

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET
RECHERCHE

Soutenu devant le jury interrégional

Le 18 octobre

Par Anne-Sophie Navarro

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

*Développement de nouveaux radiopharmaceutiques à base de cuivre-64
pour application théranostique en cancérologie*

Président : M. Alain FAIVRE-CHAUVET, Professeur de Biophysique et
Praticien Hospitalier

Membres du jury : Mme Marie DEGRAEF, Maître de Conférence de Biophysique et
Praticien Hospitalier

Mme Nathalie LE BRIS, Maître de Conférence Habilitée à Diriger
la Recherche de Chimie

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe 13 « Oncologie Nucléaire » du Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes Angers (UMR Inserm U1232 CNRS 6001). J'exprime ma profonde gratitude au Professeur Michel CHEREL, responsable de l'équipe 13, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Docteur Nathalie LE BRIS, Maître de Conférence Universitaire et Habilitée à Diriger la Recherche à l'Université de Brest, pour avoir accepté d'évaluer ce travail, ainsi qu'au Professeur Alain FAIVRE-CHAUVET, Professeur à l'Université de Nantes et Praticien Hospitalier au CHU de Nantes, pour être directeur du jury de cette thèse.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude au Docteur Marie DEGRAEF, ma directrice de thèse, pour son encadrement et sa participation à ce travail.

Je remercie chaleureusement les membres de l'équipe 13 pour leur soutien et leur aide précieuse au cours de ces années de thèse, tout particulièrement Patricia, Marion, Romain, Laurent, François, Catherine, Séverine, Latifa, Jean-François et Mickaël.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Raphaël Tripier et aux membres de l'UMR 6521 de Brest pour avoir fourni le ligand TE1PA utilisé pour cette étude.

Enfin, je remercie mes amis et ma famille pour leur soutien tout au long de ces années.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	6
LISTE DES FIGURES.....	9
INTRODUCTION	11
I. L'IMAGERIE PHENOTYPIQUE TEP EN CANCEROLOGIE	13
1. Définition de la TEP et de l'imagerie phénotypique TEP.....	13
2. Principes de ciblage et de détection des rayonnements émis.....	13
2.1. Stratégies de ciblage.....	13
2.2. Détection du rayonnement émis.....	14
3. Indications et limitations de la TEP métabolique.....	16
3.1. Indications et applications.....	16
3.2. Limitations du ¹⁸ F-FDG et des vecteurs métaboliques	16
4. Place de l'immuno-TEP dans l'arsenal diagnostique et thérapeutique	17
4.1. Avantages de l'imagerie phénotypique en oncologie	17
4.2. Importance de la cible et du vecteur	19
a. Choix de la cible.....	19
b. Choix du vecteur.....	20
4.3. Emetteurs β ⁺	21
a. Caractéristiques recherchées	21
b. Principaux émetteurs β ⁺ utilisables en immuno-TEP	21
II. LE CUIVRE-64	23
1. Propriétés	23
1.1. Chimiques	23
1.2. Physiques.....	24
2. Méthodes de production.....	25
2.1. Section efficace	25
2.2. Production en réacteur	25
2.3. Production en cyclotron	26
a. Utilisation de protons.....	26
b. Utilisation de deutons	27
3. Problématiques inhérentes à la production du cuivre-64	28
4. Complexation du cuivre-64	30
4.1. Définition d'un ligand	30
4.2. Caractéristiques recherchées d'un ligand du cuivre	30
a. Stabilité thermodynamique.....	31
b. Inertie cinétique	32
c. Sélectivité du ligand pour le cuivre	32

d.	Cinétique de complexation	32
e.	Résistance à la transchélation, à la réduction et à la transmétallation	33
4.3.	Fonctions de coordination.....	34
a.	Généralités sur la fonctionnalisation des ligands.....	34
b.	Approches conventionnelles	34
c.	Approche « chimie click ».....	36
4.4.	Ligands du cuivre	37
a.	Ligands acycliques	37
b.	Ligands à base cyclame et cyclène	39
c.	Ligands dérivés du triaminocyclohexane	40
d.	Ligands type sarcophagine	40
e.	Ligands pontés du cyclame et du cyclène	41
5.	Exemples d'applications en pré-clinique et en clinique.....	42
5.1.	Anticorps monoclonaux et peptides	42
5.2.	Analogues des récepteurs à la somatostatine	43
5.3.	Peptides ciblant les intégrines.....	44
5.4.	PSMA	45
5.5.	Chlorure de cuivre-64.....	45
III.	UN MODELE POUR L'ETUDE DU MYELOME MULTIPLE : L'ANTICORPS 9E7.4	47
1.	Le myélome multiple	47
1.1.	Physiopathologie et épidémiologie.....	47
1.2.	Classification et manifestations cliniques	47
1.3.	Diagnostic	48
1.4.	Prise en charge thérapeutique	50
1.5.	Place de l'immuno-TEP dans la prise en charge du myélome multiple	50
2.	L'anticorps monoclonal 9E7.4	51
2.1.	Cible de l'anticorps	51
2.2.	Production et propriétés	52
3.	Radiomarquage de l'anticorps 9E7.4	53
3.1.	Principes généraux	53
3.2.	Ligands utilisés.....	54
a.	Ligands commerciaux	54
b.	Le ligand TE1PA, un ligand original de type cyclame	54
IV.	PARTIE EXPERIMENTALE	56
1.	Matériel et méthodes.....	56
1.1.	Matériel	56
1.2.	Couplage.....	56
a.	Préparation de l'AcM.....	56

b.	NHS-DOTA, NCS-DOTA, NCS-NOTA, NHS-NODA-GA et NCS-TE1PA	57
c.	TE1PA non fonctionnalisé.....	57
1.3.	Purification	57
1.4.	Caractérisation des immunoconjugués	58
a.	Détermination du nombre de ligands couplés par AcM et pureté radiochimique	58
b.	Purification des radioimmunoconjugués	59
c.	Evaluation de l'immunoréactivité	59
2.	Résultats	59
2.1.	Contrôle du pourcentage d'agrégats d'AcM après couplage.....	59
2.2.	Mise au point du couplage du NCS-TE1PA sur les AcM 9E7.4 et hLL2	62
2.3.	Nombre de ligands par anticorps et rendement de radiomarquage	63
2.4.	Immunoréactivité	64
2.5.	Activité spécifique molaire	65
V.	DISCUSSION.....	66
	CONCLUSION	70
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	71

LISTE DES ABREVIATIONS

AcM : Anticorps Monoclonal

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ARRONAX : Accélérateur pour la Recherche en Radiochimie et Oncologie à Nantes-Atlantique

ATSM : Diacetyl-2,3-*bis*(*N*⁴-methyl-3-thiosemicarbazone)

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

BSA : Bovine Serum Albumin

CB : Cross-Bridge

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CDR : Complementarity Determining Region

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

CRCINA : Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes Angers

CXCR4 : C-X-C chemokine receptor 4

DBCO : Dibenzocyclooctyne

DO2A : 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-diacetic acid

DOPA : 3,4-dihydroxyphénylalanine

DOTA : 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid

DTPA : Diethylenetriaminepentaacetic acid

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

EDC : *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide hydrochloride

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EPP : Electrophorèse des Protéines Plasmatiques

ESH : Electrode Standard à Hydrogène

eV : Electron-Volt

FDG : Fluorodésoxyglucose

HER2 : Human Epidermal Growth factor Receptor-2

ICP-OES : Inductively coupled plasma mass spectrometry

Ig : Immunoglobuline

ITLC-SG : Instant Thin Layer Chromatography Silica Gel

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

MES : 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid

MGUS : Monoclonal Gammopathy of Uncertain Significance

MM : Myélome Multiple

MURR : Missouri University Research Reactor

NCS : Isothiocyanate

NHS : *N*-hydroxysuccinimide

NOTA : 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid

OAF : Osteoclast Activation Factor

PBS : Phosphate Buffer Saline

PET-CT : Positron Emission Tomography-Computed Tomography

PSMA : Prostate-Specific Membrane Antigen

PSMA-617 : 2-[3-(1-carboxy-5-{3-naphthalen-2-yl-2-[(4-{[2-(4,7,10-tris-carboxymethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododec-1-yl) acetylamino]methyl} cyclohexanecarbonyl) amino] propionylamino} pentyl) ureido]-pentanedioic acid

RIT : Radioimmunothérapie

SALEN : 2,2'-ethylenebis(nitrilomethylidene)diphenol, *N,N'*-ethylenebis(salicylimine)

SATA : *N*-succinimide *S*-acéylthioacétate

SNHS : *N*-hydroxysulfosuccinimide

SPAAC : Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition

Tachpyr : *N,N',N''*-tris(2-pyridylmethyl)-*cis,cis*-1,3,5-triaminocyclohexane

TACN : 1,4,7-triazacyclononane

TDM : Tomodensitométrie

TE1A1P : 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1-(methanephosphonic acid)-8-methanecarboxylic acid

TE2A : 1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecane-4,11-diacetic acid

TEMP : Tomographie par Emission Monophotonique

TETA : *N,N'*-bis(2-aminoethyl)ethane-1,2-diamine

TEP : Tomographie par Emission de Positons

THPTA : Tris(hydroxypropyltriazolyl)methylamine

Tr : Temps de rétention

UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography

Y3-OC : Tyr³-octréotide

Y3-TATE : Tyr³-octréotate

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique du principe de fonctionnement de l'imagerie TEP. (page 15)

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux émetteurs β^+ utilisables pour la TEP. (page 22)

Figure 2 : Exemple de complexation du Cu(II) avec l'EDTA : représentation schématique (à gauche) et photo du produit sous forme de poudre. (page 23)

Figure 3 : Représentation schématique de la décroissance du cuivre-64. (page 24)

Figure 4 : Représentation simplifiée du trajet d'une particule au sein d'un cyclotron. (page 26)

Figure 5 : Comparaison entre les sections efficaces de production du ^{64}Cu par la réaction $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ (à gauche) et par la réaction $^{64}\text{Ni}(d,2n)^{64}\text{Cu}$ (à droite). (page 27)

Figure 6 : Une cible de ^{64}Ni sur son support en or utilisée pour la production de ^{64}Cu . (page 28)

Figure 7 : Représentation schématique de quelques fonctions de couplage conventionnelles ; R représentant le ligand portant la fonction. (page 34)

Figure 8 : Schéma de la réaction de conjugaison entre un ester NHS et une amine primaire ; R représente le ligand et P la protéine (type AcM) portant la fonction réactive. (page 35)

Figure 9 : Schéma de la réaction de conjugaison entre une fonction maléimide et un sulfhydryle. R représente le ligand et P la protéine (AcM) portant la fonction réactive. (page 36)

Figure 10 : Représentation schématique de la réaction SPAAC (a) avec l'exemple du DBCO et de la cycloaddition retro-Diels-Alder (b). (page 37)

Figure 11 : Représentation schématique des ligands acycliques EDTA, DTPA, SALEN, diphosphine, ATSM et PTSM. (page 38)

Figure 12 : Représentation schématique des bases cyclame et cyclènes, ainsi que des ligands DOTA, NOTA et TETA. (page 39)

Figure 13 : Représentation schématique des ligands tachpyr et sarcophagine. (page 40)

Figure 14 : Représentation schématique de ligands *cross-bridge*. (page 41)

Figure 15 : Radiographie standard du crâne montrant de multiples lésions de type lacunaire à l'« emporte-pièces ». (page 49)

Figure 16 : Représentation schématique des ligands utilisés dans cette étude. (page 55)

Figure 17 : Chromatogrammes UV obtenus pour l'AcM 9E7.4 non modifié, le 9E7.4-TE1PA et le 9E7.4-NCS-TE1PA (**a**) et pour 9E7.4-NHS-DOTA, le 9E7.4-NCS-DOTA, le 9E7.4-NCS-NOTA et le 9E7.4-NHS-NODA-GA (**b**). (pages 60 et 61)

