003**, *13*, 29G–30G.
- Bachelet, L.; Bertholon, I.; Lavigne, D.; Vassy, R.; Jandrot-Perrus, M.; Chaubet, F.; Letourneur, D. Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2009, 1790, 141–146.
- Rouzet, F.; Bachelet-Violette, L.; Alsac, J.M.; Suzuki, M.; Meulemans, A.; Louedec, L.; Petiet, A.; Jandrot-Perrus, M.; Chaubet, F.; Michel, J.B.; *et al.* Radiolabeled fucoidan as a P-Selectin targeting agent for *in vivo* imaging of platelet-rich thrombus and endothelial activation. *J. Nucl. Med.* 2011, *52*, 1433–1440.
- Suzuki, M.; Bachelet-Violette, L.; Rouzet, F.; Beilvert, A.; Autret, G.; Maire, M.; Menager, C.; Louedec, L.; Choqueux, C.; Saboural, P.; *et al.* Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with fucoidan for molecular MRI of intraluminal thrombus. *Nanomedicine* 2014, doi:10.2217/nnm.14.51.
- Bachelet-Violette, L.; Silva, A.K.A.; Maire, M.; Michel, A.; Brinza, O.; Ou, P.; Ollivier, V.; Nicoletti, A.; Wilhelm, C.; Letourneur, D.; *et al.* Strong and specific interaction of ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles and human activated platelets mediated by fucoidan coating. *RSC Adv.* 2014, *4*, 4864–4871.
- 21. Bernardi, G.; Springer, G.F. Properties of highly purified fucan. J. Biol. Chem. 1962, 237, 75-80.
- Patankar, M.S.; Oehninger, S.; Barnett, T.; Williams, R.L.; Clark, G.F. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. J. Biol. Chem. 1993, 268, 21770–21776.

4865

- Choi, J.; Gu Lee, S.; Jong Han, S.; Cho, M.; Cheon Lee, P. Effect of gamma irradiation on the structure of fucoidan. *Radiat. Phys. Chem.* 2014, 100, 54–58.
- Ale, M.T.; Maruyama, H.; Tamauchi, H.; Mikkelsen, J.D.; Meyer, A.S. Fucoidan from *Sargassum* sp and Fucus vesiculosus reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells *in vitro* and activates natural killer cells in mice *in vivo*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2011, 49, 331–336.
- 25. Ale, M.T.; Meyer, A.S. Fucoidans from brown seaweeds: An update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation. *RSC Adv.* 2013, *3*, 8131.
- Pomin, V.H.; Mourão, P.A.S. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. *Glycobiology* 2008, 18, 1016–1027.
- 27. Kylin, H. Zur Biochemie der Meeresalgen. Z. Für Physiol. Chem. 1913, 83, 171-197.
- Kloareg, B.; Quatrano, R. S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. In *Oceanography and Marine Biology*; Barnes, M., Ed.; Aberdeen University Press: Aberdeen, UK, 1988; Volume 26, pp. 259–315.
- Chaubet, F.; Chevolot, L.; Jozefonvicz, J.; Durand, P.; Boisson-Vidal, C. Relationships between chemical characteristics and anticoagulant activity of low molecular weight fucans from marine algae. In *Bioactive Carbohydrate Polymers*; Paulsen, B.S., Ed.; Springer: Heidelberg, Germany, 2000; Volume 44, pp. 59–84.
- Nishino, T.; Nishioka, C.; Ura, H.; Nagumo, T. Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial fucus vesiculosus fucoidan. *Carbohydr. Res.* 1994, 255, 213–224.
- Chizhov, A.O.; Dell, A.; Morris, H.R.; Haslam, S.M.; McDowell, R.A.; Shashkov, A.S.; Nifantiev, N.E.; Khatuntseva, E.A.; Usov, A.I. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum. Carbohydr. Res.* 1999, 320, 108–119.
- Chevolot, L.; Mulloy, B.; Ratiskol, J.; Foucault, A.; Colliec-Jouault, S. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydr. Res.* 2001, 330, 529–535.
- Bilan, M.I.; Grachev, A.A.; Ustuzhanina, N.E.; Shashkov, A.S.; Nifantiev, N.E.; Usov, A.I. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag. *Carbohydr. Res.* 2002, 337, 719–730.
- Mabeau, S.; Kloareg, B. Isolation and analysis of the cell walls of brown algae: Fucus spiralis, F. ceranoides, F. vesiculosus, F. serratus, Bifurcaria bifurcata and Laminaria digitata. J. Exp. Bot. 1987, 38, 1573–1580.
- Leite, E.L.; Medeiros, M.G.L.; Rocha, H.A.O.; Farias, G.G.M.; da Silva, L.F.; Chavante, S.F.; de Abreu, L.D.; Dietrich, C.P.; Nader, H.B. Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga Spatoglossum schroederi. *Plant Sci.* 1998, *132*, 215–228.
- Daniel, R.; Berteau, O.; Chevolot, L.; Varenne, A.; Gareil, P.; Goasdoue, N. Regioselective desulfation of sulfated L-fucopyranoside by a new sulfoesterase from the marine mollusk Pecten maximus—Application to the structural study of algal fucoidan (Ascophyllum nodosum). *Eur. J. Biochem.* 2001, 268, 5617–5626.
- Chevolot, L.; Foucault, A.; Chaubet, F.; Kervarec, N.; Sinquin, C.; Fisher, A.M.; Boisson-Vidal, C. Further data on the structure of brown seaweed fucans: Relationships with anticoagulant activity. *Carbohydr. Res.* 1999, 319, 154–165.

4866

- Rioux, L.E.; Turgeon, S.L.; Beaulieu, M. Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydr. Polym.* 2007, 69, 530–537.
- Kulkarni, P.V.; Parkey, R.W.; Wilson, J.E.; Lewis, S.E.; Buja, L.M.; Bonte, F.J.; Willerson, J.T. Modified Technetium-99m Heparin for the Imaging of Acute Experimental Myocardial Infarcts. *J. Nucl. Med.* 1980, 21, 117–121.
- Dische, Z. New Color Reactions for Determination of Sugars in Polysaccharides. In *Methods of Biochemical Analysis*; Glick, D., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 1955; Volume 2, pp. 313–358.
- 41. Bitter, T.; Muir, H.M. A modified uronic acid carbazole reaction. Anal. Biochem. 1962, 4, 330–334.
- 42. Gustafsson, L. Determination of ultramicro amounts of sulphate as methylene blue—II The reduction. *Talanta* **1960**, *4*, 236–243.
- Kuban, V.; Dasgupta, P.K.; Marx, J.N. Nitroprusside and methylene blue methods for silicone membrane differentiated flow injection determination of sulfide in water and wastewater. *Anal. Chem.* 1992, 64, 36–43.
- Spies, H.; Pietzsch, H.J. Stannous Chloride in the Preparation of 99mTc Pharmaceuticals. In *Technetium-99m Pharmaceuticals*; Zolle, I., Ed.; Springer Berlin: Heidelberg, Germany, 2007; pp. 59–66.
- Saffari, H.; Krstyen, J.J.; Gonzalez, C.; Clayton, F.C.; Leiferman, K.M.; Gleich, G.J.; Peterson, K.A.; Pease, L.F. 99mTechnetium-labeled heparin: A new approach to detection of eosinophilic esophagitis-associated inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013, *132*, 1446–1448.
- 46. Dass, R.S.; Singh, A.K.; Chauhan, U.P. Development of a dextran kit for labelling with 99mTc and its evaluation for lymphoscintigraphy. *Nucl. Med. Biol.* **1993**, *20*, 701–706.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

## 4.2.3.2. Fonctionnalisation du fucoïdane

## 4.2.3.2.1. Amination du fucoïdane

Le marquage au gallium nécessite la présence au niveau de la structure du vecteur à marquer de groupements donneurs d'électrons. La saturation de la sphère de coordination du gallium est souhaitable étant donné que les complexes insaturés ont généralement une plus grande tendance à échanger le ligand ou à s'hydrolyser. La fixation est donc stable si le gallium est hexacoordonné. Le complexe ainsi formé peut résister *in vivo* à une probable transchélation par la transferrine qui présente une affinité élevée non seulement vis-à-vis du Fe<sup>3+</sup>, mais également vis-à-vis du Ga<sup>3+</sup>.

Les fucoïdanes purifiés obtenus sont riches en fucoses et en sulfates. Les sulfates sont des donneurs d'électrons mous, l'intensité d'association directe au gallium serait fort

4867

????

probablement faible. Il y aurait une compétition avec les OH<sup>-</sup> issus de l'eau ce qui pourra aboutir à une démétallation et une chélation du gallium par les protéines sanguines. Une fonctionnalisation du fucoïdane s'avère une étape indispensable dans la stratégie de développer un traceur gallié stable *in vivo*.

L'agent chélatant sélectionné est le NODAGA. Les dimensions de son site de chélation sont adaptées au rayon ionique du Ga<sup>3+</sup> (0,62Å), rendant possible un marquage à température ambiante. Nous avons choisi d'utiliser l'isothiocyanate de NODAGA commercial nécessitant donc l'ajout préalable de fonctions amines au niveau du polysaccharide.

L'amination sur l'extrémité réductrice du fucoïdane a été mise en place par Bachelet et coll. à l'Inserm U698 (l'actuel U1148). [242] Le protocole utilisé est une optimisation des méthodes décrites par Kondo et coll. [243] et Seo et coll. [244] L'ensemble des étapes est résumé au niveau de la figure suivante :



En bref, une molécule de 1-3, diaminopropane (DAP) est greffée à l'extrémité réductrice de la chaîne. Tout d'abord une liaison imine est formée entre l'aldéhyde en C1 de l'extrémité réductrice du polysaccharide et une amine du DAP. Cette liaison est ensuite réduite pour former une liaison amine.

## Formation de l'imine

5,4 mL d'une solution de diaminopropane à 1,5 M dans l'acide acétique glacial (pur) sont ajoutés dans un tube en verre contenant 500 mg de polysaccharides. Le tube est scellé et chauffé à 90°C pendant 3 h.

## Réduction de l'imine en amine

Après refroidissement du tube, 1,4 mL de solution de diméthylborane 3 M dans de l'acide acétique sont ajoutés. Le tube est de nouveau scellé, chauffé à 90°C pendant 3 h, refroidi puis neutralisé avec de la soude (NaOH).

## **Purification**

Le produit est ensuite dialysé dans un boudin de seuil de coupure 1000 Da, 5 fois contre un tampon carbonate 0,05M pH 9,6 et NaCl à 1 M, 5 fois contre un mélange eau/éthanol (4 :1) NaCl à 0,5 M et 5 fois contre de l'eau distillée. Enfin, le produit est congelé à -80°C et lyophilisé.

## Dosage spectrophotométrique des amines avec de l'o-phtalaldéhyde

Les fonctions amines sont quantifiées par un dosage spectrophotométrique à l'*o*phtalaldéhyde avec un spectrophotomètre UV-visible. On prépare deux solutions réactives A et B : la solution A est composée de 29,85 mL de tampon carbonate pH=10,8 et 0,15 mL de mercaptoéthanol et la solution B de 8 mg d'*o*-phtalaldéhyde dans 20 mL d'eau/éthanol 80/20. Une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution mère de bromopropylamine (BPA) 10 mM. Vingt milligrammes de fucoïdane sont séchés pendant 3 h à 50°C dans l'étuve à vide puis une solution de fucoïdane aminé à 10 mg/mL est préparée à partir de la masse de fucoïdane sèche récupérée. Cinq cent microlitres de cette solution sont ajoutés à 0,75 mL de solution A et 0,5 mL de solution B. Après 20 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance des échantillons est mesurée à  $\square=333$  nm.

La quantité de fonctions amine introduites a été évaluée en moyenne à deux fonctions pour trois chaines de fucoïdane par dosage spectrophotométrique UV à 333 nm avec de l'*o*-phtaldéhyde et de la bromopropylamine comme étalon.

### 4.2.3.2.2. Conjugaison du NODAGA au fucoïdane aminé

La conjugaison du NODAGA (Chematech, Dijon, France) avec le fucoïdane aminé s'effectue par formation d'une liaison thiourée selon le principe général décrit au niveau du Tableau 12 (réaction entre la fonction isothiocyanate (R-N=C=S) et la fonction amine à l'extrémité réductrice du fucoïdane).



La réaction de conjugaison s'est faite selon le mode opératoire suivant : 100 mg de fucoïdane aminé a été mélangé avec 132 mg de SCN-Bn-NODAGA dans 10mL de tampon NaHCO<sub>3</sub> 0,5M pH 9,6. L'ensemble est laissé sous agitation à +4°C pendant 24 heures.

L'élimination du NODAGA qui ne s'est pas conjugué au fuocïdane s'effectue par dialyse dans 4 solutions différentes. Pour chaque solution, 5 dialyses de 1h30 chacune sont effectuées dans 100 fois le volume réactionnel :

- 1- Tampon carbonate 0,05M, pH=9,6 et NaCl 1M ;
- 2- Eau/éthanol (4 :1) et NaCl 0,5M ;
- 3- Citrate 0,1M;
- 4- Eau bidistillée.

Le dialysat obtenu est congelé à -80°C puis lyophilisé. L'échantillon est ensuite analysé par RMN.

Les opérations de conjugaisons ont été effectuées par Pierre Saboural et par Romain Robert du laboratoire LVTS.





Le pic indiqué par une flèche à gauche correspond au signal de résonance des H du cycle aromatique du NODAGA. Ce pic est absent sur le spectre correspondant au fucoïdane non conjugué.

A la différence de l'étude décrite par Li et coll. où le marquage s'effectue d'une façon aléatoire sur un fucoïdane brut [245], dans notre étude la fonctionnalisation permet de définir structurellement les sites de complexation du gallium. Le fucoïdane utilisé par Li et coll. est par ailleurs celui de Sigma Aldrich. Les produits en question présentent une grande variabilité de poids moléculaires (de 20 à 170 kDa) d'un lot à un autre. Ceci constitue un frein à la reproductibilité. L'utilisation d'un fucoïdane bien caractérisé et de structure bien définie est une condition *sine qua none* pour obtenir un marquage de matière première à usage pharmaceutique pour un futur usage clinique.