Tableau 2 : Pourcentage d'agrégats mesurés par UPLC pour les immunoconjugués 9E7.4-TE1PA, 9E7.4-NCS-TE1PA, 9E7.4-NHS-DOTA, 9E7.4-NCS-DOTA, 9E7.4-NCS-NOTA et 9E7.4-NHS-NODA-GA. (page 62)

Tableau 3 : Nombre de ligands couplés par AcM pour le hLL2-NCS-TE1PA et le 9E7.4-NCS-TE1PA, lors de couplages réalisés avec 10, 20 et 50 eq. molaires de ligands. (page 62)

Tableau 4 : Nombre de ligands couplés par AcM 9E7.4 et rendement de radiomarquage au ^{64}Cu pour les immunoconjugués à base de TE1PA, NCS-TE1PA, NHS-DOTA, NCS-DOTA, NCS-NOTA et NHS-NODA-GA (n = 3). (page 63)

Figure 18 : Radiochromatogrammes obtenus pour les radioimmunoconjugués dérivés du TE1PA (lane #2), du NCS-TE1PA (lane #3), du NHS-DOTA (lane #4), du NCS-DOTA (lane #5), du NCS-NOTA (lane #6) et du NHS-NODA-GA (lane #7). La lane #1 représente le témoin $^{64}\text{CuCl}_2$ libre (non radiomarqué). (page 64)

Tableau 5 : Immunoréactivité déterminée après marquage au ^{64}Cu pour le 9E7.4-*p*-NCS-Bn-TE1PA, le 9E7.4-NHS-DOTA, le 9E7.4-*p*-NCS-Bn-DOTA et le 9E7.4-*p*-NCS-Bn-NOTA (n = 3). (page 65)

INTRODUCTION

Le Code de la Santé Publique définit le médicament radiopharmaceutique comme « tout médicament qui, lorsqu'il est prêt à l'emploi, contient un ou plusieurs isotopes radioactifs, dénommés radionucléides, incorporés à des fins médicales » (article L. 5121-1). Depuis sa définition légale en France en 1992, ce secteur n'a cessé de croître et vient enrichir l'arsenal diagnostique et thérapeutique de nombreux domaines cruciaux, telles la cancérologie, la cardiologie ou la neurologie.

Le médicament radiopharmaceutique est constitué d'un isotope radioactif, aussi appelé traceur, associé ou non à un vecteur. Ce dernier a un tropisme particulier pour un organe, une fonction physiologique ou une pathologie, et permet de cibler spécifiquement ce que l'on cherche à visualiser ou à traiter. L'isotope radioactif peut lui-même remplir le rôle de vecteur, comme dans le cas du thallium-201 ou de l'iode-123/131.

La nature du rayonnement émis par l'isotope conditionne son utilisation. On peut ainsi distinguer :

- Les émetteurs γ et β^+ , qui seront utilisés à des fins diagnostiques. Les rayonnements émis sont détectés par une gamma-caméra : cet examen est appelé scintigraphie. La tomographie par émission monophotonique (TEMP) repose sur la détection de photons gamma, alors que la tomographie par émission de positons (TEP) concerne les émetteurs de positons β^+ .

- Les émetteurs α et β^- , qui seront utilisés à des fins thérapeutiques. Il s'agit d'une radiothérapie interne vectorisée où l'isotope est amené au plus près de l'organe cible. Les effets biologiques du rayonnement permettent la mort par irradiation des cellules visées en limitant au maximum l'atteinte des tissus sains.

En fonction de la pathologie, le vecteur choisi doit présenter une spécificité suffisante pour limiter le bruit de fond (imagerie) ou réduire les lésions aux tissus sains (thérapie). Sa période biologique, c'est-à-dire le temps nécessaire à l'organisme pour éliminer la moitié des molécules administrées, doit être adaptée à la période radioactive de l'isotope (délai pour que la moitié des noyaux présents soit désintégrée). Sa nature (anticorps monoclonal, molécule biologique, cellule sanguine...) va également influencer sur les réactions chimiques d'association du radionucléide sur le vecteur. Ces dernières devront permettre de conserver les propriétés biologiques du vecteur tout en liant de façon stable le vecteur et le radionucléide.

L'isotope doit quant à lui émettre un rayonnement d'une énergie suffisante pour être détectée par une gamma-caméra ou permettre la destruction des tissus visés, mais pas trop élevée pour ne pas saturer le détecteur ou exposer le patient à une irradiation non désirée. Sa période radioactive doit être compatible avec le déroulement de l'examen. De plus, ses propriétés chimiques vont aussi conditionner le radiomarquage (liaison entre le vecteur et le radionucléide) avec un vecteur donné.

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion d'être confrontée à certaines de ces problématiques. En effet, j'ai travaillé au développement d'un radiopharmaceutique potentiel pour la thérapie et le diagnostic (approche dite « théranostique ») dans le domaine de la cancérologie. L'isotope utilisé pour ce médicament est un émetteur β^+/β^- , le cuivre-64 : ce mémoire se restreindra donc à l'imagerie phénotypique TEP en radiopharmacie et à la place du cuivre-64 dans cette utilisation. Le but sera d'aborder les problématiques de développement *in vitro* d'un radiopharmaceutique à base de cuivre-64, à travers un modèle d'application potentielle, le myélome multiple. Cette étude se concentrera sur le ligand utilisé pour le radiomarquage du cuivre-64, un paramètre essentiel à l'obtention d'un radiopharmaceutique utilisable *in vivo*.

Dans un premier temps, j'aborderai l'imagerie phénotypique TEP, son fonctionnement, sa place dans l'arsenal diagnostique ainsi que les différents isotopes potentiels. La seconde partie se concentrera sur le cuivre-64, ses propriétés et les problématiques spécifiques à son utilisation pour le radiomarquage de molécules. La troisième partie abordera le modèle utilisé, le myélome multiple et les principes généraux de radiomarquage dans ce contexte. Enfin, la dernière partie exposera une sélection de différents ligands du cuivre-64, avec les résultats obtenus *in vitro*.

I. L'IMAGERIE PHENOTYPIQUE TEP EN CANCEROLOGIE

1. Définition de la TEP et de l'imagerie phénotypique TEP

La tomographie par émission de positons est une technique d'imagerie médicale permettant de mesurer en trois dimensions l'activité métabolique ou moléculaire d'un organe, par détection indirecte des positons (rayonnement β^+) émis à partir d'un isotope radioactif préalablement injecté au patient. Comme il s'agit de visualiser les variations temporelles et spatiales de fixation de la radioactivité au sein d'un organe ou d'un tissu, la TEP fait partie des techniques d'imagerie fonctionnelle, par opposition à l'imagerie morphologique (rayons X, IRM conventionnelle) qui permet d'obtenir une image de l'anatomie des organes d'un patient.

L'imagerie phénotypique TEP quant à elle va cibler les cellules en fonction de leur expression phénotypique, c'est-à-dire en reconnaissant certains marqueurs spécifiques présents sur ou dans la cellule. Les vecteurs utilisés peuvent être de différentes natures ; lorsqu'ils sont constitués d'anticorps ou de dérivés d'anticorps, on parle de vecteurs immuns et donc d'imagerie immuno-phénotypique (immuno-TEP). L'imagerie phénotypique TEP s'intègre dans l'approche dite de « médecine personnalisée », en permettant le ciblage du profil moléculaire des tumeurs afin d'adapter ensuite le traitement pour chaque patient.

2. Principes de ciblage et de détection des rayonnements émis

2.1. Stratégies de ciblage

Actuellement, les radiopharmaceutiques utilisés en clinique pour l'exploration TEP reposent comme dit précédemment sur la métabolisation de la molécule marquée par la cellule. Le plus ancien et le plus utilisé encore à l'heure actuelle est le 2-désoxy-2-(^{18}F)fluoro-D-glucose ou fluorodésoxyglucose (FDG)¹, un analogue du glucose radiomarké au fluor-18. Il est prioritairement métabolisé par les cellules très consommatrices de glucose : principalement les cellules cancéreuses, cardiaques et du système nerveux central. Cette différence de captation est due à une variation d'expression d'un transporteur membranaire spécifique du glucose, GLUT-1². L'intensité de la fixation du glucose par la cellule va dépendre du niveau d'expression de cette protéine : le FDG est donc indirectement un marqueur du phénotype tissulaire « surexpression de GLUT-1 »³. Une fois internalisé, le ^{18}F -FDG est

métabolisé en fluorodésoxyglucose-6-phosphate, qui reste piégé à l'intérieur de la cellule où il s'accumule.

D'autres vecteurs peuvent être utilisés en fonction de la pathologie à étudier et des modifications métaboliques qu'elle entraîne. Il est également possible d'utiliser directement des isotopes sans vecteur, avec des éléments ayant un rôle dans la matière vivante (comme par exemple l'oxygène-15)⁴.

Le ciblage dans le cas de l'imagerie immuno-phénotypique repose sur une réaction directe entre un vecteur de type immunologique et un antigène spécifique d'un tissu. Le vecteur, choisi en fonction des marqueurs présents à la surface de la cellule, est une molécule immunologique pouvant être de différentes natures, tels un anticorps⁵ ou dérivés d'anticorps, une protéine, un peptide...

2.2. Détection du rayonnement émis

Le principe de la TEP repose sur une particularité physique des positons émis lors d'une désintégration radioactive de type β^+ . Après un très court trajet dans la matière, le positon entre en contact avec un électron du milieu et les deux particules s'annihilent. Il en résulte un rayonnement caractéristique composé de deux photons γ d'énergie 511 keV, émis simultanément dans la même direction mais en sens opposé. Ces photons sont détectés par un capteur en anneau qui entoure le patient (**Figure 1**)⁶. En partant du principe que deux photons de même énergie émis en coïncidence ont le même point d'origine, un algorithme peut calculer l'espace où a eu lieu l'annihilation, et donc la position de l'isotope, au parcours moyen près du positon. Le volume de l'objet est calculé selon une technique appelée tomographie, qui permet la reconstitution en trois dimensions de la répartition de l'isotope au sein du patient à partir d'images planes obtenues suivant plusieurs incidences⁷.

La TEP est toujours couplée à une imagerie anatomique : tomodensitométrie (TDM) dans la majorité des cas, ou IRM. On parle alors de TEP-TDM (PET-CT en anglais)⁸ ou de TEP-IRM (PET-MR en anglais). Contrairement à la TEP, les rayons X utilisés en TDM ne proviennent pas d'un isotope injecté au patient, mais d'une source externe. Ces rayons traversent le patient et sont plus ou moins absorbés par les tissus en fonction de leur densité. L'intensité du flux après traversée va être traduite en images et leur analyse selon différentes incidences

va permettre l'obtention d'une tomographie. Leur superposition avec les images TEP facilite la localisation de l'isotope tout en permettant l'analyse de la fonctionnalité des tissus⁹⁻¹¹. La résolution spatiale de la TEP-TDM est de l'ordre de 4 à 7 mm en imagerie clinique et d'environ 1 mm en imagerie pré-clinique sur des modèles murins ou de rat¹².