Une étude comparative des produits de marquage issus de notre méthode et de celle décrite par Li et coll. permettrait de mettre plus en évidence les avantages cités. Cette nécessité a été mise en évidence par Chollet et coll dans une revue consacrée à l'usage du fucoïdane en nanomédecine. [246]

## 4.2.3.3. Marquage de l'Asphy-Nodaga au gallium 68

Le marquage de l'Asphy-NODAGA (n=4) s'est effectué en mélangeant 100 nmoles de vecteur avec 800µL d'une solution acétate d'ammonium 1M pH 4,4. L'élution a eu lieu directement dans le flacon de réaction en utilisant la méthode d'élution fractionnée optimisée décrite dans la première partie des travaux de thèse.

Le contrôle de la pureté radiochimique s'est fait par radio-HPLC en exclusion stérique. Une chaîne CLHP Dionex Ultimate 3000 a été utilisée (pompe quaternaire LPG-3400 SD DIONEX, échantillonneur automatique WPS-3000 SL DIONEX, un détecteur à barrette de diodes DAD-3000 DIONEX, un four à colonnes TCC-3000 DIONEX) et un détecteur de radioactivité HERM LB 500 de Berthold, couplé en série avec la chaîne de chromatographie liquide. Les conditions chromatographiques suivantes ont été utilisées : colonne d'exclusion stérique Shodex OHpak SB-802.5 HQ (8mm de diamètre interne  $\times$  300mm de longueur) ; une phase mobile : NaNO<sub>3</sub> 0,1M. Débit 0,45 mL/min.

Les pH des produits finis ont été contrôlés par papier pH (pH=4)

La spécificité du marquage au niveau du NODAGA a pu être vérifiée en réalisant dans les mêmes conditions un marquage du fucoïdane aminé mais non conjugué au chélatant.

Les chromatogrammes suivants ont été obtenus :



La méthode de marquage utilisée a permis d'obtenir des fucoïdanes marqués au <sup>68</sup>Ga avec une activité spécifique moyenne ( $\pm$ sd) de 5,0  $\pm$  0,1 MBq/nmole et une PRC de 90,1  $\pm$  1,6 % sans purification post-marquage.

La stabilité du marquage à température ambiante a été testée 2 heures après le marquage. La pureté radiochimique du <sup>68</sup>Ga-NODAGA-Asphy reste inchangée.

## 4.2.3.4. Expérimentation sur un modèle d'endocardite

Le modèle expérimental d'activation plaquettaire et de thrombus utilisé est celui de l'endocardite infectieuse chez le rat Wistar. [247]

Les modèles sont réalisés par Liliane Louedec dans l'unité Inserm U698 en deux temps :

- mise en place d'un cathéter stérile de polyéthylène (PE10) dans le ventricule gauche par voie carotidienne.

La lésion endothéliale engendrée par le cathéter laissé en place entraine l'exposition de la matrice extracellulaire sous-jacente ce qui conduit à l'adhésion des plaquettes et leur activation. [248] Ceci a pour conséquence la formation de végétations thrombotiques aseptiques.

- Injection 24 heures après au niveau de la jugulaire gauche d'un inoculum bactérien (*Enterococcus faecalis*) qui colonise alors les végétations aseptiques préformées à l'extrémité du cathéter.

La colonisation bactérienne ainsi obtenue a pour conséquence de renforcer l'activité biologique du thrombus. [249] Lors de l'activation plaquettaire, le récepteur de fibrinogène GPIIb / IIIa subit un changement conformationnel permettant sa liaison au fibrinogène

soluble. Parallèlement, le contenu des granules cytoplasmiques est libéré, déclenchant l'activation d'autres plaquettes qui sont ensuite recrutés dans le thrombus. [248]

Quatre-vingt MBq de <sup>68</sup>Ga-NODAGA-Asphy ont été injectés. L'acquisition s'est faite avec une microTEP Mosaic HP, Philips une heure post-injection pendant 10 minutes. Les images suivantes ont été obtenues :



Le sacrifice a eu lieu 3 heures post-injection et montre une végétation sur la pointe et plusieurs végétations le long de l'aorte et de la valve aortique.

Les premières images obtenues sont encourageantes. Une analyse parallèle en autoradiographie est nécessaire pour confirmer la localisation du traceur sur les végétations. Une manipulation d'immunohistochimie utilisant des anticorps anti P-sélectine marqués à la péroxydase doit être entreprise afin de vérifier la colocalisation de la P-sélectine et du <sup>68</sup>Ga-NODAGA-Asphy.

## CHAPITRE 5. DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Pour pouvoir développer des traceurs marqués au gallium 68 à Bichat Claude Bernard, la première étape indispensable a été de caractériser les générateurs et leurs éluats afin de s'assurer de la qualité de la matière première utilisée pour le marquage des différents vecteurs d'intérêt. En fonction de la qualité de l'éluat obtenu, la mise en place de méthodes de prépurification et/ou concentration de l'éluat a été un prérequis nécessaire au développement des traceurs TEP.

- Lorsque l'éluat n'est pas conforme aux spécifications de la pharmacopée européenne (éluat d'un générateur de qualité chimique), des méthodes de prépurification cationique ou anionique, préalablement décrites dans la littérature ont été adaptées pour une production automatique par module de synthèse. Une validation plus poussée de la méthode de prépurification cationique (dossiers de lots et validation microbiologique du processus de production) a été réalisée ce qui nous a permis d'obtenir l'autorisation de l'ANSM pour l'utilisation de cette méthode dans le cadre d'un essai clinique multicentrique.

Une nouvelle méthode de purification anionique utilisant le NaCl comme source de chlorures à la place des solutions d'acide chlorhydrique concentrées a été mise en place. Elle permet contrairement à toutes les autres méthodes anioniques préalablement utilisées de réaliser les opérations d'élution-anionisation-chargement sur l'échangeur anionique en une seule étape. Son utilisation a permis de s'affranchir des inconvénients des méthodes anioniques et de réaliser des marquages de peptides DOTA et NODAGA conjugués avec des puretés radiochimiques > 99%.

- avec l'arrivée sur le marché des générateurs de qualité pharmaceutique, nous avons opté pour la mise en place de méthodes permettant de s'affranchir de l'utilisation de modules de synthèses. Le but étant d'élargir la possibilité d'utiliser ces méthodes à des centres non pourvus d'un tel équipement onéreux. La méthode d'élution fractionnée déjà décrite dans la littérature mais entrainant des pertes considérables de l'activité de <sup>68</sup>Ga a été optimisée. Plus de 90% de l'activité disponible dans les générateurs a pu être concentrée dans un volume de ~ 2 mL. Cette méthode a été utilisée avec succès pour le marquage d'un polysaccharide et d'un peptide conjugués au NODAGA.

- Dans l'optique de mettre en place une méthode de marquage pouvant être appliquée manuellement aux vecteurs formulés sous forme de kits sans entraîner l'exposition des extrémités du préparateur aux rayonnements ionisants, une méthode d'élution-marquage sous vide a été mise en place. Son utilisation a permis de concentrer plus de 95% de l'activité

????

disponible dans le générateur dans un volume de 2,5 mL et de marquer des peptides conjugués au DOTA ou au NODAGA avec des puretés radiochimiques > 97%.

- Enfin, et afin de faciliter les validations précliniques *in vitro* et *in vivo* des vecteurs marqués au gallium 68, l'utilisation d'un isotope de gallium de période plus longue nous a paru nécessaire. Nous avons alors automatisé une méthode permettant de récupérer quantitativement (>85%) du chlorure de gallium 67 à partir de son complexe de citrate de gallium dans des volumes < 1mL. Le <sup>67</sup>Ga<sup>3+</sup> ainsi récupéré est directement utilisable pour le marquage des vecteurs d'intérêt.

La mise en place de cette « plate-forme » de marquage au <sup>68</sup>Ga nous a permis de s'attaquer aux développements de traceurs galliés pour l'imagerie TEP :

- La validation de la production automatique du <sup>68</sup>Ga-DOTANOC avec la méthode de purification cationique de l'éluat nous a permis d'obtenir les autorisations réglementaires pour participer à l'essai clinique multicentrique « Etude diagnostique comparative multicentrique et prospective de la TEP/TDM au <sup>68</sup>Ga-DOTANOC et des procédures d'imagerie conventionnelle (scintigraphie à l'OctréoScan® et TDM/IRM) dans le bilan des tumeurs endocrines gastro-entéro-pancréatiques ». Les résultats préliminaires obtenus chez 29 patients ayant des tumeurs endocrines digestives différenciées, ont démontré la supériorité diagnostique de la TEP/TDM au <sup>68</sup>Ga-DOTANOC par rapport à l'imagerie conventionnelle à l'<sup>111</sup>In-pentétréotide et au scanner. Le <sup>68</sup>Ga-DOTANOC a permis de détecter des lésions supplémentaires non mises en évidence par les autres modalités d'imagerie. Suite à la clôture de l'essai clinique, la prise en charge des patients pour les mêmes indications a pu continuer dans le cadre d'Autorisations Temporaires d'Utilisations nominatives délivrées par l'ANSM. Ceci permet de répondre à un besoin clinique considérable pour la prise en charge de patients atteints de TNE, Bichat Claude Bernard étant seulement le deuxième centre à proposer cet examen en île de France.

Ce projet nous a permis de nous positionner auprès des autorités entant que centre producteur de médicaments expérimentaux marqués au gallium 68, ce qui nous permettra de s'attaquer sereinement à la mise en place de nouveaux projets cliniques envisagés dans le futur comme par exemple l'utilisation du <sup>68</sup>Ga-PSMA pour l'exploration des cancers de prostate ou encore le projet **iVasc (Innovation in VASCular SCience)** qui prévoie au sein du DHU-FIRE (Département Hospitalo-Universitaire Fibrosis Inflammation REmodeling in cardiovascular, respiratory and renal diseases) l'utilisation du <sup>68</sup>Ga-DOTATATE pour l'imagerie de la

progression précoce de l'athérosclérose coronarienne. Ce projet vient d'obtenir un financement dans le cadre de PIA3 (Programme d'Investigation d'Avenir).

- Parallèlement au projet clinique, nous nous sommes intéressé au marquage du même peptide (NOC) mais conjugué à un chélateur chimiquement plus intéressant : le NODAGA. Deux méthodes ont été testées avec le NODAGANOC : l'élution fractionnée optimisée et l'élution sous-vide. Les tampons utilisés pour un marquage à température ambiante sont disponibles dans le commerce sous forme de matière première de qualité pharmaceutique. Les produits de marquage obtenus ont des PRC > 95% et peuvent donc être utilisés directement sans purification supplémentaire. L'affinité nanomolaire (CI<sub>50</sub>=1,2 ±0.5nM) du NODAGANOC mis en compétition avec le <sup>68</sup>Ga-DOTANOC sur des cellules surexprimant les sst<sub>1, 2, 3 et 5</sub> en font un traceur d'intérêt pour l'imagerie des récepteurs de la somatostatine. Des essais d'affinité sur des récepteurs isolés seront nécessaires pour une comparaison avec les autres analogues de la somatostatine utilisés en clinique. Sa validation sur un modèle de tumeur neuroendocrine et de pathologie cardiovasculaire avec une composante inflammatoire (athérosclérose, myocardite) sera faite dans le futur. La praticité de la méthode de marquage mise en place fait du NODAGANOC un candidat potentiel pour le développement d'un kit radiopharmaceutique.

- Pour le ciblage de la PS, afin de sélectionner le vecteur le plus intéressant pour le développement d'un traceur TEP, une comparaison a été effectuée entre l'Annexine A5 et un mutant fabriqué selon les BPF (Annexine V-128). Ce travail a permis de démontrer que la valeur diagnostique des deux formes est comparable. Cependant, il n'y a pas de diminution des captations non spécifiques pour l'annexine V-128. L'absence de supériorité de ce variant et tous les inconvénients communs aux protéines (complexité et coût de production, immunogénicité, faible stabilité, fixation hépatique et rénale élevées...) ont fait pencher notre choix plutôt pour le développement d'un peptide pour l'imagerie TEP de la PS. Le peptide sélectionné par technique de Phage Display a été choisi sur la base des données d'affinité et de stabilité. Le peptide a été synthétisé, couplé à un espaceur et conjugué au NODAGA avec une haute pureté chimique. Les études d'affinité en compétition avec l'Annexine V ont démontré que la nouvelle structure obtenue (P04087) et complexée au galium naturel garde une affinité du même ordre que la structure peptidique de base. Le produit synthétisé a été marqué au gallium 68 grâce à la méthode de purification anionique associée à l'élution fractionnée et aussi au gallium 67 obtenu avec la méthode préalablement mise en place. L'autoradiographie positive sur un modèle d'endocardite et confirmée par les études histologiques ne concorde cependant pas avec l'absence de signal au niveau des images. Par ailleurs, le produit radiomarqué passe en moins de 5 minutes au niveau de la vessie. Des modifications chimiques doivent être donc apportées à la structure de ce peptide en vue d'améliorer sa pharmacocinétique. Aussi et avec l'obtention des autorisations pour démarrer un essai clinique avec l'Annexin V-128 (Etude Clinique **AnnIE** : « Evaluation de la rhAnnexine V-128 radiomarquée dans le diagnostic de l'endocardite infectieuse et de ses complications emboliques », si la sensibilité du radiotraceur technétié dans la détection des thrombi intra-luminaux (ILT), comparativement à l'imagerie de référence s'avère significativement supérieure, le développement de l'Annexin V-128 pour l'imagerie TEP pourrait éventuellement être envisagé. Un financement vient d'être obtenu dans le cadre de PAI3 pour ce projet.

- Pour le ciblage de la P-sélectine, le développement du fucoïdane pour l'imagerie TEP de l'activation endothéliale et de l'activation plaquettaire nécessitait au préalable une meilleure caractérisation de sa structure. Ce polysaccharide est un extrait commercial d'algue brune mimant l'épitope de liaison du PSGL-1, principal ligand de la P-sélectine, à sa cible naturelle. Un travail initial de purification a été effectué sur les produits d'extraction et a permis de réduire la composition de la structure en acides uroniques probablement responsables des fixations hépato-spléniques non spécifiques. Le produit s'est trouvé en contrepartie enrichi en fucoses et en sulfates, composantes essentielles à son activité biologique. Contrairement aux marquages de fucoïdane décrits dans la littérature [245] et qui se font sur le produit brut disponible dans le commerce et présentant des variabilités considérables d'un lot à un autre, nous n'avons entrepris une fonctionnalisation du polysaccharide et sa conjugaison au NODAGA qu'à partir de lots reproductibles et validés comme tels. Le marquage au gallium 68 a été réalisé avec l'élution fractionnée optimisée et a permis d'avoir des produits de puretés radiochimiques de 90%, stables pendant 2 heures. Les résultats préliminaires sur un modèle d'endocardite sont encourageants. La technique de marquage décrite est simple et peut être utilisée pour le marquage de vecteurs formulés en kits. Un changement de la formulation en ajoutant un stabilisant comme l'acide ascorbique peut bien améliorer la pureté radiochimique et la stabilité de la préparation. [100] Un marquage dans un milieu plus acide pourrait également améliorer le marquage. Pour ce faire, une conjugaison du fucoïdane aminé à une autre cage (TRAP-Pr) [250] est envisagé ainsi que des études comparatives avec le Fuco-NODAGA. Une formulation sous forme de kit sera également entreprise.