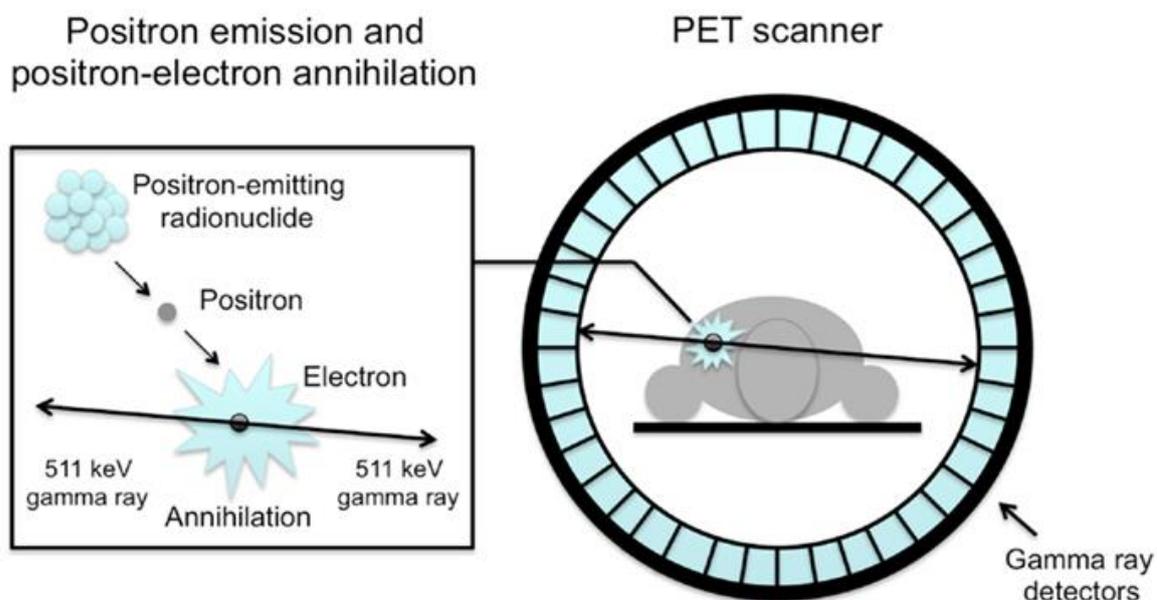


Figure 1 : Représentation schématique du principe de fonctionnement de l'imagerie TEP⁶.

Les détecteurs TEP doivent être adaptés à la détection des photons d'énergie 511 keV. Ils sont constitués de cristaux scintillateurs couplés à des photomultiplicateurs. Ces cristaux sont composés d'une matière qui, sous l'effet d'un rayonnement incident, va émettre de la lumière. Un dispositif appelé photocathode placé à l'arrière des détecteurs permet la transformation en électrons des lumières émises au sein du cristal. Le signal électronique est alors amplifié en cascade par des dynodes avant d'être traduit en image. Les caméras TEP utilisent généralement des scintillateurs inorganiques constitués d'un minéral doté de propriétés de scintillation : iodure de sodium, germanate de bismuth ou encore orthosilicate de gadolinium¹³.

3. Indications et limitations de la TEP métabolique

3.1. Indications et applications

Depuis l'obtention de son AMM en 1998, le ^{18}F -FDG a permis à la TEP de prendre une place prépondérante en imagerie médicale¹, principalement en oncologie¹⁴. Les cellules tumorales malignes qui surexpriment GLUT-1 présentent un hypermétabolisme du glucose, entraînant une accumulation du FDG radiomarqué en leur sein. La TEP est ainsi extrêmement utile dans les diagnostics et pronostics des cancers, soit seule soit associée à d'autres techniques d'imagerie. Elle permet en effet la visualisation et la quantification de l'ensemble des tumeurs à partir d'images « corps entier » et représente de ce fait un outil majeur dans l'établissement du diagnostic initial et des bilans d'extension¹⁵. Elle est également un outil pronostic de première importance car elle permet d'évaluer la réponse au traitement ainsi que le suivi après rémission pour surveiller l'apparition d'une éventuelle rechute.

Le ^{18}F -FDG a également des applications en neurologie : en effet, le glucose est fortement consommé par les neurones, ce qui permet d'évaluer l'activité des zones du cerveau en fonction de la radioactivité qui y est relevée. On peut ainsi suivre la progression de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer¹⁶ par quantification de la radioactivité associée aux zones d'hypofixation correspondant à la dégénérescence. Le ^{18}F -FDG est aussi indiqué en cardiologie¹⁷ pour l'évaluation de la perfusion myocardique, ainsi que dans certaines pathologies inflammatoires et infectieuses¹⁸.

Depuis 2010, de nouveaux vecteurs pour le fluor-18 sont apparus sur le marché, pour des indications plus restreintes. On peut citer la ^{18}F -choline pour le cancer de la prostate¹⁹, le ^{18}F -Na pour la scintigraphie osseuse²⁰, le ^{18}F -DOPA pour la maladie de Parkinson²¹ et certaines tumeurs endocrines²² ou le plus récent ^{18}F -florbétapir, marqueur des plaques séniles β -amyloïdes de la maladie d'Alzheimer²³.

3.2. Limitations du ^{18}F -FDG et des vecteurs métaboliques

L'utilisation du FDG comme vecteur pour la TEP en oncologie reposant sur la détection du métabolisme des tumeurs, son intérêt devient limité lorsque les cellules cancéreuses sont quiescentes ou à faible renouvellement (cancer de la prostate, tumeurs neuroendocrines, carcinome rénal, myélome multiple...)^{24,25}. De même, les tumeurs de très petite taille ou celles proches d'organes hyperfixant le glucose (cerveau, vessie, cœur) seront difficiles à visualiser²⁶.

Le FDG n'étant pas un vecteur spécifique des cellules tumorales, il peut aussi entraîner des faux positifs en s'accumulant dans les lésions non cancéreuses mais présentant un fort métabolisme dû à des causes inflammatoires ou infectieuses.

Comme vu précédemment, de nouveaux vecteurs métaboliques ont été développés afin de pallier ces inconvénients. Cependant, malgré une plus grande spécificité vis-à-vis de leur pathologie, le ciblage repose dans tous les cas sur le métabolisme des cellules tumorales. De plus, aucun réel progrès n'a été réalisé dans le développement d'outils de diagnostic pour certaines pathologies, comme le myélome multiple et le carcinome rénal. Dans ce contexte, l'immuno-TEP prend une place de choix, car elle n'est pas influencée par le métabolisme cellulaire et permet d'enrichir le diagnostic et le pronostic lorsque la TEP métabolique se révèle insuffisante.

4. Place de l'immuno-TEP dans l'arsenal diagnostique et thérapeutique

4.1. Avantages de l'imagerie phénotypique en oncologie

Dans les années 2000, l'oncologie a connu un important bouleversement avec l'arrivée des thérapies ciblées et de l'immunothérapie, venues renforcer l'arsenal thérapeutique existant, majoritairement composé des chimiothérapies dites cytotoxiques. Ces médicaments se fixent sur des cibles moléculaires de la croissance et/ou de la propagation des cellules tumorales, plutôt que d'inhiber et détruire de façon non spécifique les cellules à renouvellement rapide²⁷. Ils s'inscrivent dans une approche dite de « médecine de précision », permettant de proposer au patient un traitement adapté aux anomalies de sa tumeur. Le trastuzumab, un AcM (anticorps monoclonal) dirigé contre le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2), a été la première thérapie ciblée à obtenir l'AMM en France en 2000 dans le cas du cancer du sein métastatique présentant une surexpression de ce gène. Quinze ans plus tard, 43 thérapies ciblées disposent en France d'une AMM en cancérologie et un médicament anticancéreux sur quatre utilisés appartient à cette classe. Néanmoins, leur inconvénient majeur est leur coût élevé : en moyenne, le coût mensuel d'une thérapie ciblée est de plus de 3000 euros HT, pouvant dépasser 6000 euros HT pour les plus chères. Ils présentent également des effets indésirables potentiellement graves, nécessitant une évaluation soigneuse de la balance bénéfices/risques.

Il est donc particulièrement important de pouvoir sélectionner les patients éligibles à une thérapie ciblée. Pour ce faire, le profil phénotypique de la tumeur doit être connu. Si l'on reprend l'exemple du trastuzumab, il ne sera efficace que contre les tumeurs HER2 positives, qui concernent 15 à 20 % des cancers du sein²⁸. Afin de quantifier la surexpression du gène HER2, on effectue des tests par immunohistochimie sur une biopsie de la tumeur. Néanmoins, cette méthode possède plusieurs inconvénients. Il s'agit déjà d'un geste invasif, puisque nécessitant de prélever des cellules au sein de la tumeur. Également, certaines métastases peuvent être localisées dans des endroits difficiles d'accès ou proches d'organes fragiles comme le cerveau, avec un risque de lésion lors de la biopsie. Il a aussi été démontré que l'expression phénotypique des tumeurs peut évoluer au cours de la maladie²⁹. Ceci est dû à la forte hétérogénéité de certains types de tumeur, dont dépend ensuite l'expression des métastases. Différents paramètres sont susceptibles d'influencer la sélection clonale des cellules cancéreuses, comme le microenvironnement tumoral ou la thérapie anticancéreuse. La biopsie d'une métastase ou d'une tumeur primaire n'est donc pas le reflet de l'expression phénotypique de toutes les cellules tumorales et peut mener à une thérapie inadaptée.

L'immuno-TEP intervient comme méthode non-invasive pour évaluer l'expression des cellules cancéreuses en amont et au cours du traitement, en s'affranchissant des limitations évoquées ci-dessus. Outre la sélection des patients éligibles au traitement, l'immuno-TEP permet d'optimiser la posologie et d'évaluer la réponse thérapeutique³⁰. Des radiopharmaceutiques ciblant HER2 sont en développement dans ce sens^{31,32}. D'autres vecteurs sont explorés pour les cancers présentant des problématiques similaires, comme le myélome multiple³³, le carcinome rénal³⁴ ou les lymphomes.

L'immuno-TEP se révèle également être un outil d'intérêt prédictif de la radio-immunothérapie (RIT). Il s'agit d'un type de radiothérapie interne vectorisée, utilisant des AcM tout comme l'imagerie phénotypique. La RIT permet d'amener l'isotope radioactif au plus près de la cellule cancéreuse afin de maximiser l'effet cytotoxique des rayonnements et de limiter les dommages aux tissus sains.

La RIT peut utiliser des isotopes émetteurs β^- , comme l'yttrium-90 ou l'iode-131, dont les électrons émis sont capables de réaliser un long parcours dans les tissus (50 μm à 12 mm). La RIT β^- a montré son efficacité en pré-clinique et en clinique, tout particulièrement dans les cancers hématologiques³⁵. C'est d'ailleurs dans l'indication du lymphome B non hodgkinien que le seul médicament de RIT a reçu son AMM en France, un AcM anti-CD20 marqué à

l'yttrium-90 (Zevalin). Une autre approche est l'utilisation de particules α , très peu pénétrantes mais beaucoup plus énergétiques (de 5 à 9 MeV, contre 30 keV à 2,3 MeV pour les particules β^-). La RIT α a été étudiée en clinique notamment dans le traitement du glioblastome avec l'astate-211, dans la leucémie myéloïde aigüe avec l'actinium-225 ou également dans le lymphome B non hodgkinien avec le bismuth-213³⁶.

L'immuno-TEP s'inscrit parfaitement comme outil d'aide à l'optimisation de la RIT dans une approche théranostique. L'imagerie permet la sélection des patients éligibles ainsi qu'une dosimétrie prédictive de l'efficacité thérapeutique afin de limiter les dommages de la RIT aux tissus sains³⁷. Le même vecteur est utilisé pour les deux approches ; il est également possible d'utiliser deux isotopes du même élément chimique ou de propriétés chimiques proches afin de ne pas modifier le comportement biologique du radiopharmaceutique. Les couples comprenant un émetteur β^+ et un émetteur β^- , qui sont les $^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$, $^{124}\text{I}/^{131}\text{I}$, $^{86}\text{Y}/^{90}\text{Y}$ et $^{152}/^{155}\text{Tb}/^{161}\text{Tb}$, sont particulièrement intéressants pour ce type d'approche.

4.2. Importance de la cible et du vecteur

a. Choix de la cible

Un antigène doit répondre à un certain nombre de critères pour pouvoir être considéré comme une cible acceptable pour l'immuno-TEP³⁸. Il est préférable qu'il se trouve à la surface de la cellule, ce qui facilite son accessibilité par le vecteur. Il doit être surexprimé par les cellules cibles et peu ou pas exprimé par les cellules saines, afin d'avoir un contraste tumeur sur bruit de fond suffisant pour permettre l'interprétation correcte des images et limiter l'irradiation non spécifique des tissus sains. Le devenir de la cible est aussi à prendre en compte : dans l'idéal, elle ne devrait être internalisée par la cellule que lorsque cette internalisation est à l'origine d'une accumulation de la radioactivité dans la cellule, sans phénomène d'efflux associé. Dans le cas contraire, il semble préférable que la cellule soit irradiée à partir d'une fixation membranaire du radiopharmaceutique.

Parmi les cibles les plus utilisées dans le développement de radiopharmaceutiques pour l'immuno-TEP, on retrouve notamment le HER2 et le CD20 mentionnés plus haut ainsi que le PSMA, un antigène spécifique de la membrane des cellules prostatiques³⁹.

b. Choix du vecteur

En fonction du type de molécule choisie comme vecteur, la biodistribution du radiopharmaceutique ainsi que sa demi-vie biologique seront variables. Cela influe également sur l'affinité du vecteur pour sa cible et donc sur la qualité du ciblage tumoral. Ces paramètres sont à prendre en compte en fonction de la cible, afin de permettre une clairance sanguine du radiopharmaceutique et une accumulation spécifique au niveau de la tumeur.

La pharmacocinétique propre au vecteur joue un rôle important dans son choix. Elle varie en fonction de nombreux paramètres chimiques, comme sa taille, sa charge, les structures chimiques présentes et sa nature. La dosimétrie, soit la détermination quantitative de la dose absorbée par les différents organes, va donc dépendre de la biodistribution du radiopharmaceutique.

A l'heure actuelle, les molécules les plus utilisées sont des AcM entiers. Les anticorps sont des molécules de grande taille (environ 150 kDa), avec une longue demi-vie sanguine, en moyenne 1 à 3 semaines⁴⁰. Cela peut constituer un inconvénient en clinique humaine, nécessitant parfois un délai entre l'administration du radiopharmaceutique et l'acquisition de l'image, entraînant des contraintes techniques ainsi que l'irradiation du patient et de son entourage. C'est pour pallier ce problème que des fragments et dérivés d'anticorps de plus petite taille ont été développés⁴¹. Les fragments d'AcM de taille inférieure à 70 kDa sont rapidement éliminés au niveau du rein par filtration glomérulaire, menant à des demi-vies sanguines de l'ordre de quelques heures. Néanmoins, en augmentant la clairance sanguine, on observe une perte de ciblage de la tumeur. Le type de vecteur doit donc être choisi en fonction de la cible, de l'indication et de l'isotope utilisé.

D'autres vecteurs protéiques non dérivés d'AcM ont récemment été développés. Les plus utilisées sont les molécules de type affibody⁴², des peptides artificiels de très petite taille (environ 6 kDa). Ils possèdent une haute affinité pour leur cible et, contrairement aux AcM et dérivés d'AcM, sont très résistants, pouvant supporter des températures jusqu'à 100°C et de grandes variations de pH.

4.3. Emetteurs β^+

a. *Caractéristiques recherchées*

Afin de pouvoir permettre une acquisition par imagerie TEP, l'isotope contenu dans un radiopharmaceutique doit émettre un rayonnement de type β^+ suffisamment important pour une bonne détection. Pour rappel, dans ce type de rayonnement, au sein d'un noyau instable riche en protons, un proton est converti en neutron avec émission d'une particule β^+ (aussi appelée positon) et d'un neutrino. L'énergie dégagée au cours de cette émission est variable selon le radioélément concerné et a un impact direct sur son choix⁴³. Les rayonnements de forte énergie peuvent diminuer la qualité de l'image et sa résolution du fait de leur parcours long dans la matière. La période physique de l'isotope doit aussi être compatible avec la période biologique du vecteur. Par exemple, le fluor-18 ($t_{1/2} = 110$ min) n'est généralement pas adapté à l'utilisation d'AcM entiers comme vecteurs ($t_{1/2} = 1$ à 3 semaines)³⁰. Une émission concomitante γ de haute énergie n'est pas non plus souhaitable dans la majorité des cas, car elle nécessiterait un isolement du patient afin d'éviter une irradiation de son entourage³⁸. Dans le cas d'une approche théranostique, les radioéléments possédant des isotopes émetteurs β^- sont particulièrement intéressants. Enfin, un facteur important à considérer est la disponibilité du radionucléide : ils nécessitent souvent la proximité d'un cyclotron permettant la production de l'isotope.

b. *Principaux émetteurs β^+ utilisables en immuno-TEP*

Les émetteurs β^+ les plus utilisés en recherche et en clinique pour l'immuno-TEP peuvent être séparés en deux grandes catégories : les radiohalogènes (fluor-18, iode-124) et les radiométaux (zirconium-89, gallium-68 et cuivre-64). Leur chimie différente a un impact sur l'élaboration du radiopharmaceutique : si les halogènes peuvent généralement se coupler directement sur le vecteur, les métaux nécessitent une molécule intermédiaire appelée ligand, qui améliore la stabilité du radiomarquage. Les différents avantages et inconvénients de ces isotopes sont récapitulés dans le **Tableau 1**.

Le cuivre-64 ayant été choisi comme traceur pour le développement du radiopharmaceutique, c'est sur cet isotope, ses propriétés et les problématiques de radiomarquage que se poursuivra ce mémoire.

	Période	E β max (keV)	% β^+	Avantages	Inconvénients
Fluor-18	1,83 h	634	97	Faible énergie β^+ Disponibilité Faible coût	Radiomarquage en plusieurs étapes Faible rendement de marquage avec les macromolécules Faible période comparée à la demi-vie sanguine des AcM
Gallium-68	1,13 h	1899	88	Production en générateur Coût modéré	Formation dans l'eau d'hydroxydes insolubles à pH > 4 Faible période comparée à la demi-vie sanguine des AcM
Iode-124	100,3 h	1532 2135	11 11	Rendement de radiomarquage élevé avec les macromolécules Radiomarquage direct Production selon BPF	Faible disponibilité Rayonnement β de haute énergie Rayonnement γ associé de haute énergie Contraintes de radioprotection
Zirconium-89	78,4 h	909	23	Longue période Rendement de radiomarquage élevé avec les macromolécules Production selon BPF	Rayonnement γ associé de haute énergie Seulement un agent chélatant disponible Transchélation <i>in vivo</i> Risque de contamination métallique
Cuivre-64	12,7 h	653	18	Faible énergie β^+ Rendement de radiomarquage élevé avec les macromolécules Période adaptée à celle des AcM Faible coût de production Complexation par les azamacrocycles Emission β^- associée pour la thérapie Moins de 1 % de rayonnement γ associé	Transchélation <i>in vivo</i> Faible disponibilité Risque de contamination métallique

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux émetteurs β^+ utilisables pour la TEP

II. LE CUIVRE-64

1. Propriétés

1.1. Chimiques

Le cuivre (Cu) est l'élément chimique numéro 29 et appartient à la famille des métaux de transition. De configuration électronique $[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^1$, il peut exister en solution sous trois degrés d'oxydation (+I, +II et +III). Ces différentes formes vont influencer la cinétique et la stabilité des complexes de cuivre qui en découlent⁴⁴.

Le cuivre Cu(I) possède une configuration électronique $[\text{Ar}] 3d^{10}$ (soit une sous-couche électronique totalement saturée en électrons). Il forme des complexes souvent instables car l'énergie de stabilisation du champ cristallin est égale à zéro, du fait de la saturation d'orbitale 3d. Les complexes de Cu(I) sont souvent peu voire non solubles dans l'eau et se forment principalement à partir de composés faiblement polarisables, tels les cyanures, les thiolates ou les nitriles.

Le degré d'oxydation +II représente la forme majoritaire du cuivre en solution aqueuse. De configuration électronique $[\text{Ar}] 3d^9$, il forme des complexes cinétiquement stables, notamment avec les amines, les imines ou les pyridines. C'est sous cette forme que le cuivre présente sa couleur bleue caractéristique (**Figure 2**).

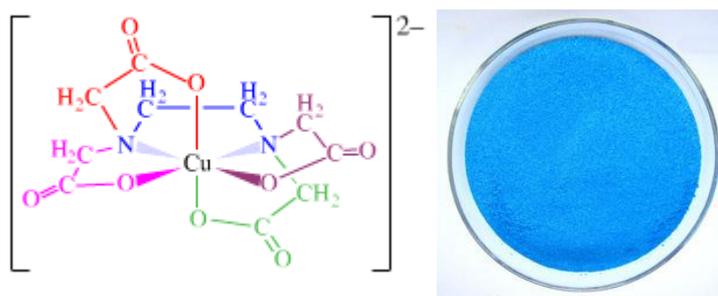


Figure 2 : Exemple de complexation du Cu(II) avec l'EDTA : représentation schématique (à gauche) et photo du produit sous forme de poudre.

Enfin, le cuivre au degré d'oxydation +III (configuration électronique $[\text{Ar}] 3d^8$) est relativement rare car sa stabilisation sous forme de complexes nécessite des ligands π -donneurs forts.

1.2. Physiques

Le cuivre possède 29 isotopes connus, dont deux sont considérés stables : le cuivre-63 et le cuivre-65. Parmi ces isotopes, le cuivre-64 est celui dont le noyau est composé de 29 protons et 37 neutrons et dont la période physique est de 12,7 h. Il se désintègre en nickel-64 par émission β^+ avec une probabilité de 17,52 % : il s'agit du rayonnement d'intérêt pour une application en immuno-TEP (**Figure 3**). Mais il se désintègre également en zinc-64 par émission β^- (38,48 %) et en nickel-64 par capture électronique (44 %). Cette dernière peut se faire par voie directe (43,53 % de l'émission totale) ou indirecte (0,4744 %, engendre l'émission d'un rayonnement γ de forte énergie).

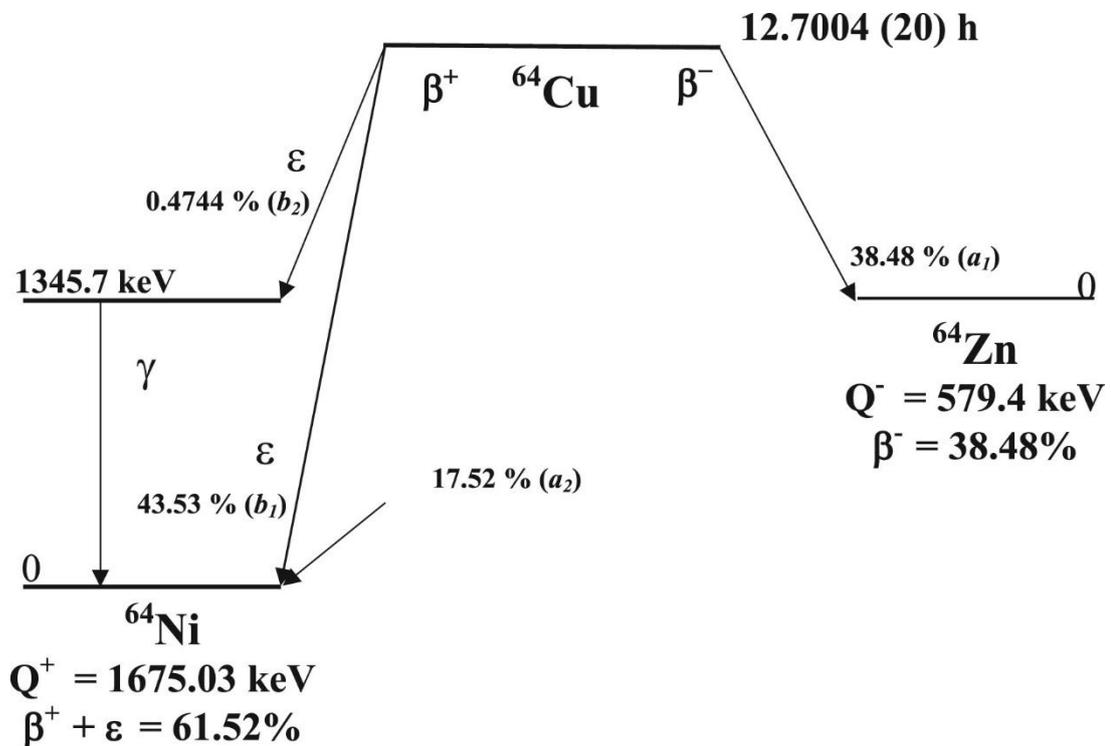


Figure 3 : Représentation schématique de la décroissance du cuivre-64⁴⁵.