## **CONCLUSION GÉNÉRALE**

Au total, les travaux de cette thèse ont permis de mettre en place une « plate-forme » de marquage au <sup>68</sup>Ga avec différentes méthodes pouvant être utilisées avec une matière première de qualité aussi bien chimique (méthodes de prépurification de l'éluat) que pharmaceutique (méthodes de marquage direct). Cette « plate-forme » a permis le développement des traceurs suivants: 1) Analogues de la somatostatine ciblant les SSTR : a) <sup>68</sup>Ga-DOTANOC b) <sup>68</sup>Ga-NODAGANOC 2) Un peptide ciblant la PS : le <sup>68</sup>Ga-P04087 ; 3) Un polysaccharide ciblant la P-sélectine : <sup>68</sup>Ga-NODAGA-Asphy.

Le radiomarquage et l'utilisation chez l'homme du <sup>68</sup>Ga-DOTANOC ont été validés dans le cadre d'un essai clinique multicentrique pour l'imagerie des TNE-GEP. Il s'agit du premier essai à Bichat Claude Bernard utilisant un <sup>68</sup>Ga-traceur. Le <sup>68</sup>Ga-NODAGANOC a été testé *in vitro* sur des cellules d'adénocarcinome pancréatique. Cette validation initiale des analogues de la somatostatine dans son application la plus fréquente (donc oncologique) nous facilitera le passage vers des applications cardiovasculaires futures (athérosclérose, myocardite...). Le <sup>68</sup>Ga-NODAGANOC constitue par ailleurs un candidat chimiquement intéressant pour le développement futur d'un kit se prêtant à un marquage à température ambiante.

Le <sup>68</sup>Ga-P04087 bien que présentant des avantages liés à sa nature peptidique, requiert des modifications structurales en vue d'améliorer sa pharmacocinétique et son affinité pour la PS. En effet, l'autoradiographie positive sur un modèle d'endocardite infectieuse et confirmée par les études histologiques ne concorde pas avec l'absence de signal au niveau des images. Le ciblage de la PS pour une application en imagerie TEP pourrait être plus concluant avec l'Annexine V-128. En effet, malgré tous les inconvénients qui incombent à sa nature protéique, la valeur diagnostique de la molécule technétiée équivalente à celle de l'annexine V, la disponibilité de ce variant sous forme GMP, l'obtention récente des autorisations en vue de son utilisation en TEMP clinique et le résultat positif des images obtenues chez les premiers patients confortant la preuve de concept, constituent des avantages considérables pour un futur développement en TEP.

Le <sup>68</sup>Ga-NODAGA-Asphy a été testé avec succès en préclinique sur un modèle d'endocardite infectieuse chez le rat. Le passage chez l'homme requiert une formulation à base de matières premières bien caractérisées et surtout à usage pharmaceutique. Des travaux visant à mieux caractériser la structure du fucoïdane sont en cours. Une formulation sous forme de kit est également envisagée.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- [1] I. Velikyan, "Prospective of <sup>68</sup>Ga-radiopharmaceutical development," *Theranostics*, vol. 4, no. 1, pp. 47–80, 2013.
- [2] E. C. Korngold, F. A. Jaffer, R. Weissleder, and D. E. Sosnovik, "Noninvasive imaging of apoptosis in cardiovascular disease," *Heart Fail. Rev.*, vol. 13, no. 2, pp. 163–173, Jun. 2008.
- [3] *Larousse Médical*. http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/imagerie\_moléculaire/185288. Consulté le 20 Juil. 2016.
- [4] I. Velikyan, Gallium-68 for the Labelling of Peptides and Oligonucleotides. VDM Verlag, 2009.
- [5] L. W. Dobrucki and A. J. Sinusas, "Molecular imaging. A new approach to nuclear cardiology," Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging Off. Publ. Ital. Assoc. Nucl. Med. AIMN Int. Assoc. Radiopharmacol. IAR Sect. Soc. Radiopharm. Chem. Biol., vol. 49, no. 1, pp. 106–115, Mar. 2005.
- [6] C. F. Ramogida and C. Orvig, "Tumour targeting with radiometals for diagnosis and therapy," *Chem. Commun.*, vol. 49, no. 42, pp. 4720–4739, Apr. 2013.
- [7] O. de Dreuille, P. Maszelin, H. Foehrenbach, G. Bonardel, and J.-F. Gaillard, "Principe et technique de la tomographie par émission de positons (TEP)," *EMC - Radiol.*, vol. 1, no. 1, pp. 2–35, Feb. 2004.
- [8] N. Grenier and P. Brader, "Principles and basic concepts of molecular imaging," *Pediatr. Radiol.*, vol. 41, no. 2, pp. 144–160, Feb. 2011.
- [9] R. Trébossen, "Innovations technologiques récentes en détection pour la Tomographie par Emission de Positons," *Médecine Nucl.*, vol. 31, no. 4, pp. 126–131, Apr. 2007.
- [10] P. Zanzonico, "Positron emission tomography: a review of basic principles, scanner design and performance, and current systems," *Semin. Nucl. Med.*, vol. 34, no. 2, pp. 87–111, Apr. 2004.
- [11] I. Velikyan, Gallium-68: Production and Imaging Agent Development: Biological, Clinical and Technological Applications of Gallium-68 Based Tracers. Saarbrücken: VDM Verlag Dr. Müller, 2009.
- F. Roesch, "Scandium-44: benefits of a long-lived PET radionuclide available from the (44)Ti/(44)Sc generator system," *Curr. Radiopharm.*, vol. 5, no. 3, pp. 187–201, Jul. 2012.
- [13] D. V. Filosofov, N. S. Loktionova, and F. Rösch, "A 44Ti/44Sc radionuclide generator for potential application of 44Sc-based PET-radiopharmaceuticals," *Radiochim. Acta*, vol. 98, no. 3, Jan. 2010.
- [14] N. S. Loktionova, "Development and evaluation of a 44Ti/44Sc radionuclide generator and labeling of biomolecules with 44Sc and 68Ga for PET imaging.," Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, Institut für Kernchemie, 2010.
- [15] Z. Pu, J. Yang, and X. Kong, "Cross-section measurements for (n, 2n), (n, p) and (n, n'alpha) reactions on gallium isotopes in the neutron energy range of 13.5-14.6 MeV,"

Appl. Radiat. Isot. Data Instrum. Methods Use Agric. Ind. Med., vol. 58, no. 6, pp. 723–726, Jun. 2003.

- [16] K. Vaughan, A. H. Sher, and B. D. Pate, "The decay of 68Cu and 68Ga," Nucl. Phys. A, vol. 132, no. 3, pp. 561–570, Aug. 1969.
- [17] M. D. Bartholomä, A. S. Louie, J. F. Valliant, and J. Zubieta, "Technetium and gallium derived radiopharmaceuticals: comparing and contrasting the chemistry of two important radiometals for the molecular imaging era," *Chem. Rev.*, vol. 110, no. 5, pp. 2903–2920, May 2010.
- [18] C. Morgat *et al.*, "A phantom-based method to standardize dose-calibrators for new □+emitters," *Nucl. Med. Commun.*, vol. 36, no. 2, pp. 201–206, Feb. 2015.
- [19] AIEA, Production of Long Lived Parent Radionuclides for Generators: 68Ge, 82Sr, 90Sr and 188W. Vienna: United Nations Pubns, 2010.
- [20] AIEA, "Charged particle cross-section database for medical radioisotope production: Diagnostic radioisotopes and monitor reactions." IAEA-TECDOC-I211, Vienna-2001.
- [21] P. J. Pao, D. J. Silvester, and S. L. Waters, "A new method for the preparation of68Gagenerators following proton bombardment of gallium oxide targets," *J. Radioanal. Chem.*, vol. 64, no. 1–2, pp. 267–272, Mar. 1981.
- [22] G. I. Gleason, "A positron cow," Int. J. Appl. Radiat. Isot., vol. 8, no. 2–3, pp. 90–94, Jul. 1960.
- [23] G. E. Meinken, S. Kurczak, L. F. Mausner, K. L. Kolsky, and S. C. Srivastava, "Production of high specific activity 68Ge at Brookhaven National Laboratory," J. Radioanal. Nucl. Chem., vol. 263, no. 2, pp. 553–557, Jan. 2005.
- [24] W.-L. Cheng, Y. Jao, C.-S. Lee, and A.-R. Lo, "Preparation of 68Ge/68Ga Generator with a Binary Ga/Ag Electrodepositions as Solid Target," J. Radioanal. Nucl. Chem., vol. 245, no. 1, pp. 25–30, Jul. 2000.
- [25] C. Loc'h, B. Maziere, D. Comar, and R. Knipper, "A new preparation of germanium 68," Int. J. Appl. Radiat. Isot., vol. 33, no. 4, pp. 267–270, Apr. 1982.
- [26] K. Aardaneh, K. Aardaneh, K. Aardaneh, T. N. van der Walt, T. N. van der Walt, and T. N. van der Walt, "Ga2O for target, solvent extraction for radiochemical separation and SnO2for the preparation of a68Ge/68Ga generator," *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, vol. 268, no. 1, pp. 25–32, Apr. 2006.
- [27] I. Velikyan, G. J. Beyer, and B. Långström, "Microwave-supported preparation of (68)Ga bioconjugates with high specific radioactivity," *Bioconjug. Chem.*, vol. 15, no. 3, pp. 554–560, Jun. 2004.
- [28] R. Chakravarty, R. Shukla, R. Ram, A. K. Tyagi, A. Dash, and M. Venkatesh, "Development of a nano-zirconia based 68Ge/68Ga generator for biomedical applications," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 38, no. 4, pp. 575–583, May 2011.
- [29] AFSSA, "Lignes directrices pour l'évaluation des échangeurs d'ions utilisés pour le traitement d'eau destinée à la consommation humaine." Décembre-2009.
- [30] F. Rösch, "Past, present and future of 68Ge/68Ga generators," Appl. Radiat. Isot. Data Instrum. Methods Use Agric. Ind. Med., vol. 76, pp. 24–30, Jun. 2013.

- [31] J. Schuhmacher and W. Maier-Borst, "A new 68Ge/68Ga radioisotope generator system for production of 68Ga in dilute HCl," *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, vol. 32, no. 1, pp. 31–36, Jan. 1981.
- [32] M. Nakayama, M. Haratake, M. Ono, T. Koiso, K. Harada, H. Nakayama, S. Yahara, Y.Ohmomo, and Y. Arano, "A new 68Ge/68Ga generator system using an organic polymer containing N-methylglucamine groups as adsorbent for 68Ge," *Appl. Radiat. Isot.*, vol. 58, no. 1, pp. 9–14, Jan. 2003.
- [33] B. Bao and M. Song, "A new68Ge/68Ga generator based on CeO2," J. Radioanal. Nucl. Chem., vol. 213, no. 4, pp. 233–238, Jul. 1996.
- [34] E. Eppard, N. S. Loktionova, and F. Rösch, "Quantitative online isolation of 68Ge from 68Ge/68Ga generator eluates for purification and immediate quality control of breakthrough," *Appl. Radiat. Isot.*, vol. 82, pp. 45–48, Dec. 2013.
- [35] F. Rösch and F. F. (Russ) Knapp, "Radionuclide Generators," in *Handbook of nuclear chemistry*, Second edition., vol. 4, 6 vols., Springer, 2010, pp. 1935–1976.
- [36] F. Rösch, "68Ge/68Ga generators and 68Ga radiopharmaceutical chemistry on their way into a new century," J Postgrad Med., vol. 47, pp. 18–25, Mar. 2013.
- [37] Q. C. Le, "Caractérisation des interactions entre le dioxyde de titane et les phospholipides en milieux aqueux," Thèse de doctorat, Nantes, 2014.
- [38] W. J. Maeck, M. E. Kussy, and J. E. Rein, "Adsorption of the Elements on Inorganic Ion Exchangers from Nitrate Media.," *Anal. Chem.*, vol. 35, no. 13, pp. 2086–2090, Dec. 1963.
- [39] A. Du Moulinet d'Hardemare, "Radiochimie du gallium." FORAMEN/SFMN, Sep-2013.
- [40] K. P. Zhernosekov, D. V. Filosofov, R. P. Baum, P. Aschoff, H. Bihl, A. A. Razbash, M. Jahn, M. Jennewein, and F. Rösch., "Processing of generator-produced 68Ga for medical application," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 48, no. 10, pp. 1741–1748, Oct. 2007.
- [41] E. Pharmacopeia, "Gallium (68Ga) Chloride Solution for Radiolabelling. Monograph. N° 2464, 23, 3, 508–509." 2011.
- [42] D. Mueller, I. Klette, and R. P. Baum, "Purification and labeling strategies for (68)Ga from (68)Ge/ (68)Ga generator eluate," *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Prog. Dans Rech. Sur Cancer*, vol. 194, pp. 77–87, 2013.
- [43] W. A. P. Breeman, M. de Jong, E. de Blois, B. F. Bernard, M. Konijnenberg, and E. P. Krenning, "Radiolabelling DOTA-peptides with 68Ga," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 32, no. 4, pp. 478–485, Apr. 2005.
- [44] E. de Blois, H. Sze Chan, C. Naidoo, D. Prince, E. P. Krenning, and W. A. P. Breeman, "Characteristics of SnO2-based 68Ge/68Ga generator and aspects of radiolabelling DOTA-peptides," *Appl. Radiat. Isot. Data Instrum. Methods Use Agric. Ind. Med.*, vol. 69, no. 2, pp. 308–315, Feb. 2011.
- [45] M. Gabriel, C. Decristoforo, D. Kendler, G. Dobrozemsky, D. Heute, C. Uprimny, P. Kovacs, E. Von Guggenberg, R. Bale, and I. J. Virgolini, "68Ga-DOTA-Tyr3-octreotide PET in neuroendocrine tumors: comparison with somatostatin receptor scintigraphy and CT," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 48, no. 4, pp. 508–518, Apr. 2007.