En résumé, le cuivre-64 est à la fois un émetteur de particules (β^+/β^- , électrons Auger suite à la capture électronique) et de photons (rayonnement γ , rayonnement X de fluorescence suite à la capture électronique). Il présente donc des propriétés théranostiques.

2. Méthodes de production

La production du cuivre-64 se fait en bombardant une cible avec un rayonnement particulaire, conduisant à la transmutation nucléaire des éléments stables de la cible en cuivre-64. Cette production peut s'effectuer soit en accélérateur (cyclotron) soit en réacteur.

2.1. Section efficace

En physique nucléaire, la section efficace correspond à la probabilité d'interaction d'une particule avec sa cible. Elle est rapportée à la surface apparente de la cible et s'exprime en barn, où $1 \text{ barn} = 10^{-24} \text{ cm}^2$, soit la section d'un noyau de taille moyenne.

Lors de l'irradiation d'une cible, la quantité de radionucléides produits est proportionnelle au nombre de noyaux cibles et à l'énergie du flux utilisé. Le coefficient de proportionnalité est appelé section efficace de production : pour chaque méthode de production, il existe donc un intervalle d'énergie où l'obtention du radionucléide désiré est optimale. En fonction de l'énergie des particules incidentes, plusieurs réactions nucléaires sont possibles, pouvant produire des radionucléides non voulus à l'origine d'une contamination du produit.

2.2. Production en réacteur

La production de radionucléides en réacteur se fait le plus souvent par l'intermédiaire de neutrons dits thermiques issus des réactions de fission nucléaire de l'uranium. Ces neutrons sont ralentis de façon à atteindre une énergie cinétique inférieure à 0,025 eV. La cible est alors constituée du même élément que le radionucléide produit. Pour le cuivre-64, on peut ainsi le produire par irradiation de ^{63}Cu par des neutrons thermiques suivant la réaction $^{63}\text{Cu}(n,\gamma)^{64}\text{Cu}$. Cependant, cette technique n'est pas applicable pour la production de radiopharmaceutiques car il est difficile de séparer le ^{64}Cu du ^{63}Cu de la cible, menant ainsi à un radionucléide de faible activité spécifique.

Afin d'améliorer ce paramètre, des techniques utilisant des cibles autres que le cuivre ont été développées. Les neutrons employés sont de plus forte énergie car non ralentis : on parle de réacteur à neutrons rapides. Pour produire du ^{64}Cu , ces neutrons rapides vont bombarder une cible de ^{64}Zn selon la réaction $^{64}\text{Zn}(n,p)^{64}\text{Cu}$. Cette méthode a permis pour la

première fois de fournir du ^{64}Cu compatible avec une utilisation médicale par le MURR (Missouri University Research Reactor) en 1994⁴⁶. Néanmoins, les faibles cadences de production, le manque d'accessibilité de ce type d'appareillage ainsi que le développement de techniques plus performantes ont rendu cette méthode de production très minoritaire.

2.3. Production en cyclotron

a. Utilisation de protons

Le cyclotron est un type d'accélérateur de particules qui utilise l'action combinée d'un champ magnétique et d'un champ électrique. Le champ magnétique courbe le cheminement des particules en une trajectoire circulaire et le courant électrique alternatif accélère les particules lorsqu'elles le traversent (**Figure 4**).

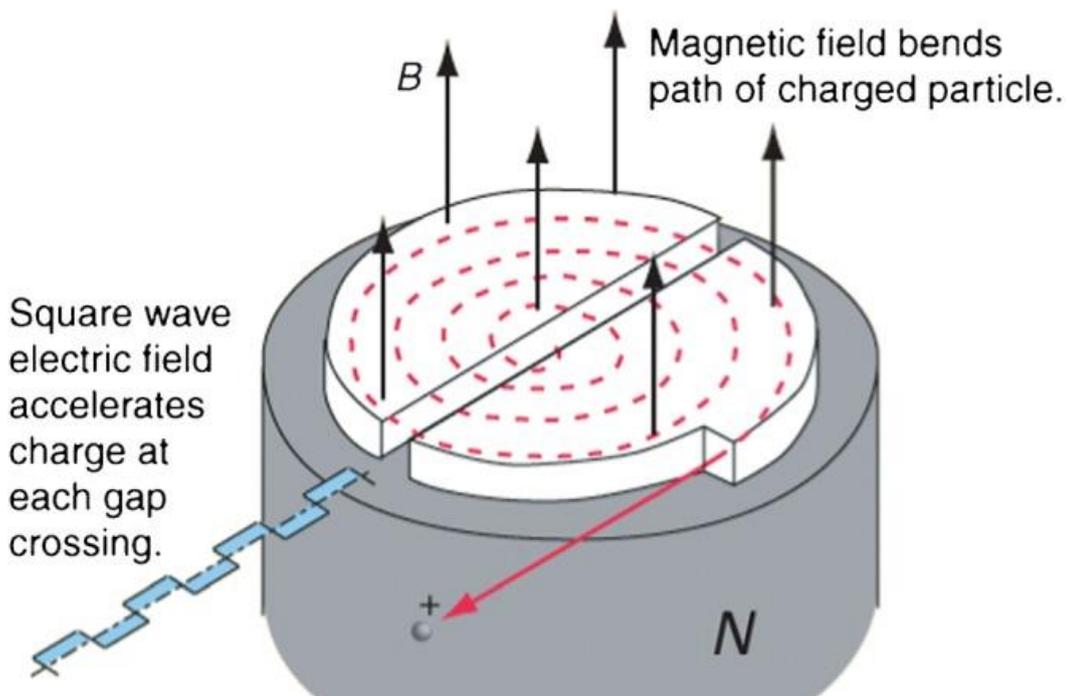


Figure 4 : Représentation simplifiée du trajet d'une particule au sein d'un cyclotron⁴⁷.

Initialement, le ^{64}Cu a été isolé comme sous-produit du gallium-67 *via* la réaction $^{68}\text{Zn}(p,2n)^{67}\text{Ga}$. Cette production permet l'obtention d'un cuivre de bonne activité molaire (environ 31,8 TBq/nmol) et en grande quantité⁴⁸. Néanmoins, elle n'est pas compatible avec

une production à la demande du ^{64}Cu , car le radionucléide majoritaire produit est le ^{67}Ga dont la longue demi-vie ($T_{1/2} = 72 \text{ h}$) est presque six fois supérieure à celle du ^{64}Cu .

Actuellement, la voie de production la plus courante est celle utilisant une cible de nickel *via* la réaction $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$. Le ^{64}Ni enrichi est électrodéposé sur un support inerte (le plus souvent en or) qui facilite le refroidissement de la cible après le tir et ne produit pas de radionucléides à période longue. Cette méthode a été mise au point sur cyclotron médical par Szelecsenyi *et al.* en 1993⁴⁹ et a été ensuite améliorée : elle permet à présent de produire de larges quantités de ^{64}Cu , pouvant aller jusqu'à 37 GBq⁵⁰. Elle nécessite l'accélération des protons à une énergie d'environ 20 MeV, ce qui est compatible avec les cyclotrons médicaux de moyenne énergie⁵¹.

b. Utilisation de deutons

Le ^{64}Cu utilisé pour cette étude a été produit par le cyclotron ARRONAX, localisé à Saint-Herblain⁵². Il s'agit d'un cyclotron de recherche, possédant un faisceau de protons à haute énergie (70 MeV). A cette énergie, la section efficace est trop basse pour l'obtention du ^{64}Cu avec une cible de ^{64}Ni . Plutôt que de ralentir le faisceau, une autre voie de production utilisant des deutons (noyaux du deutérium, composés d'un proton et d'un neutron) d'une énergie proche de 16 MeV, a été choisie (**Figure 5**).

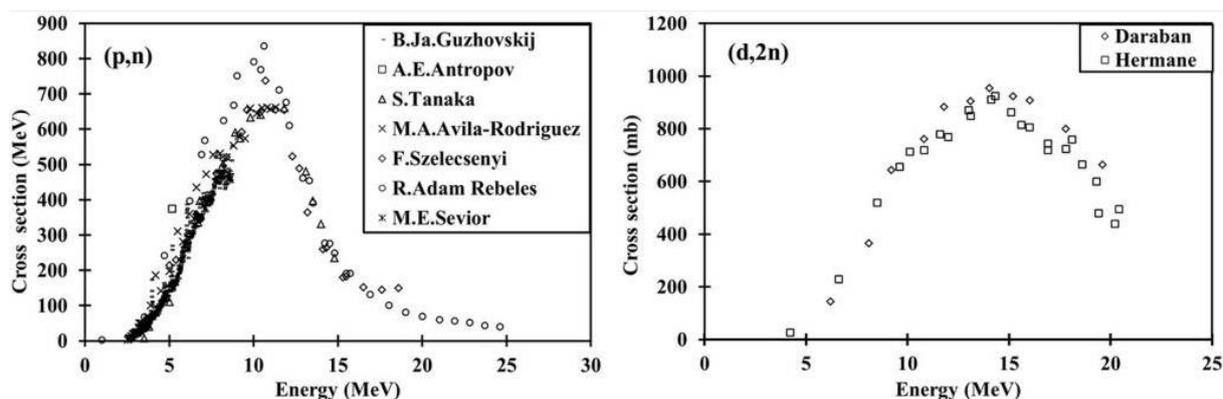


Figure 5 : Comparaison entre les sections efficaces de production du ^{64}Cu par la réaction $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ (à gauche) et par la réaction $^{64}\text{Ni}(d,2n)^{64}\text{Cu}$ (à droite)⁵³.

Elle permet l'obtention d'un rendement similaire à celui de la méthode utilisant des protons (206 MBq/ μ A/h) et a l'avantage de nécessiter une épaisseur de ^{64}Ni 25 % moindre⁵³. Outre l'aspect économique, diminuer la quantité de nickel utilisée pour la cible réduit également le risque de contamination du produit final par le nickel.

Le ^{64}Ni utilisé n'est présent qu'à hauteur de 0,0255 % dans le nickel naturel : la cible est donc constituée de nickel enrichi à 99,2 % de ^{64}Ni , électrodéposé sur un support en or (**Figure 6**). Afin de tirer parti au mieux de la section efficace, l'épaisseur des cibles est comprise entre 10 et 30 μm . Une irradiation moyenne dure environ 3 h, avec une intensité sur cible de 90 μA . Une fois la cible irradiée, elle est dissoute dans une solution de HCl concentré à 9 N. Afin d'éliminer les ions contaminants issus du processus de production (Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}), on procède à une purification sur résine échangeuse d'ions en utilisant une solution de HCl de moins en moins concentrée. Cette résine est constituée de macromolécules capables d'échanger de façon stœchiométrique et réversible les ions qu'elles contiennent avec les ions présents dans la solution avec laquelle elles sont en contact. Dans le cas de la purification de la solution de cuivre, le gradient HCl 9 N à 6 N permet la formation de chlorures des ions présents en solution, à l'exception du Ni^{2+} qui est éliminé par la résine. Le gradient HCl 6 N à 4 N permet la dissociation des chlorures de cobalt et ainsi l'élimination de ces ions. Enfin, la solution est ramenée à une concentration en HCl de 0,1 N qui sera celle utilisée pour les radiomarquages. Le cuivre-64 est présent dans le produit final sous la forme de chlorure de cuivre $^{64}\text{CuCl}_2$.



Figure 6 : Une cible de ^{64}Ni sur son support en or utilisée pour la production de ^{64}Cu .

3. Problématiques inhérentes à la production du cuivre-64

Afin de pouvoir prétendre à une application en imagerie, un paramètre crucial dans la production d'un radionucléide est l'activité spécifique ou activité molaire⁵⁴. Elle mesure la

radioactivité d'une substance par unité de masse et s'exprime en Bq/kg (activité spécifique) ou Bq/mol (activité molaire). Concrètement, elle va traduire la proportion du radionucléide d'intérêt par rapport aux contaminants présents dans la solution et pouvant se lier au vecteur lors du radiomarquage. Dans le cas du ^{64}Cu , il s'agit de l'activité par mole de cuivre total (^{64}Cu et cuivre non radioactif) ou de l'activité par mole de métaux totaux présents dans la solution. Ce sont des cations divalents comme le Zn^{2+} , le Ni^{2+} (produits par la désintégration du ^{64}Cu) et le Co^{2+} (produit lors de l'irradiation de la cible) ainsi que le fer sous forme Fe^{3+} (métal ubiquitaire de l'environnement). Ces ions possèdent des propriétés de complexation similaires à celles du cuivre et entrent en compétition pour la liaison au radiopharmaceutique *via* le ligand présent en son sein.

L'activité spécifique d'un radionucléide doit être la plus élevée possible ; une faible activité spécifique nécessite de marquer une quantité plus importante de vecteur afin d'obtenir des images de bonne qualité. Or, l'injection à un patient de grandes quantités de vecteur n'est pas souhaitable : les récepteurs de la cible risquent d'être saturés et donc de baisser la qualité de l'image ou d'induire un effet pharmacologique indésirable. De ce fait, la maîtrise du processus de production est indispensable afin de diminuer l'apport de contaminants dans la solution finale pouvant entraîner une baisse de l'activité spécifique. Parmi les paramètres à contrôler pour limiter la contamination métallique, on retrouve : la nature de la cible utilisée, les produits de la désintégration radioactive du ^{64}Cu ainsi que les produits de réactions nucléaires indésirables liées à la méthode de production et enfin le matériel et les locaux utilisés au cours de la production, de la purification et du contrôle du ^{64}Cu . La maîtrise de la contamination est particulièrement délicate dans le cas du ^{64}Cu , compte-tenu de l'omniprésence du cuivre dans l'environnement ainsi que d'autres métaux susceptibles d'interférer dans la réaction de marquage. Afin de la limiter, il est préférable d'utiliser des produits chimiques et de l'eau de qualité ultrapure. Les contenants doivent être en verre borosilicaté et préalablement lavés avec de l'acide chlorhydrique. Il faut également veiller à l'entretien et au nettoyage des enceintes blindées utilisées pour les manipulations car elles sont susceptibles d'apporter de la contamination métallique environnementale, principalement du Fe^{3+} . Après l'étape de purification, la quantité de métaux résiduels est mesurée et permet de déterminer la pureté chimique du produit et donc son activité spécifique.

Un autre paramètre important à contrôler est la pureté radionucléidique. Elle est définie comme le rapport de la radioactivité de l'isotope considéré sur la radioactivité totale

du produit final. Ces isotopes contaminants sont produits par des réactions concomitantes au moment de l'irradiation de la cible. Dans le cas de la production de ^{64}Cu utilisant des deutons, les principaux produits sont le ^{65}Ni ainsi que trois isotopes du cobalt (57, 58 et 61). La pureté radionucléidique est déterminée après purification par spectrométrie gamma.

4. Complexation du cuivre-64

4.1. Définition d'un ligand

En chimie, un ligand se définit de manière générale comme une molécule portant des fonctions chimiques donneuses d'électrons lui permettant de se lier à un ou plusieurs atomes ou ions centraux. L'association entre le ligand et son cation est appelée complexe de coordination. Le ligand peut être défini par sa denticité, soit le nombre d'atomes du complexe pouvant se lier à l'atome central : on retrouve donc des ligands monodentes (un seul atome liant) ou polydentes (plusieurs atomes liants).

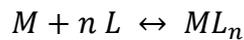
Dans le cadre de l'élaboration d'un radiopharmaceutique, on peut soit radiomarquer directement le vecteur biologique avec l'isotope, soit indirectement par le biais d'un ligand. Ce dernier sera alors qualifié de « bifonctionnel » car possédant deux rôles : le premier de former un complexe stable avec l'isotope métallique et le second de se lier au vecteur biologique par une liaison covalente⁵⁵. Le but du ligand sera de permettre un radiomarquage stable du vecteur, surtout en milieu biologique, sans en altérer les propriétés de fixation à sa cible.

4.2. Caractéristiques recherchées d'un ligand du cuivre

La sélection d'un ligand pour l'élaboration d'un radiopharmaceutique à base de ^{64}Cu repose sur l'évaluation d'un certain nombre de caractéristiques, qui influencent notamment la stabilité du complexe final. Celle-ci doit être la plus élevée possible, afin de limiter la dissociation *in vivo* du complexe et le relargage de ^{64}Cu libre dans l'organisme.

a. Stabilité thermodynamique

La formation d'un complexe ML_n entre un cation M et un nombre n de ligand(s) L peut se résumer selon la formule suivante :



Cette équation est caractérisée par une constante d'équilibre, appelée constante de stabilité β_n (souvent exprimée sous la forme $\log \beta_n$) :

$$\beta_n = \frac{[ML_n]}{[M] \times [L]^n}$$

β_n est dite thermodynamique, car ne dépendant que de la température et caractérisant l'équilibre du système. En effet, elle est liée à l'enthalpie libre (deuxième principe de la thermodynamique) qui s'exprime ainsi (avec R : constante des gaz parfaits et T : température en Kelvin) :

$$\Delta_r G_{(T)}^0 = R \times T \times \ln (\beta_n)$$

L'inverse de β_n peut également être utilisé : il est appelé constante globale de dissociation du complexe (K_d). En résumé, plus β_n est grande et plus K_d est petite, plus la réaction de formation du complexe est quantitative et plus sa dissociation complète est difficile. La stabilité thermodynamique correspond ainsi à la différence d'énergie libre entre les réactifs et le complexe. Cependant, cette constante à elle seule ne suffit pas pour définir la stabilité thermodynamique d'un complexe⁵⁶ : une même valeur de K_d peut correspondre à des vitesses d'échange différentes entre le complexe et les formes libres. Plusieurs facteurs peuvent intervenir dans les variations de K_d . Parmi eux l'effet chélate, d'origine entropique, qui est l'augmentation de la stabilité des complexes comportant un ligand polydente coordonné par rapport aux ligands monodentes. En ce qui concerne les ligands macrocycliques (composés d'au moins 7 atomes), il existe un « effet macrocycle » d'origine enthalpique signifiant que les complexes formés par les macrocycles sont plus stables que ceux formés par des molécules à chaîne ouverte. La taille et notamment le rapport entre les diamètres du cation et de la cavité du macrocycle influe également sur la stabilité du complexe formé.

b. Inertie cinétique

L'inertie cinétique est un des paramètres clés de la stabilité d'un complexe. Plus elle sera élevée pour un complexe donné, plus il faudra apporter d'énergie au système pour provoquer sa dissociation. Elle détermine donc la facilité avec laquelle le cation métallique se retrouvera sous forme libre.

Les vitesses d'association et de dissociation d'un complexe peuvent être mesurées par le suivi de la réaction en spectrométrie UV-visible. On peut ainsi déterminer la demi-vie du complexe dans un solvant donné.

c. Sélectivité du ligand pour le cuivre

De ce paramètre va dépendre le rendement du radiomarquage : en effet, les cations présents en solution peuvent être complexés à la place du cuivre. Comme vu précédemment, le processus de production est susceptible de générer des contaminants métalliques comme le Zn^{2+} , le Ni^{2+} , le Fe^{3+} ou le Co^{2+} . Le ligand doit être suffisamment sélectif pour chélater préférentiellement le Cu^{2+} : le complexe ligand-cuivre doit présenter une stabilité thermodynamique bien supérieure à celle de ce même ligand complexé avec un métal contaminant. La présence d'ions ou de ligands compétiteurs influence également la cinétique de la réaction de complexation d'intérêt. Il est possible d'évaluer ces variations par des expériences de compétition où on introduit volontairement des ions et/ou des ligands compétiteurs en plus ou moins large excès.

d. Cinétique de complexation

La cinétique de complexation est la vitesse nécessaire pour que la réaction entre le ligand et le métal atteigne l'état d'équilibre. Elle doit être rapide afin d'obtenir une activité spécifique optimale du radiopharmaceutique⁵⁷. Cette cinétique peut être augmentée en jouant sur deux paramètres. Premièrement, un pH plus élevé permet une cinétique plus rapide. En effet, en milieu acide les atomes de coordination du ligand se protonent, créant des charges positives repoussant celles du cation et rendant défavorable la réaction de complexation. Deuxièmement, il est possible d'accélérer la complexation en chauffant le milieu réactionnel.

Dans les deux cas, le pH et la température doivent prendre en compte la nature du vecteur, qui peut être sensible à des conditions réactionnelles trop sévères. Il faut également noter que certains cations peuvent former des hydroxydes peu ou pas solubles si le pH est trop élevé : c'est le cas du Ga^{3+} , qui s'hydrolyse dès que le $\text{pH} > 3$. Il est donc nécessaire de trouver le pH et la température optimaux permettant une stabilité de l'ion, l'intégrité du vecteur et une cinétique acceptable de complexation.

e. Résistance à la transchélation, à la réduction et à la transmétallation

Ces trois phénomènes vont influencer sur la stabilité *in vivo* des complexes de cuivre.

La transchélation correspond à un déplacement du cuivre de son complexe d'origine vers un ligand compétiteur, par exemple une molécule biologique. Dans le cas du ^{64}Cu , il s'agit d'une des problématiques majeures de la stabilité des radiomarquages. En effet, le cuivre est un oligoélément indispensable à la vie et il existe de nombreuses protéines capables de prendre en charge le cuivre, appelées cuproprotéines⁵⁸. Les plus répandues sont les protéines de transport sanguin (céruloplasmine⁵⁹) ainsi que les enzymes impliquées dans le métabolisme du cuivre au niveau cellulaire (métalloprotéines type superoxyde dismutase). Étant spécifiques du cuivre, elles sont particulièrement compétitrices et ce d'autant plus qu'elles sont fortement présentes dans l'organisme, notamment au niveau du foie. La résistance à la transchélation est déterminée par l'inertie cinétique du complexe et dans une moindre mesure par la stabilité thermodynamique.

Le $^{64}\text{Cu(II)}$ peut également être réduit en $^{64}\text{Cu(I)}$, conduisant à un relargage du cuivre, les ligands utilisés n'étant généralement pas adaptés à la complexation du cuivre sous forme Cu(I) ⁶⁰. Le potentiel d'oxydoréduction E^0 du couple $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ est de 0,159 V/ESH. Il existe beaucoup de couples enzymatiques capables d'effectuer cette réduction, car possédant un potentiel E^0 inférieur à celui du couple $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$. Cette propriété fait que le cuivre est physiologiquement impliqué dans de nombreux processus d'oxydoréduction dans l'organisme. Le complexe doit donc posséder un faible potentiel d'oxydoréduction afin de résister à l'action de ces enzymes.

La transmétallation est le remplacement au sein du ligand du métal chélaté par un autre. *In vivo*, la substitution du cuivre s'opère majoritairement par le Zn^{2+} , le zinc étant un oligoélément largement présent dans l'organisme. Cette dissociation est définitive, car une

fois remplacé le cuivre libre est pris en charge immédiatement par les cuproprotéines. Pour résister à la transmétallation, le complexe doit avoir une haute spécificité pour le cuivre ainsi qu'une grande inertie cinétique.

4.3. Fonctions de coordination

a. Généralités sur la fonctionnalisation des ligands

Outre son rôle de complexation du ^{64}Cu , le ligand « bifonctionnel » doit disposer d'une fonction chimique lui permettant de se lier de façon covalente au vecteur choisi⁶¹. Cette fonction doit posséder une bonne réactivité, c'est-à-dire être spécifique pour le groupement d'intérêt, et être stable en conditions physiologiques. Cette fonctionnalisation peut s'effectuer sur un atome coordonnant ou non coordonnant. L'introduction d'une fonctionnalisation peut diminuer la stabilité globale des complexes de cuivre, surtout si elle se fait sur un atome coordonnant. En conséquence, on préférera si possible une fonctionnalisation *via* un atome non coordonnant, ce qui impactera le moins les qualités de complexation du ligand. Cette dernière est cependant plus difficile à mettre au point lors de la synthèse organique du ligand.

b. Approches conventionnelles

Les principales fonctions discutées ici sont présentées dans la **Figure 7**.