- [46] R. Ben Azzouna, F. Alshoukr, S. Leygnac, A. Guez, W. Gonzalez, O. Rousseaux, D. Guilloteau, and D. Le Guludec, "A new 68Ga anionic concentration and purification method for automated synthesis of [68Ga]-DOTA or NODAGA conjugated peptides in high radiochemical purity," *J. Label. Compd. Radiopharm.*, vol. 58, no. 10, pp. 403–410, Aug. 2015.
- [47] M. Asti, G. De Pietri, A. Fraternali, E. Grassi, R. Sghedoni, F. Fioroni, F. Roesch, A. Versari, and D. Salvo, "Validation of (68)Ge/(68)Ga generator processing by chemical purification for routine clinical application of (68)Ga-DOTATOC," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 35, no. 6, pp. 721–724, Aug. 2008.
- [48] M. Ocak, M. Antretter, R. Knopp, F. Kunkel, M. Petrik, N. Bergisadi, and C. Decristoforo, "Full automation of (68)Ga labelling of DOTA-peptides including cation exchange prepurification," *Appl. Radiat. Isot. Data Instrum. Methods Use Agric. Ind. Med.*, vol. 68, no. 2, pp. 297–302, Feb. 2010.
- [49] F. Belosi, G. Cicoria, F. Lodi, C. Malizia, S. Fanti, S. Boschi, and M. Marengo, "Generator breakthrough and radionuclidic purification in automated synthesis of 68Ga-DOTANOC," *Curr. Radiopharm.*, vol. 6, no. 2, pp. 72–77, Jun. 2013.
- [50] F. W. Strelow, "Distribution coefficients and ion-exchange selectivities for 46 elements with a macroporous cation-exchange resin in hydrochloric acid-acetone medium," *Talanta*, vol. 35, no. 5, pp. 385–395, May 1988.
- [51] M. Fani, J. P. André, and H. R. Maecke, "68Ga-PET: a powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals," *Contrast Media Mol. Imaging*, vol. 3, no. 2, pp. 67–77, Apr. 2008.
- [52] D. Mueller, I. Klette, R. P. Baum, M. Gottschaldt, M. K. Schultz, and W. A. P. Breeman, "Simplified NaCl based (68)Ga concentration and labeling procedure for rapid synthesis of (68)Ga radiopharmaceuticals in high radiochemical purity," *Bioconjug. Chem.*, vol. 23, no. 8, pp. 1712–1717, Aug. 2012.
- [53] M. Petrik, M. Ocak, M. Rupprich, and C. Decristoforo, "Impurity in (68)Ga-peptide preparation using processed generator eluate," J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med., vol. 51, no. 3, p. 495; author reply 495-496, Mar. 2010.
- [54] E. Eppard, M. Wuttke, P. L. Nicodemus, and F. Rösch, "Ethanol-Based Postprocessing of Generator-Derived <sup>68</sup>Ga Toward Kit-Type Preparation of <sup>68</sup>Ga-Radiopharmaceuticals," J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med., vol. 55, no. 6, pp. 1023–1028, Jun. 2014.
- [55] G.-J. Meyer, H. Mäcke, J. Schuhmacher, W. H. Knapp, and M. Hofmann, "68Galabelled DOTA-derivatised peptide ligands," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 31, no. 8, pp. 1097–1104, Aug. 2004.
- [56] Müller, D., Klette, I., and Baum, R. P., "The combined cationic-anionic purification of the 68Ge/68Ga generator eluate for the labeling of fragile peptides.," *World J. Nucl. Med*, vol. 10, pp. 77–78, 2011.
- [57] M. K. Schultz, D. Mueller, R. P. Baum, G. Leonard Watkins, and W. A. P. Breeman, "A new automated NaCl based robust method for routine production of gallium-68 labeled peptides," *Appl. Radiat. Isot. Data Instrum. Methods Use Agric. Ind. Med.*, vol. 76, pp. 46–54, Jun. 2013.

- [58] A. Du Moulinet d'Hardemare and O. Jarjayes, "Gallium, indium et thallium. Eléments de post-transition du groupe 13," in *Radiopharmaceutiques: chimie des radiotraceurs et applications biologiques*, Presses Universitaires de Grenoble, 1998, pp. 231–248.
- [59] S. M. Moerlein and M. J. Welch, "The chemistry of gallium and indium as related to radiopharmaceutical production," *Int. J. Nucl. Med. Biol.*, vol. 8, no. 4, pp. 277–287, 1981.
- [60] R. E. Weiner and M. L. Thakur, "Chemistry of gallium and indium radiopharmaceuticals," in *Handbook of Radiopharmaceuticals*, John Wiley & Sons., Michael J. Welch and Carol S. Redvanly, 2003, pp. 363–399.
- [61] M. A. Green and M. J. Welch, "Gallium radiopharmaceutical chemistry," *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B*, vol. 16, no. 5, pp. 435–448, 1989.
- [62] National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Research Center for Deep Geological Environments, Naoto TAKENO, "Atlas of Eh-pH diagrams Intercomparison of thermodynamic databases Geological Survey of Japan Open File Report No.419." May-2005.
- [63] E. Verron, J. M. Bouler, and J. C. Scimeca, "Gallium as a potential candidate for treatment of osteoporosis," *Drug Discov. Today*, vol. 17, no. 19–20, pp. 1127–1132, Oct. 2012.
- [64] P. Benézéth, I. I. Diakonov, G. S. Pokrovski, J.-L. Dandurand, J. Schott, and I. L. Khodakovsky, "Gallium speciation in aqueous solution. Experimental study and modelling: Part 2. Solubility of □-GaOOH in acidic solutions from 150 to 250°C and hydrolysis constants of gallium (III) to 300°C," *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 61, no. 7, pp. 1345–1357, Apr. 1997.
- [65] Q. Zhou, C. Henoumont, L. Vander Elst, S. Laurent, and R. N. Muller, "NMR determination of free gallium(III) ions in aqueous solutions of Ga complexes, 'cold' analogs of PET/SPECT tracers," *Contrast Media Mol. Imaging*, vol. 6, no. 3, pp. 165– 167, Jun. 2011.
- [66] T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman, and C. J. Anderson, "Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease," *Chem. Rev.*, vol. 110, no. 5, pp. 2858–2902, May 2010.
- [67] Y. Sun, C. J. Anderson, T. S. Pajeau, D. E. Reichert, R. D. Hancock, R. J. Motekaitis, A. E. Martell, and M. J. Welch, "Indium (III) and gallium (III) complexes of bis(aminoethanethiol) ligands with different denticities: stabilities, molecular modeling, and in vivo behavior," J. Med. Chem., vol. 39, no. 2, pp. 458–470, Jan. 1996.
- [68] W. R. Harris and V. L. Pecoraro, "Thermodynamic binding constants for gallium transferrin," *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 22, no. 2, pp. 292–299, Jan. 1983.
- [69] E. W. Price and C. Orvig, "Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 43, no. 1, pp. 260–290, 2014.
- [70] S. K. Sahoo, R. kanta Bera, B. K. Kanungo, and M. Baral, "Spectroscopic and pHmetric studies on the complexation of a novel tripodal amine-phenol ligand towards Al(III), Ga(III) and In(III)," *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 89, pp. 322–328, Apr. 2012.

- [71] G. Bandoli, A. Dolmella, F. Tisato, M. Porchia, and F. Refosco, "Mononuclear sixcoordinated Ga(III) complexes: A comprehensive survey," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 253, no. 1–2, pp. 56–77, Jan. 2009.
- [72] B. M. Zeglis and J. S. Lewis, "A practical guide to the construction of radiometallated bioconjugates for positron emission tomography," *Dalton Trans. Camb. Engl. 2003*, vol. 40, no. 23, pp. 6168–6195, Jun. 2011.
- [73] S. Kojima and M. Jay, "Comparisons of labeling efficiency, biological activity and biodistribution among 125I-, 67Ga-DTPA-and 67Ga-DFO-lectins," *Eur. J. Nucl. Med.*, vol. 13, no. 7, pp. 366–370, Oct. 1987.
- [74] E. Boros, C. L. Ferreira, D. T. T. Yapp, R. K. Gill, E. W. Price, M. J. Adam, and C. Orvig, "RGD conjugates of the H2dedpa scaffold: synthesis, labeling and imaging with 68Ga," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 39, no. 6, pp. 785–794, Aug. 2012.
- [75] M. Eder, B. Wängler, S. Knackmuss, F. LeGall, M. Little, U. Haberkorn, W. Mier, and M. Eisenhut, "Tetrafluorophenolate of HBED-CC: a versatile conjugation agent for 68Ga-labeled small recombinant antibodies," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 35, no. 10, pp. 1878–1886, Oct. 2008.
- [76] D. J. Berry, Y. Ma, J. R. Ballinger, R. Tavaré, A. Koers, K. Sunassee, T. Zhou, S. Nawaz, G. E. D. Mullen, R. C. Hider, and P. J. Blower, "Efficient bifunctional gallium-68 chelators for positron emission tomography: tris(hydroxypyridinone) ligands," *Chem. Commun. Camb. Engl.*, vol. 47, no. 25, pp. 7068–7070, Jul. 2011.
- [77] M. T. Ma, C. Cullinane, K. Waldeck, P. Roselt, R. J. Hicks, and P. J. Blower, "Rapid kit-based (68)Ga-labelling and PET imaging with THP-Tyr(3)-octreotate: a preliminary comparison with DOTA-Tyr(3)-octreotate," *EJNMMI Res.*, vol. 5, no. 1, p. 52, Dec. 2015.
- [78] M. T. Ma, C. Cullinane, C. Imberti, J. Baguña Torres, S. Y. A. Terry, P. Roselt, R. J. Hicks, and P. J. Blower, "New Tris(hydroxypyridinone) Bifunctional Chelators Containing Isothiocyanate Groups Provide a Versatile Platform for Rapid One-Step Labeling and PET Imaging with 68Ga3+," *Bioconjug. Chem.*, vol. 27, no. 2, pp. 309–318, Feb. 2016.
- [79] Y.-M. Hsiao, C. J. Mathias, S.-P. Wey, P. E. Fanwick, and M. A. Green, "Synthesis and biodistribution of lipophilic and monocationic gallium radiopharmaceuticals derived from N,N'-bis(3-aminopropyl)-N,N'-dimethylethylenediamine: potential agents for PET myocardial imaging with 68Ga," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 36, no. 1, pp. 39–45, Jan. 2009.
- [80] M. Hofmann, H. Maecke, R. Börner, E. Weckesser, P. Schöffski, L. Oei, J. Schumacher, M. Henze, A. Heppeler, J. Meyer, and H. Knapp, "Biokinetics and imaging with the somatostatin receptor PET radioligand (68)Ga-DOTATOC: preliminary data," *Eur. J. Nucl. Med.*, vol. 28, no. 12, pp. 1751–1757, Dec. 2001.
- [81] I. Velikyan, A. L. Sundberg, O. Lindhe, A. U. Höglund, O. Eriksson, E. Werner, J. Carlsson, M. Bergström, B. Långström, and V. Tolmachev, "Preparation and evaluation of (68)Ga-DOTA-hEGF for visualization of EGFR expression in malignant tumors," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 46, no. 11, pp. 1881–1888, Nov. 2005.
- [82] G. Kramer-Marek, N. Shenoy, J. Seidel, G. L. Griffiths, P. Choyke, and J. Capala, "68Ga-DOTA-affibody molecule for in vivo assessment of HER2/neu expression with PET," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 38, no. 11, pp. 1967–1976, Nov. 2011.

- [83] C. L. Ferreira, E. Lamsa, M. Woods, Y. Duan, P. Fernando, C. Bensimon, M. Kordos, K. Guenther, P. Jurek, and G. E. Kiefer, "Evaluation of bifunctional chelates for the development of gallium-based radiopharmaceuticals," *Bioconjug. Chem.*, vol. 21, no. 3, pp. 531–536, Mar. 2010.
- [84] J. Strand, H. Honarvar, A. Perols, A. Orlova, R. K. Selvaraju, A. E. Karlström, and V. Tolmachev, "Influence of macrocyclic chelators on the targeting properties of (68)Galabeled synthetic affibody molecules: comparison with (111)In-labeled counterparts," *PloS One*, vol. 8, no. 8, p. e70028, 2013.
- [85] J. Notni, K. Pohle, and H.-J. Wester, "Comparative gallium-68 labeling of TRAP-, NOTA-, and DOTA-peptides: practical consequences for the future of gallium-68-PET," *EJNMMI Res.*, vol. 2, no. 1, p. 28, Jun. 2012.
- [86] J. Pfister, D. Summer, C. Rangger, M. Petrik, E. von Guggenberg, P. Minazzi, G. B. Giovenzana, L. Aloj, and C. Decristoforo, "Influence of a novel, versatile bifunctional chelator on theranostic properties of a minigastrin analogue," *EJNMMI Res.*, vol. 5, Dec. 2015.
- [87] P. A. Knetsch, C. Zhai, C. Rangger, M. Blatzer, H. Haas, P. Kaeopookum, R. Haubner, and C. Decristoforo, "[68Ga]FSC-(RGD)3 a trimeric RGD peptide for imaging DvB integrin expression based on a novel siderophore derived chelating scaffold—synthesis and evaluation," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 42, no. 2, pp. 115–122, Feb. 2015.
- [88] C. Decristoforo, I. Hernandez Gonzalez, J. Carlsen, M. Rupprich, M. Huisman, I. Virgolini, H.-J. Wester, and R. Haubner, "68Ga- and 111In-labelled DOTA-RGD peptides for imaging of alphavbeta3 integrin expression," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 35, no. 8, pp. 1507–1515, Aug. 2008.
- [89] C. Burchardt, P. J. Riss, F. Zoller, S. Maschauer, O. Prante, T. Kuwert, and F. Roesch, "[(68)Ga]Ga-DO(2)A-(OBu-l-tyr)(2): synthesis, (68)Ga-radiolabeling and in vitro studies of a novel (68)Ga-DO(2)A-tyrosine conjugate as potential tumor tracer for PET," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 13, pp. 3498–3501, Jul. 2009.
- [90] P. J. Riss, C. Burchardt, and F. Roesch, "A methodical 68Ga-labelling study of DO2A-(butyl-L-tyrosine)2 with cation-exchanger post-processed 68Ga: practical aspects of radiolabelling," *Contrast Media Mol. Imaging*, vol. 6, no. 6, pp. 492–498, Dec. 2011.
- [91] L. Nalin, R. K. Selvaraju, I. Velikyan, M. Berglund, S. Andréasson, A. Wikstrand, A. Rydén, M. Lubberink, F. Kandeel, G. Nyman, O. Korsgren, O. Eriksson, and M. Jensen-Waern, "Positron emission tomography imaging of the glucagon-like peptide-1 receptor in healthy and streptozotocin-induced diabetic pigs," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 41, no. 9, pp. 1800–1810, Sep. 2014.
- [92] C. Bernhard, M. Moreau, D. Lhenry, C. Goze, F. Boschetti, Y. Rousselin, F. Brunotte, and F. Denat, "DOTAGA-anhydride: a valuable building block for the preparation of DOTA-like chelating agents," *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.*, vol. 18, no. 25, pp. 7834– 7841, Jun. 2012.
- [93] E. Boros, C. L. Ferreira, J. F. Cawthray, E. W. Price, B. O. Patrick, D. W. Wester, M. J. Adam, and C. Orvig, "Acyclic Chelate with Ideal Properties for 68Ga PET Imaging Agent Elaboration," J. Am. Chem. Soc., vol. 132, no. 44, pp. 15726–15733, Nov. 2010.
- [94] R. J. Motekaitis, Y. Sun, and A. E. Martell, "N,N ibispyridoxylethylenediamine-N,N idiacetic acid (PLED) and N,N ibis(2-hydroxy-5-sulfobenzylethylenediamine-N,N idiacetic acid (SHBED)," *Inorganica Chim. Acta*, vol. 159, no. 1, pp. 29–39, May 1989.

- [95] M. Zöller, J. Schuhmacher, J. Reed, W. Maier-Borst, and S. Matzku, "Establishment and characterization of monoclonal antibodies against an octahedral gallium chelate suitable for immunoscintigraphy with PET," J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med., vol. 33, no. 7, pp. 1366–1372, Jul. 1992.
- [96] M. Eder, M. Schäfer, U. Bauder-Wüst, W.-E. Hull, C. Wängler, W. Mier, U. Haberkorn, and M. Eisenhut, "68Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging," *Bioconjug. Chem.*, vol. 23, no. 4, pp. 688–697, Apr. 2012.
- [97] A. Fuchs, I. Greguric, and G. Roe, "Evaluation of radioisotope quality aspects for preparation of high specific activity [Ga-68]-NOTA-AnnexinA1," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 37, no. 6, p. 692, Aug. 2010.
- [98] I. Velikyan, H. Maecke, and B. Langstrom, "Convenient Preparation of 68Ga-Based PET-Radiopharmaceuticals at Room Temperature," *Bioconjug. Chem.*, vol. 19, no. 2, pp. 569–573, Feb. 2008.
- [99] J. P. André, H. R. Maecke, J. P. André, M. Zehnder, L. Macko, and K. G. Akyel, "1,4,7-Triazacyclononane-1-succinic acid-4,7-diacetic acid (NODASA): a new bifunctional chelator for radio gallium-labelling of biomolecules," *Chem. Commun.*, no. 12, pp. 1301–1302, 1998.
- [100] M. Asti, M. Iori, P. C. Capponi, G. Atti, S. Rubagotti, R. Martin, A. Brennauer, M. Müller, R. Bergmann, P. A. Erba, and A. Versari, "Influence of different chelators on the radiochemical properties of a 68-Gallium labelled bombesin analogue," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 41, no. 1, pp. 24–35, Jan. 2014.
- [101] R. Chakravarty, S. Chakraborty, A. Dash, and M. R. A. Pillai, "Detailed evaluation on the effect of metal ion impurities on complexation of generator eluted 68Ga with different bifunctional chelators," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 40, no. 2, pp. 197–205, Feb. 2013.
- [102] Y. Sun, C. S. Cutler, A. E. Martell, and M. J. Welch, "New multidentate ligands containing mercaptobenzyl functional groups, and biodistribution of gallium-67-TACN-HSB," *Tetrahedron*, vol. 55, no. 18, pp. 5733–5740, Apr. 1999.
- [103] J. Notni, J. Šime ek, P. Hermann, and H.-J. Wester, "TRAP, a powerful and versatile framework for gallium-68 radiopharmaceuticals," *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.*, vol. 17, no. 52, pp. 14718–14722, Dec. 2011.
- [104] I. Laitinen, J. Notni, K. Pohle, M. Rudelius, E. Farrell, S. G. Nekolla, G. Henriksen, S. Neubauer, H. Kessler, H.-J. Wester, and M. Schwaiger, "Comparison of cyclic RGD peptides for □v□3 integrin detection in a rat model of myocardial infarction," *EJNMMI Res.*, vol. 3, no. 1, p. 38, 2013.
- [105] C. L. Ferreira, D. T. T. Yapp, D. Mandel, R. K. Gill, E. Boros, M. Q. Wong, P. Jurek, and G. E. Kiefer, "(68)Ga small peptide imaging: comparison of NOTA and PCTA," *Bioconjug. Chem.*, vol. 23, no. 11, pp. 2239–2246, Nov. 2012.
- [106] D. Zeng, B. M. Zeglis, J. S. Lewis, and C. J. Anderson, "The growing impact of bioorthogonal click chemistry on the development of radiopharmaceuticals," J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med., vol. 54, no. 6, pp. 829–832, Jun. 2013.
- [107] S. Jadhav, M. Käkelä, J. Mäkilä, M. Kiugel, H. Liljenbäck, J. Virta, P. Poijärvi-Virta, T. Laitala-Leinonen, V. Kytö, S. Jalkanen, A. Saraste, A. Roivainen, H. Lönnberg, and
P. Virta, "Synthesis and In Vivo PET Imaging of Hyaluronan Conjugates of Oligonucleotides," *Bioconjug. Chem.*, vol. 27, no. 2, pp. 391–403, Feb. 2016.

- [108] H. L. Evans, Q.-D. Nguyen, L. S. Carroll, M. Kaliszczak, F. J. Twyman, A. C. Spivey, and E. O. Aboagye, "A bioorthogonal (68)Ga-labelling strategy for rapid in vivo imaging," *Chem. Commun. Camb. Engl.*, vol. 50, no. 67, pp. 9557–9560, Aug. 2014.
- [109] D. J. Vugts, A. Vervoort, M. Stigter-van Walsum, G. W. M. Visser, M. S. Robillard, R. M. Versteegen, R. C. M. Vulders, J. K. D. M. Herscheid, and G. A. M. S. vanDongen, "Synthesis of phosphine and antibody-azide probes for in vivo Staudinger ligation in a pretargeted imaging and therapy approach," *Bioconjug. Chem.*, vol. 22, no. 10, pp. 2072–2081, Oct. 2011.
- [110] L. M. De León-Rodríguez and Z. Kovacs, "The Synthesis and Chelation Chemistry of DOTA–Peptide Conjugates," *Bioconjug. Chem.*, vol. 19, no. 2, pp. 391–402, Feb. 2008.
- [111] Z. Liu, G. Niu, J. Shi, S. Liu, F. Wang, S. Liu, and X. Chen, "(68)Ga-labeled cyclic RGD dimers with Gly3 and PEG4 linkers: promising agents for tumor integrin alphavbeta3 PET imaging," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 36, no. 6, pp. 947– 957, Jun. 2009.
- [112] J. N. Tinianow, H. S. Gill, A. Ogasawara, J. E. Flores, A. N. Vanderbilt, E. Luis, R. Vandlen, M. Darwish, J. R. Junutula, S.-P. Williams, and J. Marik, "Site-specifically 89Zr-labeled monoclonal antibodies for ImmunoPET," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 37, no. 3, pp. 289–297, Apr. 2010.
- [113] H. Struthers, B. Spingler, T. L. Mindt, and R. Schibli, "'Click@o@Chelate': Design and Incorporation of Triazole@Containing Metal@Chelating Systems into Biomolecules of Diagnostic and Therapeutic Interest," *Chem. - Eur. J.*, vol. 14, no. 20, pp. 6173–6183, Jul. 2008.
- [114] N. J. Agard, J. A. Prescher, and C. R. Bertozzi, "A strain-promoted [3 + 2] azidealkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems," J. Am. Chem. Soc., vol. 126, no. 46, pp. 15046–15047, Nov. 2004.
- [115] W. Xi, C. Wang, C. J. Kloxin, and C. N. Bowman, "Nitrogen-Centered Nucleophile Catalyzed Thiol-Vinylsulfone Addition, Another Thiol-ene 'Click' Reaction," ACS Macro Lett., vol. 1, no. 7, pp. 811–814, Jul. 2012.
- [116] M. Lin, M. J. Welch, and S. E. Lapi, "Effects of chelator modifications on (68)Galabeled [Tyr (3)]octreotide conjugates," *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging*, vol. 15, no. 5, pp. 606–613, Oct. 2013.
- [117] M. Bauwens, R. Chekol, H. Vanbilloen, G. Bormans, and A. Verbruggen, "Optimal buffer choice of the radiosynthesis of (68)Ga-Dotatoc for clinical application," *Nucl. Med. Commun.*, vol. 31, no. 8, pp. 753–758, Aug. 2010.
- [118] M. Bauwens, R. Chekol, B. Vanbilloen, G. Bormans, and A. Verbruggen, "The choice of buffer for the labeling and clinical application of gallium-68-DOTATOC." [Online]. Available: http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/\_Public/40/098/40098280.pdf. [Accessed: 28-Mar-2016].
- [119] I. Buchmann, M. Henze, S. Engelbrecht, M. Eisenhut, A. Runz, M. Schäfer, T. Schilling, S. Haufe, T. Herrmann, and U. Haberkorn, "Comparison of 68Ga-

DOTATOC PET and 111In-DTPAOC (Octreoscan) SPECT in patients with neuroendocrine tumours," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 34, no. 10, pp. 1617–1626, Oct. 2007.

- [120] P. A. Knetsch, M. Petrik, C. Rangger, G. Seidel, H.-J. Pietzsch, I. Virgolini, C. Decristoforo, and R. Haubner, "[68Ga]NS3-RGD and [68Ga] Oxo-DO3A-RGD for imaging □v□3 integrin expression: synthesis, evaluation, and comparison," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 40, no. 1, pp. 65–72, Jan. 2013.
- [121] E. Pharmacopeia, "Gallium (68Ga) Edotreotide Inject. Monograph. N° 2482, 23, 2, 310–313." 2011.
- [122] H. Karacay, R. M. Sharkey, W. J. McBride, E. A. Rossi, C.-H. Chang, and D. M. Goldenberg, "Optimization of Hapten-Peptide Labeling for Pretargeted ImmunoPET of Bispecific Antibody Using Generator-Produced 68Ga," *J. Nucl. Med.*, vol. 52, no. 4, pp. 555–559, Apr. 2011.
- [123] W. R. Harris and L. Messori, "A comparative study of aluminum(III), gallium(III), indium(III), and thallium(III) binding to human serum transferrin," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 228, no. 2, pp. 237–262, Jun. 2002.
- [124] L. R. Bernstein, "Mechanisms of Therapeutic Activity for Gallium," *Pharmacol. Rev.*, vol. 50, no. 4, pp. 665–682, Dec. 1998.
- [125] R. F. Zwaal and A. J. Schroit, "Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells," *Blood*, vol. 89, no. 4, pp. 1121–1132, Feb. 1997.
- [126] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed. Garland Science, 2007.
- [127] T. R. Graham, "Flippases and vesicle-mediated protein transport," *Trends Cell Biol.*, vol. 14, no. 12, pp. 670–677, Dec. 2004.
- [128] J. C. M. Holthuis and T. P. Levine, "Lipid traffic: floppy drives and a superhighway," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 6, no. 3, pp. 209–220, Mar. 2005.
- [129] H. M. Hankins, R. D. Baldridge, P. Xu, and T. R. Graham, "Role of flippases, scramblases and transfer proteins in phosphatidylserine subcellular distribution," *Traffic Cph. Den.*, vol. 16, no. 1, pp. 35–47, Jan. 2015.
- [130] G. van Meer, D. R. Voelker, and G. W. Feigenson, "Membrane lipids: where they are and how they behave," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 2, pp. 112–124, Feb. 2008.
- [131] M. Seigneuret and P. F. Devaux, "ATP-dependent asymmetric distribution of spinlabeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 81, no. 12, pp. 3751–3755, Jun. 1984.
- [132] M. Bitbol and P. F. Devaux, "Measurement of outward translocation of phospholipids across human erythrocyte membrane," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 85, no. 18, pp. 6783–6787, Sep. 1988.
- [133] J. G. Kay, M. Koivusalo, X. Ma, T. Wohland, and S. Grinstein, "Phosphatidylserine dynamics in cellular membranes," *Mol. Biol. Cell*, vol. 23, no. 11, pp. 2198–2212, Jun. 2012.