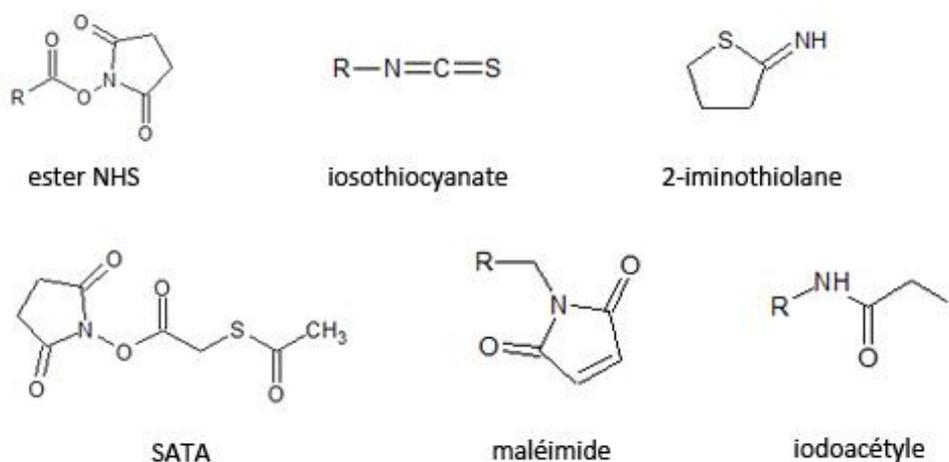


Figure 7 : Représentation schématique de quelques fonctions de couplage conventionnelles ; R représentant le ligand portant la fonction.

Actuellement, la voie la plus largement utilisée consiste à faire réagir la fonction de couplage au niveau des amines primaires (-NH₂), majoritairement situées sur les lysines. Dans le cas d'un AcM, elles sont particulièrement intéressantes car abondantes, faciles d'accès du fait de leur position à la surface de l'AcM et réparties sur l'ensemble de la structure. De nombreuses fonctions peuvent réagir sur les amines primaires, les plus utilisées étant les esters de *N*-hydroxysuccinimide⁶² (NHS, **Figure 8**) et les isothiocyanates⁶³ (NCS). Leur principal inconvénient est qu'il est impossible de contrôler sur quelle amine la fonction va réagir : une certaine proportion est susceptible de se coupler au niveau du site de reconnaissance de l'antigène. Cela limite le nombre de ligands que l'on peut fixer sur un AcM, au risque d'obtenir une perte trop importante de la réactivité immunologique.

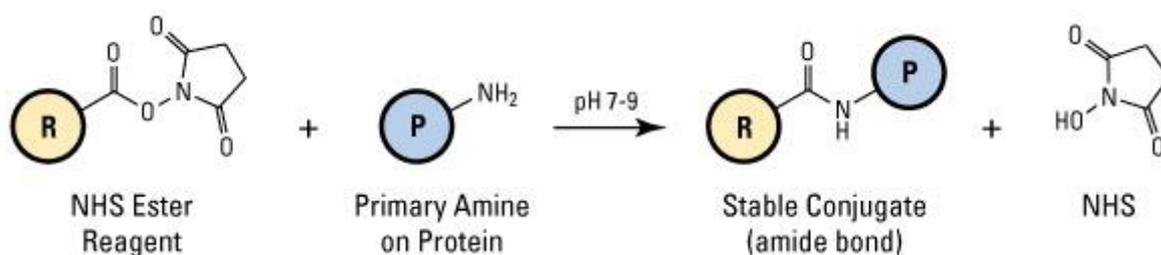


Figure 8 : Schéma de la réaction de conjugaison entre un ester NHS et une amine primaire ; R représente le ligand et P la protéine (type AcM) portant la fonction réactive.

Une autre approche concerne les sulfhydryles (-SH) ou thiols⁶⁴ (**Figure 9**). Présents au niveau des cystéines, ils se retrouvent souvent sous la forme de ponts disulfures (-S-S-), qui relient deux chaînes peptidiques et jouent un rôle prépondérant dans la structure tertiaire de la protéine. Il est possible soit de réduire les ponts disulfures pour générer des thiols capables de réagir avec des fonctions de couplage, soit d'introduire des thiols à l'aide d'un réactif capable de se lier aux amines primaires, comme le 2-iminothiolane ou le *N*-succinimide *S*-acétylthioacétate (SATA). Parmi les groupements susceptibles de réagir avec les thiols, on retrouve notamment les maléimides et les haloacétyles (iodoacétyle...). Ces fonctions de coordination vont réagir au niveau des thiols par alkylation ou par formation d'une liaison ou pont disulfure. Le couplage par les thiols a l'avantage de permettre de mieux contrôler le nombre de ligands fixés par vecteur, et ainsi de limiter le risque d'altérer les fonctions de reconnaissance de la cible. Néanmoins, la plus faible proportion de thiols nécessite

d'augmenter la quantité de ligands ou de réactifs intermédiaires utilisée afin d'obtenir un nombre suffisant de ligands couplés par vecteur.

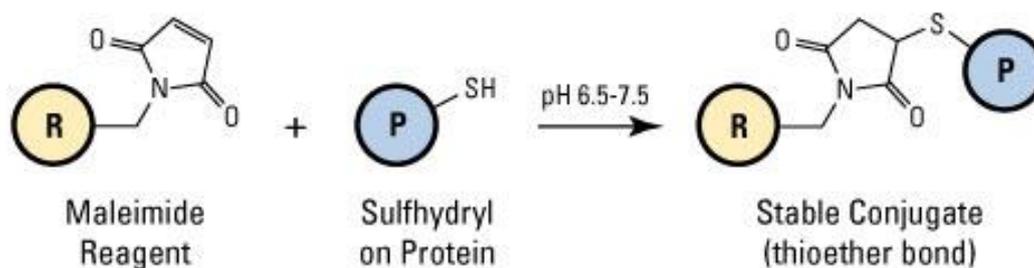


Figure 9 : Schéma de la réaction de conjugaison entre une fonction maléimide et un sulfhydryle. R représente le ligand et P la protéine (AcM) portant la fonction réactive.

c. Approche « chimie click »

Plus récemment, une approche de fonctionnalisation basée sur la « chimie click » a émergé : ces réactions dites biocompatibles sont par définition rapides, stéréospécifiques et conduisent au produit attendu avec un excellent rendement en conditions réactionnelles douces⁶⁵. Les réactions de chimie click mettent en jeu des fonctions chimiques que l'on ne retrouve pas en milieu biologique, ce qui permet un meilleur contrôle de la réaction de couplage, notamment quand elle se situe *in vivo*. Elles nécessitent une étape préalable de modification du vecteur pour introduire la fonction click permettant la réaction avec le ligand.

Dans le cadre des ligands du ⁶⁴Cu, on rencontre principalement deux voies de fonctionnalisation par chimie click (**Figure 10**). La première, appelée SPAAC (pour strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, soit la cycloaddition des azotures avec les alcynes facilitée par la contrainte cyclique), repose sur la réaction entre un alcyne tendu type cyclooctyne ou dibenzocyclooctyne (DBCO) et un azoture⁶⁶. Le DBCO a l'avantage d'être largement disponible sous forme commerciale, permettant de s'affranchir de sa synthèse complexe. Il est cependant relativement lipophile, ce qui peut être limitant pour certaines applications.

La deuxième voie possible est la cycloaddition retro-Diels-Alder, mettant en jeu une réaction entre une tétrazine et un alcène tendu⁶⁷. Sa cinétique très rapide est surtout mise à profit pour les techniques dites de pré-ciblage, c'est-à-dire une première injection du vecteur

modifié avec l'alcène tendu permettant l'accumulation au niveau de la cible, puis dans un deuxième temps l'injection du ligand radiomarqué.

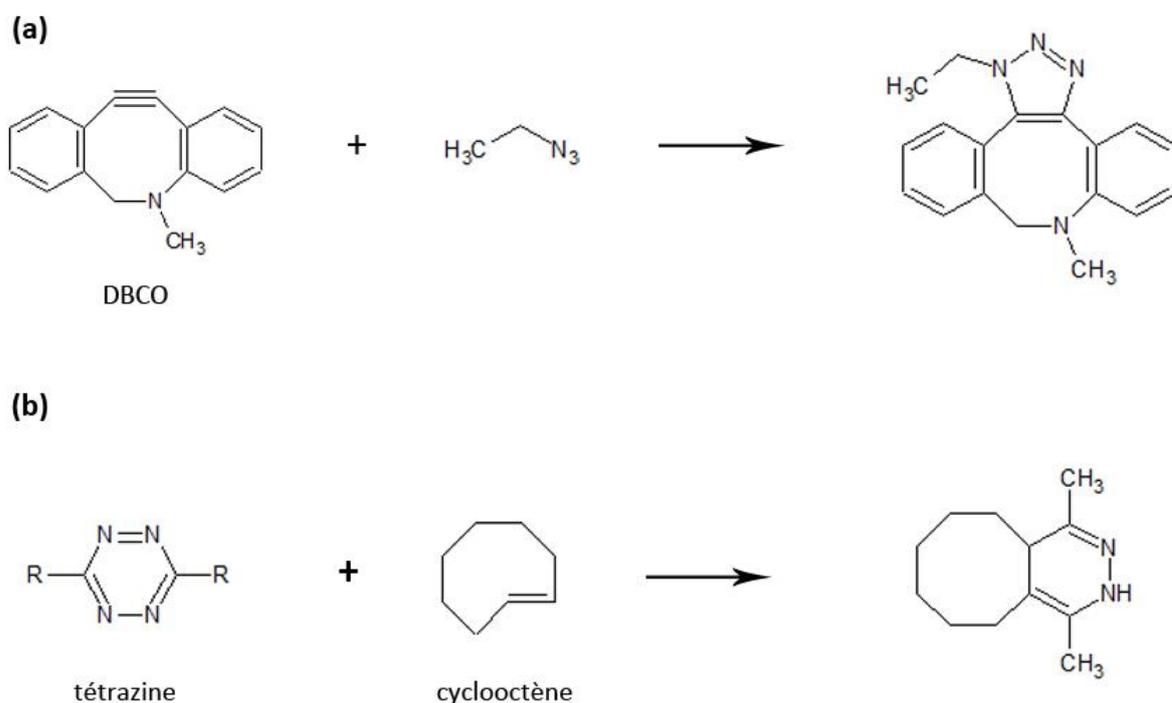


Figure 10 : Représentation schématique de la réaction SPAAC avec l'exemple du DBCO (a) et de la cycloaddition retro-Diels-Alder (b).

4.4. Ligands du cuivre

a. Ligands acycliques

Les premiers ligands à avoir été utilisés pour le cuivre sont des ligands acycliques polyaminocarboxylates^{68,69} (**Figure 11**) comme l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) ou l'acide diéthylène triamine pentaacétique (DTPA). Ces deux ligands forment des complexes disposant d'une bonne stabilité thermodynamique, mais démontrant une faible stabilité dans le sérum humain, probablement due à la réduction du Cu(II) en Cu(I) ou à des phénomènes de transchélation^{62,70}. D'autres ligands acycliques ont été développés pour essayer d'améliorer la stabilité des complexes de cuivre, comme les ligands à base de Schiff⁷¹ (par exemple le ligand SALEN) et les ligands diphosphine⁷², sans toutefois parvenir à des résultats acceptables pour une application en imagerie.