- [134] H. W. Strauss, J. Narula, and F. G. Blankenberg, "Radioimaging to identify myocardial cell death and probably injury," *Lancet Lond. Engl.*, vol. 356, no. 9225, pp. 180–181, Jul. 2000.
- [135] C. Andrick, K. Bröring, B. Deuticke, and C. W. Haest, "Fast translocation of phosphatidylcholine to the outer membrane leaflet after its synthesis at the inner membrane surface in human erythrocytes," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1064, no. 2, pp. 235–241, May 1991.
- [136] N. Arashiki, M. Saito, I. Koshino, K. Kamata, J. Hale, N. Mohandas, S. Manno, and Y. Takakuwa, "An Unrecognized Function of Cholesterol: Regulating the Mechanism Controlling Membrane Phospholipid Asymmetry," *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 55, no. 25, pp. 3504–3513, Jun. 2016.
- [137] P. Comfurius, P. Williamson, E. F. Smeets, R. A. Schlegel, E. M. Bevers, and R. F. Zwaal, "Reconstitution of phospholipid scramblase activity from human blood platelets," *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 35, no. 24, pp. 7631–7634, Jun. 1996.
- [138] F. Rouzet, M. Dominguez Hernandez, F. Hervatin, L. Sarda-Mantel, A. Lefort, X. Duval, L. Louedec, B. Fantin, D. Le Guludec, and J.-B. Michel, "Technetium 99mlabeled annexin V scintigraphy of platelet activation in vegetations of experimental endocarditis," *Circulation*, vol. 117, no. 6, pp. 781–789, Feb. 2008.
- [139] L. Sarda-Mantel, M. Coutard, F. Rouzet, O. Raguin, J.-M. Vrigneaud, F. Hervatin, G. Martet, Z. Touat, P. Merlet, D. Le Guludec, and J.-B. Michel, "99mTc-annexin-V functional imaging of luminal thrombus activity in abdominal aortic aneurysms," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 26, no. 9, pp. 2153–2159, Sep. 2006.
- [140] J. Bonnet, "Athérosclérose," vol. 2, pp. 436–458, Nov. 2005.
- [141] H. Mohmmad Abdul and D. A. Butterfield, "Protection against amyloid beta-peptide (1-42)-induced loss of phospholipid asymmetry in synaptosomal membranes by tricyclodecan-9-xanthogenate (D609) and ferulic acid ethyl ester: implications for Alzheimer's disease," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1741, no. 1–2, pp. 140–148, Jun. 2005.
- [142] L. Hofstra, I. H. Liem, E. A. Dumont, H. H. Boersma, W. L. van Heerde, P. A. Doevendans, E. De Muinck, H. J. Wellens, G. J. Kemerink, C. P. Reutelingsperger, and G. A. Heidendal, "Visualisation of cell death in vivo in patients with acute myocardial infarction," *Lancet Lond. Engl.*, vol. 356, no. 9225, pp. 209–212, Jul. 2000.
- [143] R. Miyano, T. Matsumoto, H. Takatsu, K. Nakayama, and H.-W. Shin, "Alteration of transbilayer phospholipid compositions is involved in cell adhesion, cell spreading, and focal adhesion formation," *FEBS Lett.*, Jun. 2016.
- [144] C. Peker, L. Sarda-Mantel, P. Loiseau, F. Rouzet, L. Nazneen, G. Martet, J.-M. Vrigneaud, A. Meulemans, G. Saumon, J.-B. Michel, and D. Le Guludec, "Imaging apoptosis with (99m)Tc-annexin-V in experimental subacute myocarditis," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 45, no. 6, pp. 1081–1086, Jun. 2004.
- [145] L. Sarda-Mantel, F. Hervatin, J.-B. Michel, L. Louedec, G. Martet, F. Rouzet, R. Lebtahi, P. Merlet, B.-A. Khaw, and D. Le Guludec, "Myocardial uptake of 99mTc-annexin-V and 111In-antimyosin-antibodies after ischemia-reperfusion in rats," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 35, no. 1, pp. 158–165, Jan. 2008.

- [146] M. Assadi, R. Nemati, I. Nabipour, H. Salimipour, and A. Amini, "Radiolabeled annexin V imaging: a useful technique for determining apoptosis in multiple sclerosis," *Med. Hypotheses*, vol. 77, no. 1, pp. 43–46, Jul. 2011.
- [147] A. Castegna, C. M. Lauderback, H. Mohmmad-Abdul, and D. A. Butterfield, "Modulation of phospholipid asymmetry in synaptosomal membranes by the lipid peroxidation products, 4-hydroxynonenal and acrolein: implications for Alzheimer's disease," *Brain Res.*, vol. 1004, no. 1–2, pp. 193–197, Apr. 2004.
- [148] L. Ungethüm, M. Chatrou, D. Kusters, L. Schurgers, and C. P. Reutelingsperger, "Molecular imaging of cell death in tumors. Increasing annexin A5 size reduces contribution of phosphatidylserine-targeting function to tumor uptake," *PloS One*, vol. 9, no. 5, p. e96749, 2014.
- [149] V. Gerke and S. E. Moss, "Annexins: from structure to function," *Physiol. Rev.*, vol. 82, no. 2, pp. 331–371, Apr. 2002.
- [150] H. H. Boersma, B. L. J. H. Kietselaer, L. M. L. Stolk, A. Bennaghmouch, L. Hofstra, J. Narula, G. A. K. Heidendal, and C. P. M. Reutelingsperger, "Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 46, no. 12, pp. 2035–2050, Dec. 2005.
- [151] F. G. Blankenberg, P. D. Katsikis, J. F. Tait, R. E. Davis, L. Naumovski, K. Ohtsuki, S. Kopiwoda, M. J. Abrams, M. Darkes, R. C. Robbins, H. T. Maecker, and H. W. Strauss, "In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 11, pp. 6349–6354, May 1998.
- [152] M. A. Lizarbe, J. I. Barrasa, N. Olmo, F. Gavilanes, and J. Turnay, "Annexinphospholipid interactions. Functional implications," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 2, pp. 2652–2683, 2013.
- [153] A. Bouter, C. Gounou, R. Bérat, S. Tan, B. Gallois, T. Granier, B. L. d'Estaintot, E. Pöschl, B. Brachvogel, and A. R. Brisson, "Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair," *Nat. Commun.*, vol. 2, p. 270, 2011.
- [154] F. Rouzet, L. Sarda-Mantel, J.-B. Michel, and D. Le Guludec, "Molecular imaging of platelet activation in thrombus," J. Nucl. Cardiol. Off. Publ. Am. Soc. Nucl. Cardiol., vol. 16, no. 2, pp. 277–286, Apr. 2009.
- [155] G. J. Kemerink, X. Liu, D. Kieffer, S. Ceyssens, L. Mortelmans, A. M. Verbruggen, N. D. Steinmetz, J.-L. Vanderheyden, A. M. Green, and K. Verbeke, "Safety, biodistribution, and dosimetry of 99mTc-HYNIC-annexin V, a novel human recombinant annexin V for human application," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 44, no. 6, pp. 947–952, Jun. 2003.
- [156] D. Loose, H. Vermeersch, F. De Vos, P. Deron, G. Slegers, and C. Van de Wiele, "Prognostic value of 99mTc-HYNIC annexin-V imaging in squamous cell carcinoma of the head and neck," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 35, no. 1, pp. 47–52, Jan. 2008.
- [157] B. L. J. H. Kietselaer, C. P. M. Reutelingsperger, G. A. K. Heidendal, M. J. A. P. Daemen, W. H. Mess, L. Hofstra, and J. Narula, "Noninvasive detection of plaque instability with use of radiolabeled annexin A5 in patients with carotid-artery atherosclerosis," *N. Engl. J. Med.*, vol. 350, no. 14, pp. 1472–1473, Apr. 2004.

- [158] J. F. Tait, C. Smith, and F. G. Blankenberg, "Structural requirements for in vivo detection of cell death with 99mTc-annexin V," J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med., vol. 46, no. 5, pp. 807–815, May 2005.
- [159] S. Kim, S. M. Bae, J. Seo, K. Cha, M. Piao, S.-J. Kim, H.-N. Son, R.-W. Park, B.-H. Lee, and I.-S. Kim, "Advantages of the phosphatidylserine-recognizing peptide PSP1 for molecular imaging of tumor apoptosis compared with annexin V," *PloS One*, vol. 10, no. 3, p. e0121171, 2015.
- [160] C. Burtea, S. Laurent, E. Lancelot, S. Ballet, O. Murariu, O. Rousseaux, M. Port, L. Vander Elst, C. Corot, and R. N. Muller, "Peptidic targeting of phosphatidylserine for the MRI detection of apoptosis in atherosclerotic plaques," *Mol. Pharm.*, vol. 6, no. 6, pp. 1903–1919, Dec. 2009.
- [161] A. D. Blann, S. K. Nadar, and G. Y. H. Lip, "The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease," *Eur. Heart J.*, vol. 24, no. 24, pp. 2166–2179, Dec. 2003.
- [162] S. Gout, P.-L. Tremblay, and J. Huot, "Selectins and selectin ligands in extravasation of cancer cells and organ selectivity of metastasis," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 25, no. 4, pp. 335–344, 2008.
- [163] R. P. McEver, "Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall," *Cardiovasc. Res.*, vol. 107, no. 3, pp. 331–339, Aug. 2015.
- [164] K. Ley, "The role of selectins in inflammation and disease," *Trends Mol. Med.*, vol. 9, no. 6, pp. 263–268, Jun. 2003.
- [165] M. Cengiz, "Cell Adhesion Molecules (CAM)."
- [166] S. Umeki, R. Suzuki, Y. Ema, M. Shimojima, Y. Nishimura, M. Okuda, and T. Mizuno, "Anti-adhesive property of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) due to steric hindrance effect," J. Cell. Biochem., vol. 114, no. 6, pp. 1271–1285, Jun. 2013.
- [167] A. Natoni, M. S. Macauley, and M. E. O'Dwyer, "Targeting Selectins and Their Ligands in Cancer," *Front. Oncol.*, vol. 6, p. 93, 2016.
- [168] M. P. Bernimoulin, X.-L. Zeng, C. Abbal, S. Giraud, M. Martinez, O. Michielin, M. Schapira, and O. Spertini, "Molecular basis of leukocyte rolling on PSGL-1. Predominant role of core-2 O-glycans and of tyrosine sulfate residue 51," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 1, pp. 37–47, Jan. 2003.
- [169] V. Ramachandran, M. U. Nollert, H. Qiu, W. J. Liu, R. D. Cummings, C. Zhu, and R. P. McEver, "Tyrosine replacement in P-selectin glycoprotein ligand-1 affects distinct kinetic and mechanical properties of bonds with P- and L-selectin," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 24, pp. 13771–13776, Nov. 1999.
- [170] V. R. Krishnamurthy, M. Y. R. Sardar, Y. Ying, X. Song, C. Haller, E. Dai, X. Wang, D. Hanjaya-Putra, L. Sun, V. Morikis, S. I. Simon, R. J. Woods, R. D. Cummings, and E. L. Chaikof, "Glycopeptide analogues of PSGL-1 inhibit P-selectin in vitro and in vivo," *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 6387, Mar. 2015.
- [171] Y. Q. Ma and J. G. Geng, "Heparan sulfate-like proteoglycans mediate adhesion of human malignant melanoma A375 cells to P-selectin under flow," J. Immunol. Baltim. Md 1950, vol. 165, no. 1, pp. 558–565, Jul. 2000.
- [172] B. A. Kaufmann, C. Lewis, A. Xie, A. Mirza-Mohd, and J. R. Lindner, "Detection of recent myocardial ischaemia by molecular imaging of P-selectin with targeted contrast echocardiography," *Eur. Heart J.*, vol. 28, no. 16, pp. 2011–2017, Aug. 2007.

- [173] A. Y. Jin, U. I. Tuor, D. Rushforth, J. Kaur, R. N. Muller, J. L. Petterson, S. Boutry, and P. A. Barber, "Reduced blood brain barrier breakdown in P-selectin deficient mice following transient ischemic stroke: a future therapeutic target for treatment of stroke," *BMC Neurosci.*, vol. 11, p. 12, 2010.
- [174] D. Vestweber and J. E. Blanks, "Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands," *Physiol. Rev.*, vol. 79, no. 1, pp. 181–213, Jan. 1999.
- [175] A. Varki, "Selectin ligands," Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 91, no. 16, pp. 7390– 7397, Aug. 1994.
- [176] A. Koenig, R. Jain, R. Vig, K. E. Norgard-Sumnicht, K. L. Matta, and A. Varki, "Selectin inhibition: synthesis and evaluation of novel sialylated, sulfated and fucosylated oligosaccharides, including the major capping group of GlyCAM-1," *Glycobiology*, vol. 7, no. 1, pp. 79–93, Feb. 1997.
- [177] T. Shodai, Suzuki, S. Kudo, S. Itoh, M. Terada, S. Fujita, H. Shimazu, and T. Tsuji, "Inhibition of P-selectin-mediated cell adhesion by a sulfated derivative of sialic acid," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 312, no. 3, pp. 787–793, Dec. 2003.
- [178] L. Bachelet, I. Bertholon, D. Lavigne, R. Vassy, M. Jandrot-Perrus, F. Chaubet, and D. Letourneur, "Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1790, no. 2, pp. 141–146, Feb. 2009.
- [179] M. T. Ale, J. D. Mikkelsen, and A. S. Meyer, "Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds," *Mar. Drugs*, vol. 9, no. 10, pp. 2106–2130, 2011.
- [180] J. H. Fitton, D. N. Stringer, and S. S. Karpiniec, "Therapies from Fucoidan: An Update," Mar. Drugs, vol. 13, no. 9, pp. 5920–5946, Sep. 2015.
- [181] B. Li, F. Lu, X. Wei, and R. Zhao, "Fucoidan: structure and bioactivity," Mol. Basel Switz., vol. 13, no. 8, pp. 1671–1695, 2008.
- [182] S. S. Ferreira, C. P. Passos, P. Madureira, M. Vilanova, and M. A. Coimbra, "Structurefunction relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review," *Carbohydr. Polym.*, vol. 132, pp. 378–396, Nov. 2015.
- [183] O. Berteau and B. Mulloy, "Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide," *Glycobiology*, vol. 13, no. 6, p. 29R–40R, Jun. 2003.
- [184] F. Rouzet, L. Bachelet-Violette, J.-M. Alsac, M. Suzuki, A. Meulemans, L. Louedec, A. Petiet, M. Jandrot-Perrus, F. Chaubet, J.-B. Michel, D. Le Guludec, and D. Letourneur, "Radiolabeled fucoidan as a p-selectin targeting agent for in vivo imaging of platelet-rich thrombus and endothelial activation," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 52, no. 9, pp. 1433–1440, Sep. 2011.
- [185] T. Cognet, K. Gudej, M. Morvan, F. Al Shoukr, E. Manika, L. Louedec, C. Choqueux, A. Nicoletti, D. Le Guludec, and F. Rouzet, "Detection of inflammation in experimental autoimmune myocarditis using 99mTc-fucoidan SPECT," Arch. Cardiovasc. Dis. Suppl., vol. 6, pp. 62–63, Apr. 2014.

- [186] J.-B. Michel, D. Letourneur, F. Chaubet, L. Bachelet, F. Rouzet, and A. Meulemans, "Fucoidans as Ligands for the Diagnosis of Degenerative Pathologies," US2012093725 (A1), 19-Apr-2012.
- [187] S. Burg, A. Dupas, S. Stute, A. Dieudonné, P. Huet, D. Le Guludec, and I. Buvat, "Partial volume effect estimation and correction in the aortic vascular wall in PET imaging," *Phys. Med. Biol.*, vol. 58, no. 21, pp. 7527–7542, Nov. 2013.
- [188] P. Huet, S. Burg, D. Le Guludec, F. Hyafil, and I. Buvat, "Variability and uncertainty of 18F-FDG PET imaging protocols for assessing inflammation in atherosclerosis: suggestions for improvement," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 56, no. 4, pp. 552–559, Apr. 2015.
- [189] J. Epelbaum, W. Bauer, and C. Bruns, *La somatostatine et ses analogues: de la recherche fondamentale à la clinique*. John Libbey Eurotext, 1996.
- [190] J. Guibourdenche, "Somatostatine," EMC- Bilogie médicale, vol. 10, no. 1, pp. 1–8, 2015.
- [191] I. M. Modlin, M. Pavel, M. Kidd, and B. I. Gustafsson, "somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine (carcinoid) tumours," *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 31, no. 2, pp. 169–188, Jan. 2010.
- [192] J. Epelbaum, "La somatostatine et ses récepteurs dans le système nerveux central," in La somatostatine et ses analogues: de la recherche fondamentale à la clinique, John Libbey Eurotext, 1996, pp. 37–44.
- [193] Y. C. Patel and C. B. Srikant, "Somatostatin Receptors," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 8, no. 10, pp. 398–405, Dec. 1997.
- [194] L. Sun and D. Coy, "Somatostatin and its Analogs," Curr. Drug Targets, vol. 17, no. 5, pp. 529–537, Mar. 2016.
- [195] Z. Csaba, S. Peineau, and P. Dournaud, "Molecular mechanisms of somatostatin receptor trafficking," J. Mol. Endocrinol., vol. 48, no. 1, pp. R1-12, Feb. 2012.
- [196] M. Volante, F. Bozzalla-Cassione, and M. Papotti, "Somatostatin receptors and their interest in diagnostic pathology," *Endocr. Pathol.*, vol. 15, no. 4, pp. 275–291, 2004.
- [197] N. Delesque, L. Buscail, F. Lopez, and C. Susini, "Mécanisme d'action de la somatostatine," in *La somatostatine et ses analogues: de la recherche fondamentale à la clinique*, John Libbey Eurotext, 1996, pp. 31–36.
- [198] Y. C. Patel, "Somatostatin and Its Receptor Family," Front. Neuroendocrinol., vol. 20, no. 3, pp. 157–198, Jul. 1999.
- [199] P. Barnett, "Somatostatin and somatostatin receptor physiology," *Endocrine*, vol. 20, no. 3, pp. 255–264, Apr. 2003.
- [200] A. Raulf, C. Bruns, and D. Hoyer, "Récepteurs de la somatostatine: biologie et pharmacologie moléculaires," in *La somatostatine et ses analogues. De la recherche fondamentale à la clinique*, John Libbey Eurotext, 1996, pp. 11–19.
- [201] S. Jacobs and S. Schulz, "Intracellular trafficking of somatostatin receptors," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 286, no. 1–2, pp. 58–62, May 2008.
- [202] G. Sassolas, "Détection in vivo des récepteurs de la somatostatine par scintigraphie," in La somatostatine et ses analogues: de la recherche fondamentale à la clinique, John Libbey Eurotext, 1996, pp. 59–67.

- [203] A. Mojtahedi, A. Alavi, S. Thamake, R. Amerinia, D. Ranganathan, I. Tworowska, and E. S. Delpassand, "Assessment of vulnerable atherosclerotic and fibrotic plaques in coronary arteries using (68)Ga-DOTATATE PET/CT," Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging, vol. 5, no. 1, pp. 65–71, 2015.
- [204] S. F. Pedersen, B. V. Sandholt, S. H. Keller, A. E. Hansen, A. E. Clemmensen, H. Sillesen, L. Højgaard, R. S. Ripa, and A. Kjær, "64Cu-DOTATATE PET/MRI for Detection of Activated Macrophages in Carotid Atherosclerotic Plaques: Studies in Patients Undergoing Endarterectomy," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 35, no. 7, pp. 1696–1703, Jul. 2015.
- [205] W. Bauer, "Propriétés chimiques et précliniques de l'octréotide et de ses analogues," in La somatostatine et ses analogues. De la recherche fondamentale à la clinique, John Libbey Eurotext, 1996, pp. 21–30.
- [206] W. Bauer, U. Briner, W. Doepfner, R. Haller, R. Huguenin, P. Marbach, T. J. Petcher, and J. Pless, "SMS 201–995: A very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action," *Life Sci.*, vol. 31, no. 11, pp. 1133–1140, Sep. 1982.
- [207] C. Ansquer, D. Taieb, F. Montravers, and F. Tenenbaum, "PET imaging with 68gallium labelled somatostatin analogues in the evaluation of neuroendocrine tumours (NETs)," *Médecine Nucl.*, vol. 39, no. 1, pp. 18–25, Feb. 2015.
- [208] J. C. Reubi, J. C. Schär, B. Waser, S. Wenger, A. Heppeler, J. S. Schmitt, and H. R. Mäcke, "Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use," *Eur. J. Nucl. Med.*, vol. 27, no. 3, pp. 273–282, Mar. 2000.
- [209] M. Ginj, J. S. Schmitt, J. Chen, B. Waser, J.-C. Reubi, M. de Jong, S. Schulz, and H. R. Maecke, "Design, synthesis, and biological evaluation of somatostatin-based radiopeptides," *Chem. Biol.*, vol. 13, no. 10, pp. 1081–1090, Oct. 2006.
- [210] M. Ginj, J. Chen, M. A. Walter, V. Eltschinger, J. C. Reubi, and H. R. Maecke, "Preclinical evaluation of new and highly potent analogues of octreotide for predictive imaging and targeted radiotherapy," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 11, no. 3, pp. 1136–1145, Feb. 2005.
- [211] C. Lamesa, A. Rauscher, F. Lacoeuille, M.-D. Desruet, B. Guillet, and A. Faivre-Chauvet, "68Ga somatostatin analog radiolabelling: The radiopharmacist's point of view," *Médecine Nucl.*, vol. 39, no. 1, pp. 3–10, Feb. 2015.
- [212] M. Laznicek, A. Laznickova, and H. R. Maecke, "Receptor affinity and preclinical biodistribution of radiolabeled somatostatin analogs," *Anticancer Res.*, vol. 32, no. 3, pp. 761–766, Mar. 2012.
- [213] D. Wild, J. S. Schmitt, M. Ginj, H. R. Mäcke, B. F. Bernard, E. Krenning, M. De Jong, S. Wenger, and J.-C. Reubi, "DOTA-NOC, a high-affinity ligand of somatostatin receptor subtypes 2, 3 and 5 for labelling with various radiometals," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 30, no. 10, pp. 1338–1347, Oct. 2003.
- [214] R. Cescato, S. Schulz, B. Waser, V. Eltschinger, J. E. Rivier, H.-J. Wester, M. Culler, M. Ginj, Q. Liu, A. Schonbrunn, and J. C. Reubi, "Internalization of sst2, sst3, and sst5 receptors: effects of somatostatin agonists and antagonists," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 47, no. 3, pp. 502–511, Mar. 2006.

- [215] C. B. Johnbeck, U. Knigge, and A. Kjær, "PET tracers for somatostatin receptor imaging of neuroendocrine tumors: current status and review of the literature," *Future Oncol. Lond. Engl.*, vol. 10, no. 14, pp. 2259–2277, Nov. 2014.
- [216] K.-P. Eisenwiener, M. I. M. Prata, I. Buschmann, H.-W. Zhang, A. C. Santos, S. Wenger, J. C. Reubi, and H. R. Mäcke, "NODAGATOC, a new chelator-coupled somatostatin analogue labeled with [67/68Ga] and [111In] for SPECT, PET, and targeted therapeutic applications of somatostatin receptor (hsst2) expressing tumors," *Bioconjug. Chem.*, vol. 13, no. 3, pp. 530–541, Jun. 2002.
- [217] P. M. Smith-Jones, C. Bischof, M. Leimer, D. Gludovacz, P. Angelberger, T. Pangerl, M. Peck-Radosavljevic, G. Hamilton, K. Kaserer, A. Kofler, H. Schlangbauer-Wadl, T. Traub, and I. Virgolini, "DOTA-lanreotide: a novel somatostatin analog for tumor diagnosis and therapy," *Endocrinology*, vol. 140, no. 11, pp. 5136–5148, Nov. 1999.
- [218] H.-J. Wester, M. Schottelius, K. Scheidhauer, J.-C. Reubi, I. Wolf, and M. Schwaiger, "Comparison of radioiodinated TOC, TOCA and Mtr-TOCA: the effect of carbohydration on the pharmacokinetics," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 29, no. 1, pp. 28–38, Jan. 2002.
- [219] P. Antunes, M. Ginj, H. Zhang, B. Waser, R. P. Baum, J. C. Reubi, and H. Maecke, "Are radiogallium-labelled DOTA-conjugated somatostatin analogues superior to those labelled with other radiometals?," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 34, no. 7, pp. 982–993, Jul. 2007.
- [220] M. Ginj, H. Zhang, B. Waser, R. Cescato, D. Wild, X. Wang, J. Erchegyi, J. Rivier, H. R. Mäcke, and J. C. Reubi, "Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonists for in vivo peptide receptor targeting of tumors," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 44, pp. 16436–16441, Oct. 2006.
- [221] Iason, "Quality certificate Obninsk 68Ge/68Ga Generator." 26-Nov-2012.
- [222] Eckert & Ziegler Radiopharma GmbH, "GalliaPharm, Summury of product characteristics." Apr-2015.
- [223] S. S. Das, S. Chattopadhyay, M. N. Alam, null Madhusmita, L. Barua, and M. K. Das, "Preparation and evaluation of SnO2-based 68Ge/68Ga generator made from 68Ge produced through (nat)Zn(□,xn) reaction," *Appl. Radiat. Isot. Data Instrum. Methods* Use Agric. Ind. Med., vol. 79, pp. 42–47, Sep. 2013.
- [224] V. Scasnár and J. E. van Lier, "The use of SEP-PAK SI cartridges for the preparation of gallium chloride from the citrate solution," *Eur. J. Nucl. Med.*, vol. 20, no. 3, p. 273, Mar. 1993.
- [225] C. Pettinato, A. Sarnelli, M. Di Donna, S. Civollani, C. Nanni, G. Montini, D. Di Pierro, M. Ferrari, M. Marengo, and C. Bergamini, "68Ga-DOTANOC: biodistribution and dosimetry in patients affected by neuroendocrine tumors," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 35, no. 1, pp. 72–79, Jan. 2008.
- [226] R. C. Walker, G. T. Smith, E. Liu, B. Moore, J. Clanton, and M. Stabin, "Measured human dosimetry of 68Ga-DOTATATE," J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med., vol. 54, no. 6, pp. 855–860, Jun. 2013.
- [227] "Protocole 68Ga-DOTANOC et TE-GEP. Eudract⊡ n° 2011-003542-40 Réf: BRD 11/5-K Ref CPP⊡35/10." 16-May-2014.

- [228] M. Petrik, P. A. Knetsch, R. Knopp, G. Imperato, M. Ocak, E. von Guggenberg, R. Haubner, R. Silbernagl, and C. Decristoforo, "Radiolabelling of peptides for PET, SPECT and therapeutic applications using a fully automated disposable cassette system," *Nucl. Med. Commun.*, vol. 32, no. 10, pp. 887–895, Oct. 2011.
- [229] Y. Krausz, N. Freedman, R. Rubinstein, E. Lavie, M. Orevi, S. Tshori, A. Salmon, B. Glaser, R. Chisin, E. Mishani, and D. J Gross, "68Ga-DOTA-NOC PET/CT imaging of neuroendocrine tumors: comparison with <sup>111</sup>In-DTPA-octreotide (OctreoScan®)," *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging*, vol. 13, no. 3, pp. 583–593, Jun. 2011.
- [230] V. Ambrosini, D. Campana, L. Bodei, C. Nanni, P. Castellucci, V. Allegri, G. C. Montini, P. Tomassetti, G. Paganelli, and S. Fanti, "68Ga-DOTANOC PET/CT clinical impact in patients with neuroendocrine tumors," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 51, no. 5, pp. 669–673, May 2010.
- [231] V. Prasad, V. Ambrosini, M. Hommann, D. Hoersch, S. Fanti, and R. P. Baum, "Detection of unknown primary neuroendocrine tumours (CUP-NET) using (68)Ga-DOTA-NOC receptor PET/CT," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 37, no. 1, pp. 67–77, Jan. 2010.
- [232] S. Fanti, Ambrosini, P. Tomassetti, P. Castellucci, G. Montini, V. Allegri, G. Grassetto, D. Rubello, C. Nanni, and R. Franchi, "Evaluation of unusual neuroendocrine tumours by means of 68Ga-DOTA-NOC PET," *Biomed. Pharmacother. Bioméd. Pharmacothérapie*, vol. 62, no. 10, pp. 667–671, Dec. 2008.
- [233] M. Fani, L. Del Pozzo, K. Abiraj, R. Mansi, M. L. Tamma, R. Cescato, B. Waser, W. A. Weber, J. C. Reubi, and H. R. Maecke, "PET of somatostatin receptor-positive tumors using 64Cu- and 68Ga-somatostatin antagonists: the chelate makes the difference," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 52, no. 7, pp. 1110–1118, Jul. 2011.
- [234] E. Hofsli, L. Thommesen, K. Nørsett, S. Falkmer, U. Syversen, A. Sandvik, and A. Laegreid, "Expression of chromogranin A and somatostatin receptors in pancreatic AR42J cells," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 194, no. 1–2, pp. 165–173, Aug. 2002.
- [235] A. Gonzalez, P. Santofimia-Castaño, and G. M. Salido, "Culture of pancreatic AR42J cell for use as a model for acinar cell function | Pancreapedia," *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*. 05-Jul-2011.
- [236] H. Zhang, M. A. Moroz, I. Serganova, T. Ku, R. Huang, J. Vider, H. R. Maecke, S. M. Larson, R. Blasberg, and P. M. Smith-Jones, "Imaging expression of the human somatostatin receptor subtype-2 reporter gene with 68Ga-DOTATOC," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 52, no. 1, pp. 123–131, Jan. 2011.
- [237] M. Jin, C. Smith, H.-Y. Hsieh, D. F. Gibson, and J. F. Tait, "Essential role of B-helix calcium binding sites in annexin V-membrane binding," J. Biol. Chem., vol. 279, no. 39, pp. 40351–40357, Sep. 2004.
- [238] X. Li, J. M. Link, S. Stekhova, K. J. Yagle, C. Smith, K. A. Krohn, and J. F. Tait, "Site-specific labeling of annexin V with F-18 for apoptosis imaging," *Bioconjug. Chem.*, vol. 19, no. 8, pp. 1684–1688, Aug. 2008.
- [239] M. Bauwens, M. De Saint-Hubert, E. Devos, N. Deckers, C. Reutelingsperger, L. Mortelmans, U. Himmelreich, F. M. Mottaghy, and A. Verbruggen, "Site-specific

68Ga-labeled Annexin A5 as a PET imaging agent for apoptosis," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 38, no. 3, pp. 381–392, Apr. 2011.

- [240] V. H. Pomin, "Fucanomics and galactanomics: current status in drug discovery, mechanisms of action and role of the well-defined structures," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1820, no. 12, pp. 1971–1979, Dec. 2012.
- [241] A. O. Chizhov, A. Dell, H. R. Morris, S. M. Haslam, R. A. McDowell, A. S. Shashkov, N. E. Nifant'ev, E. A. Khatuntseva, and A. I. Usov, "A study of fucoidan from the brown seaweed Chorda filum," *Carbohydr. Res.*, vol. 320, no. 1–2, pp. 108–119, Jul. 1999.
- [242] L. Bachelet-Violette, A. K. A. Silva, M. Maire, A. Michel, O. Brinza, P. Ou, V. Ollivier, A. Nicoletti, C. Wilhelm, D. Letourneur, C. Ménager, and F. Chaubet, "Strong and specific interaction of ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles and human activated platelets mediated by fucoidan coating," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 10, pp. 4864–4871, Jan. 2014.
- [243] A. Kondo, J. Suzuki, N. Kuraya, S. Hase, I. Kato, and T. Ikenaka, "Improved method for fluorescence labeling of sugar chains with sialic acid residues," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 54, no. 8, pp. 2169–2170, Aug. 1990.
- [244] J. H. Seo, K. Adachi, B. K. Lee, D. G. Kang, Y. K. Kim, K. R. Kim, H. Y. Lee, T. Kawai, and H. J. Cha, "Facile and rapid direct gold surface immobilization with controlled orientation for carbohydrates," *Bioconjug. Chem.*, vol. 18, no. 6, pp. 2197–2201, Dec. 2007.
- [245] X. Li, W. Bauer, I. Israel, M. C. Kreissl, J. Weirather, D. Richter, E. Bauer, V. Herold, P. Jakob, A. Buck, S. Frantz, and S. Samnick, "Targeting P-selectin by gallium-68labeled fucoidan positron emission tomography for noninvasive characterization of vulnerable plaques: correlation with in vivo 17.6T MRI," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 34, no. 8, pp. 1661–1667, Aug. 2014.
- [246] L. Chollet, P. Saboural, C. Chauvierre, J.-N. Villemin, D. Letourneur, and F. Chaubet, "Fucoidans in Nanomedicine," *Mar. Drugs*, vol. 14, no. 8, 2016.
- [247] D. T. Durack and P. B. Beeson, "Experimental bacterial endocarditis. I. Colonization of a sterile vegetation," Br. J. Exp. Pathol., vol. 53, no. 1, pp. 44–49, Feb. 1972.
- [248] J. R. Fitzgerald, T. J. Foster, and D. Cox, "The interaction of bacterial pathogens with platelets," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 4, no. 6, pp. 445–457, Jun. 2006.
- [249] E. Widmer, Y.-A. Que, J. M. Entenza, and P. Moreillon, "New concepts in the pathophysiology of infective endocarditis," *Curr. Infect. Dis. Rep.*, vol. 8, no. 4, pp. 271–279, Jun. 2006.
- [250] J. Šime ek, P. Hermann, H.-J. Wester, and J. Notni, "How is 68Ga Labeling of Macrocyclic Chelators Influenced by Metal Ion Contaminants in 68Ge/68Ga Generator Eluates?," *ChemMedChem*, vol. 8, no. 1, pp. 95–103, Jan. 2013.

## PRODUCTION SCIENTIFIQUE

# 1. Articles

Les articles ont été présentés dans la thèse. Ils ne sont pas listés dans cette section.

### 2. Communications orales

- «<sup>68</sup>Ga, <sup>64</sup>Cu labelling and affinity study of NODAGANOC, a NODAGA conjugated somatostatin analogue ».

**Rana Ben Azzouna**, Faisal Al-Shoukr, Fabien Hyafil, François Rouzet, Denis Guilloteau and Dominique Le Guludec.

Accepté pour être présenté sous forme de communication orale au Theranostics World Congress qui se tiendra à Melbourne du 7 au 9 Novembre 2016

- Name of session: Refining and Defining NET Targets (continued)
- Date: Monday, 07/11/2016
- Time: 11:00 am 12:00 pm
- Order in session: 2
- Length of presentation: 15 minutes (includes question time)

 - « Production hospitalière automatique de traceurs marqués au gallium 67 ». Journée FINYS (French Imaging Network of Young Scientists), Kick-off meeting, 9 octobre 2015. Paris.
Rana Ben Azzouna, Faisal Al-Shoukr, Jonathan Vigne et Dominique Le Guludec

 - « Intérêt du marquage au <sup>68</sup>Ga pour la TEP. Application au Fucoïdane ». Journée France Life Imaging (FLI) Paris Centre. 19 juin 2015.
Rana Ben Azzouna

- « Intérêt du gallium 68 en médecine nucléaire, application aux TNE » 35èmes journées d'études et de formation de l'AFTMN. La Rochelle, 31 mai 2015.
Rana Ben Azzouna

- « *In vivo* diagnosis of experimental infective endocarditis: Comparison between 99mTclabeled HYNIC-Annexin A5 and Annexin A5-128 ». K. Khadija Ben Ali; F. Rouzet; **R. Ben Azzouna**; A. Petiet; L. Louedec; D. Chicco; A. Filannino; L. Sarda-Mantel;

M. Jean-Baptiste; D. Le Guludec. International Conference on Nuclear Cardiology and Cardiac CT ICNC 05 May 2013 - 08 May 2013 , Berlin – Germany

- « Comparison between 99mTc-HYNIC-AnnexinA5 and 99mTc-AnnexinA5-128 for *in vivo* detection of experimental auto immune myocarditis »

K. Khadija Ben Ali; **R. Ben Azzouna**; L. Louedec; M. Milliner; D. Barbato; C. Bucci; F. Rouzet; M. Jean-Baptiste; D. Le Guludec; L. Sarda-Mantel

This research has been selected as finalist for the Young Investigator Award Competition in the International Conference on Nuclear Cardiology and Cardiac CT ICNC 05 May 2013 - 08 May 2013 , Berlin – Germany. OP40.

- « Comparison between 99mTc-labelled HYNIC-Annexin A5 and Annexin A5-128 in experimental infective endocarditis ». OP209

Ben Ali, K; Rouzet, F; **Ben Azzouna, R**; Petiet, A; Louedec, L; Milliner, M; Filannino, A; Chicco, D; Sarda-Mantel, L; Michel, J; Le Guludec, D.

25th Annual Congress of the European-Association-of-Nuclear-Medicine (EANM). Milan, ITALY 2012. OCT 27-31, 2012.

- « *In vivo* detection of experimental auto immune myocarditis: Comparison between Tc-99m-HYNIC-AnnexinA5 and Tc-99m-AnnexinA5-128 ». OP585

Ben Ali, K ; **Ben Azzouna, R** ; Petiet, A ; Louedec, L ; Milliner, M ; Rouzet, F ; Barbato, D ; Bucci, C ; Michel, J ; Le Guludec, D ;Sarda-Mantel, L.

25th Annual Congress of the European-Association-of-Nuclear-Medicine (EANM). Milan, ITALY. OCT 27-31, 2012.

## 3. Communications en e-Poster Walks

«68Ga vacuum elution approach for direct labelling of DOTA and NODAGA-conjugated peptides».

**Rana Ben Azzouna**, Sébastien Leygnac, Faisal Al-Shoukr, François Rouzet, Denis Guilloteau and Dominique Le Guludec

Accepté pour un poster communiqué pour l'EANM'2016 qui aura lieu à Barcelone du 15 au 19 octobre 2016 :

Presentation Number: EPW95

Session: E-PW10 - Radiopharmaceuticals & Radiochemistry: Radiopharmaceuticals & Instrumentation

Session Date: Monday, October 17, 2016 Session Time: 8:30:00 AM - 9:30:00 AM

# 4. Communications affichées

« A New anionic purification method of 68Ge/68Ga generator eluate for automated production of 68Ga-peptides. ».

**Rana Ben Azzouna**, Faisal Al-Shoukr, Sebastien Leygnac, Denis Guilloteau, Dominique Le Guludec. 3rd Theranostics word congress on 68Ga and Radiopeptide therapy. Baltimore (USA) March 12-14, 2015.

"Comparison between 99mTc-HYNIC-AnnexinA5 and 99mTc-AnnexinA5-128 for *in vivo* detection of experimental autoimmune myocarditis,"

K. B. Ali, **R. B. Azzouna**, L. Louedec, M. Milliner, F. Rouzet, J.-B. Michel, D. Barbato, C. Bucci, D. L. Guludec, and L. Sarda-Mantel, *J. Nucl. Med.*, vol. 53, no. supplement 1, pp. 1780–1780, May 2012.

- « Comparison between 99mTc-HYNIC-AnnexinA5 and 99mTc-AnnexinA5-128 for *in vivo* detection of experimental auto immune myocarditis ».

Khadija Ben Ali, <u>Rana Ben Azzouna</u>, Liliane Louedec, Milan Milliner, Francois Rouzet, Jean-Baptiste Michel, Donato Barbato, Chiara Bucci, Dominique Le Guludec and Laure Sarda-Mantel. Annual Meeting SNM, 9-13 juin 2012, Miami, USA. *J. Nucl. Med.*, vol. 53, no. supplement 1, pp. 1780–1780, May 2012.

- « Comparison between 99mTc-labeled HYNIC-Annexin A5 and Annexin A5-128 for *in vivo* diagnosis of experimental infective endocarditis ».

K. BEN ALI, F. Rouzet, **R. Ben Azzouna**, A. Petiet, L Louedec, M.Milliner, L Sarda-Mantel, JB Michel, D Le Guludec D Chicco, A Filannino. SECOND PLACE POSTER-CARDIOVASULAR TRACK, Supported by the SNM cardiovascular Council. 12 June 2012. 59th Annual Meeting of the SNM, Advancing Molecular Imaging and Therapy Miami Beach, Florida. *J. Nucl. Med.*, vol. 53, no. supplement 1, pp. 1779–1779, May 2012.

# <u>RÉSUMÉ</u>

La tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie moléculaire avec de meilleures performances que la tomographie par émission monophotonique. Son utilisation contribue à l'amélioration des prises en charge des patients. Dans les centres dépourvus de cyclotrons, le <sup>68</sup>Ga disponible à partir d'un générateur constitue une alternative pour le développement de traceurs TEP. Pour pouvoir développer des <sup>68</sup>Ga-traceurs, un travail de caractérisation de la qualité des éluats a été effectué. Des méthodes de marquage adaptées ont été mises en place et validées. Nous nous sommes intéressés à trois cibles moléculaires particulièrement intéressantes dans les pathologies cardiovasculaires: les récepteurs de la somatostatine (SSTR) surexprimés dans les tumeurs neuroendocrines (TNE) mais constituant aussi une cible d'intérêt dans les pathologies cardiovasculaires à composante inflammatoire ; la phosphatidylsérine (PS), un marqueur de l'apoptose cellulaire et de l'activation plaquettaire ; la P-sélectine, un marqueur des activations plaquettaire et endothéliale. Les traceurs suivants ont été développés: 1) Analogues de la somatostatine ciblant les SSTR: a) <sup>68</sup>Ga-DOTANOC validé pour l'imagerie des TNE-Gastroentéropancréatiques dans le cadre d'un essai clinique multicentrique. b) <sup>68</sup>Ga-NODAGANOC testé in vitro sur des cellules d'adénocarcinome pancréatique. Cette validation initiale dans l'application la plus fréquente (oncologie) a pour objectif de faciliter le passage vers des applications cardiovasculaires futures (athérosclérose, myocardite...); 2) Un peptide ciblant la PS : le <sup>68</sup>Ga-P04087; 3) Un polysaccharide ciblant la P-sélectine: <sup>68</sup>Ga-NODAGA-Asphy. Les deux derniers traceurs ont été testés sur un modèle d'endocardite infectieuse chez le rat.

### ABSTRACT

The Positron emission tomography (PET) is a molecular imaging technique with usually better performances than Single-Photon Emission Computed Tomography. Consequently, the use of PET and appropriate tracers could enable clinicians to make a better therapeutic decision, thus improving the management of patients. In centers without cyclotrons, <sup>68</sup>Ga available from a generator is an alternative for the development of PET tracers. In order to develop <sup>68</sup>Ga labeled-molecules, a characterization of the quality of the eluates was performed. Radiolabeling techniques adapted to the quality of the starting material were developed and validated. In this thesis we focused on three particularly interesting molecular targets in cardiovascular pathologies: somatostatin receptors (SSTR), overexpressed in neuroendocrine tumors (NETs) but also constituting a target of interest in cardiovascular diseases with an inflammatory component; phosphatidylserine (PS), a marker of cell apoptosis and platelet activation; P-selectin, a marker of platelet and endothelial activation. The following tracers have been developed: 1) Somatostatin analogues which target SSTR: a) <sup>68</sup>Ga-DOTANOC validated for Gastroenteropancreatic-NETs imaging and used in a multicenter clinical trial. b) <sup>68</sup>Ga-NODAGANOC tested in vitro on pancreatic adenocarcinoma cells. This initial validation in the most common application (oncology) aims to facilitate the transition to future cardiovascular applications (atherosclerosis, myocarditis ...) 2) A peptide for PS targeting: <sup>68</sup> Ga-P04087; 3) A polysaccharide for P-selectin targeting: <sup>68</sup>Ga-NODAGA-Asphy. The last two radiolabeled molecules were tested in a rat model of infective endocarditis.