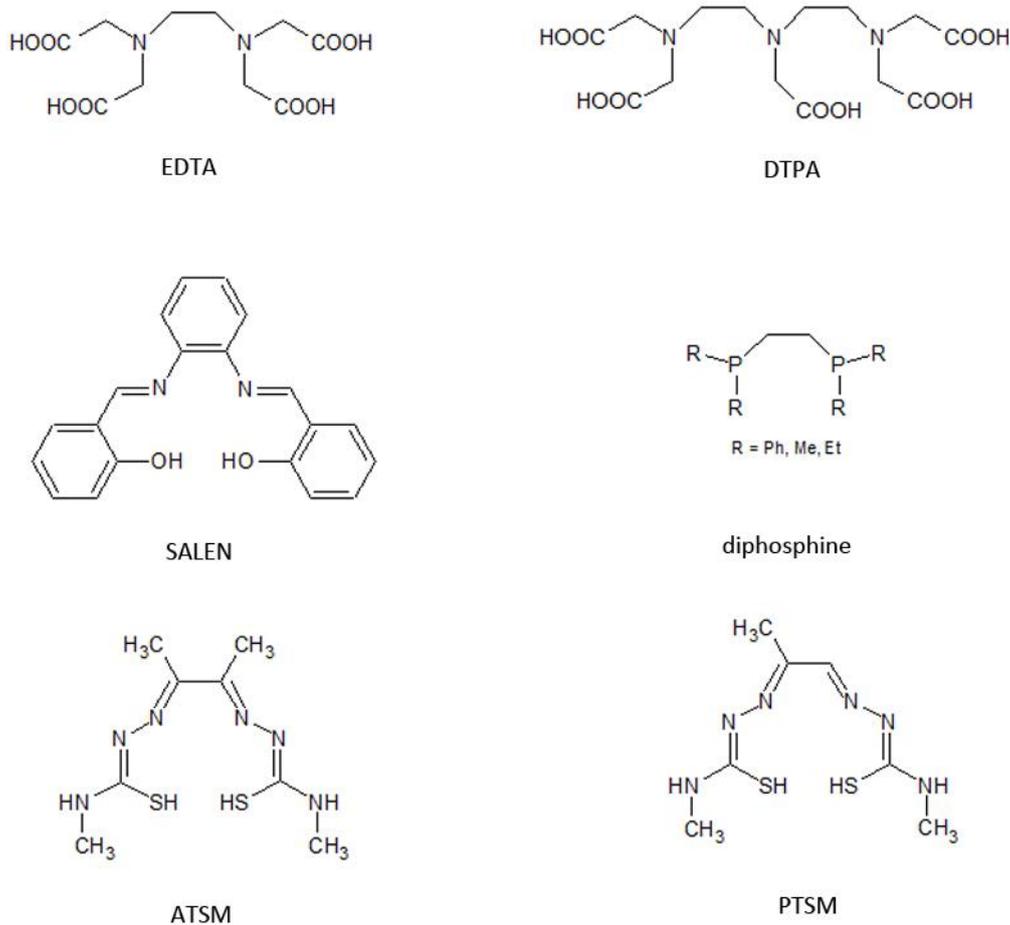


Figure 11 : Représentation schématique des ligands acycliques EDTA, DTPA, SALEN, diposphine, ATSM et PTSM.

Les thiosemicarbazones sont une classe de ligands acycliques comprenant l'ATSM⁷³ et le PTSM⁷⁴, utilisés respectivement comme marqueurs de l'hypoxie cellulaire et du flux sanguin. En oncologie, les tumeurs hypoxiques sont associées à une résistance à la chimiothérapie, et une détection précoce par des techniques non-invasives pourrait faciliter le pronostic et la prise en charge des patients^{75,76}. L'ATSM complexe le cuivre sous sa forme Cu^{2+} : la molécule obtenue est lipophile et traverse facilement les membranes cellulaires. Une fois internalisée, se produit une réduction du Cu^{2+} en Cu^+ conduisant à un complexe Cu(I)-ATSM instable. Dans une cellule normoxique, le Cu(I)-ATSM est à nouveau oxydé en Cu(II)-ATSM qui diffuse hors de la cellule. En revanche, en l'absence d'oxygène, le cuivre reste sous forme réduite et se dissocie du ligand ATSM, pour s'accumuler de façon irréversible à l'intérieur de la cellule⁷⁷.

b. Ligands à base cyclame et cyclène

Les cyclames et les cyclènes sont des tétraazamacrocyces, soit des macrocycles comportant quatre atomes d'azote et une ou plusieurs fonctions chimiques qui participent à stabiliser le complexe de cuivre (**Figure 12**). Le triazacyclononane quant à lui est un azamacrocycle ne comportant que trois azotes. Ces trois familles de macrocycles sont de loin les plus utilisées pour générer des ligands du cuivre à l'heure actuelle. Leurs complexes ont démontré une stabilité thermodynamique et une inertie cinétique supérieures à celles des ligands acycliques⁶⁰.

Trois ligands sont les « chefs de file » de cette classe : le DOTA, le TETA et le NOTA. Sous ses versions bifonctionnalisées, le DOTA a été largement utilisé pour le développement d'anticorps radiomarqués au ⁶⁴Cu en imagerie⁷⁸⁻⁸⁰ et est pour le moment le seul ligand du ⁶⁴Cu ayant été testé en clinique humaine⁸¹⁻⁸⁴. Pour cette raison, il constitue un ligand de référence pour évaluer la stabilité *in vivo* de nouveaux ligands du cuivre. Néanmoins, il présente plusieurs limites, dont une faible sélectivité pour le cuivre par rapport aux autres cations divalents. Le TETA et ses dérivés ont montré une stabilité améliorée par rapport au DOTA, mais conservent une faible résistance à la transchélation *in vivo*, notamment vers les protéines hépatiques⁵⁸. Enfin, le NOTA s'est avéré, lors d'études *in vivo*, plus stable cinétiquement que ses deux homologues^{85,86}.

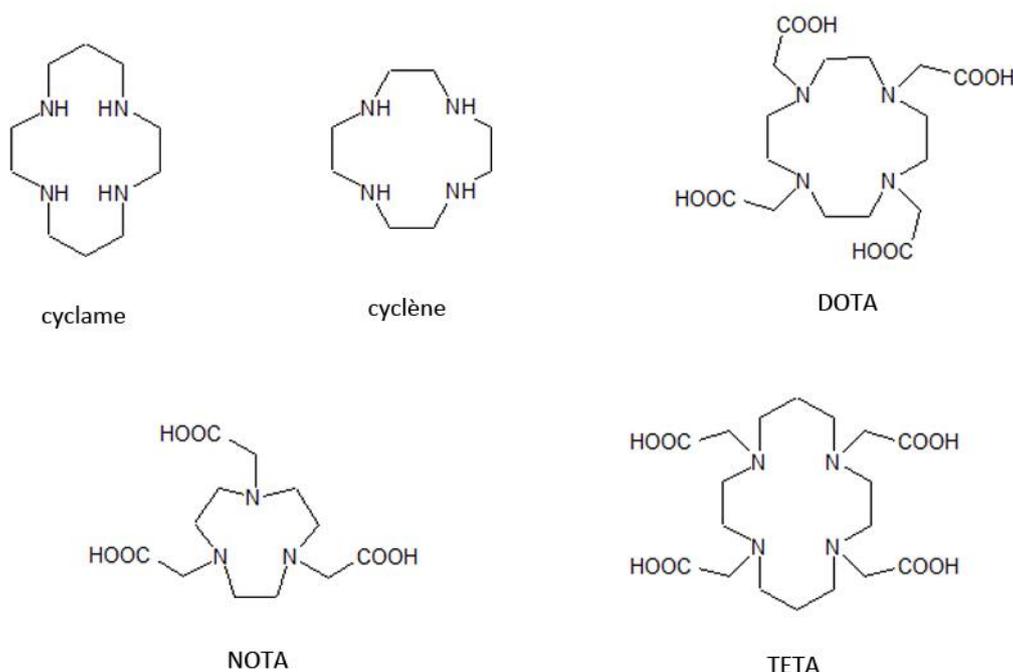


Figure 12 : Représentation schématique des bases cyclame et cyclènes, ainsi que des ligands DOTA, NOTA et TETA.

c. Ligands dérivés du triaminocyclohexane

Les ligands dérivés du triaminocyclohexane sont des ligands dits tripodaux (**Figure 13**) : ils comportent trois bras macrocycles pouvant être entre autres des fonctions anilines (dans le cas du ligand tachpyr)⁸⁷. Leur cinétique de complexation est rapide et leur stabilité *in vitro* dans le sérum humain a été démontrée. Ils n'existent pas encore sous forme fonctionnalisée, du fait des difficultés d'introduire une fonction de coordination sans nuire à la symétrie de la molécule et donc à ses capacités de complexation. De plus, leur stabilité *in vivo* est encore à étudier. En conséquence, leur possibilité d'application dans l'immuno-TEP pour le ⁶⁴Cu reste pour l'instant limitée⁸⁸.

d. Ligands type sarcophagine

Les sarcophagines sont des ligands macrocycliques type hexaamine dérivés du TETA, ayant une structure en forme de « cage » qui leur octroie une plus grande stabilité thermodynamique que les ligands tétraamine. Ils possèdent une bonne sélectivité pour le cuivre et leur cinétique de complexation est rapide à température ambiante⁸⁹. Cependant, peu d'études sur ces ligands ont été réalisées, principalement du fait de la difficulté de leur synthèse organique⁹⁰.

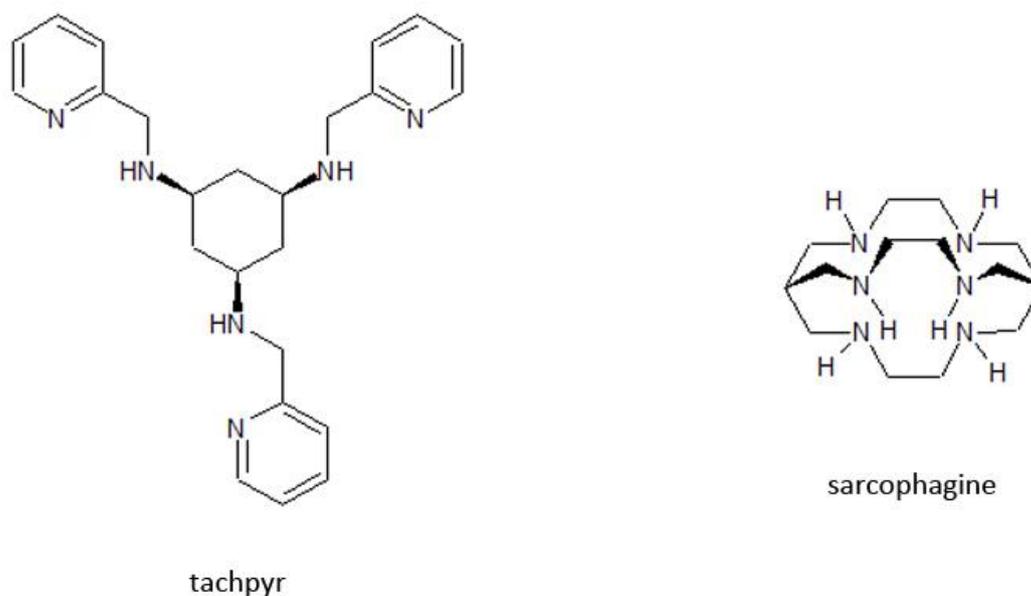


Figure 13 : Représentation schématique des ligands tachpyr et sarcophagine.

e. Ligands pontés du cyclame et du cyclène

Appelés macrobicycliques, les ligands dits *cross-bridge* (CB) présentent une fonction éthyle qui relie les amines N₁ et N₄ (**Figure 14**). Les deux principaux ligands de ce groupe sont le CB-DO2A (version pontée du DOTA) et le CB-TE2A (version pontée du TETA). Si leur stabilité thermodynamique mesurée *in vitro* est équivalente à celle de leurs versions non pontées (log K_d = 27,1 pour le Cu-CB-DO2A contre 27,2 pour le Cu-DOTA), leur inertie cinétique est excellente, notamment en milieu aqueux^{60,91,92}. La résistance à la réduction Cu(II)/Cu(I) du Cu-CB-TE2A a également été démontrée⁹³.

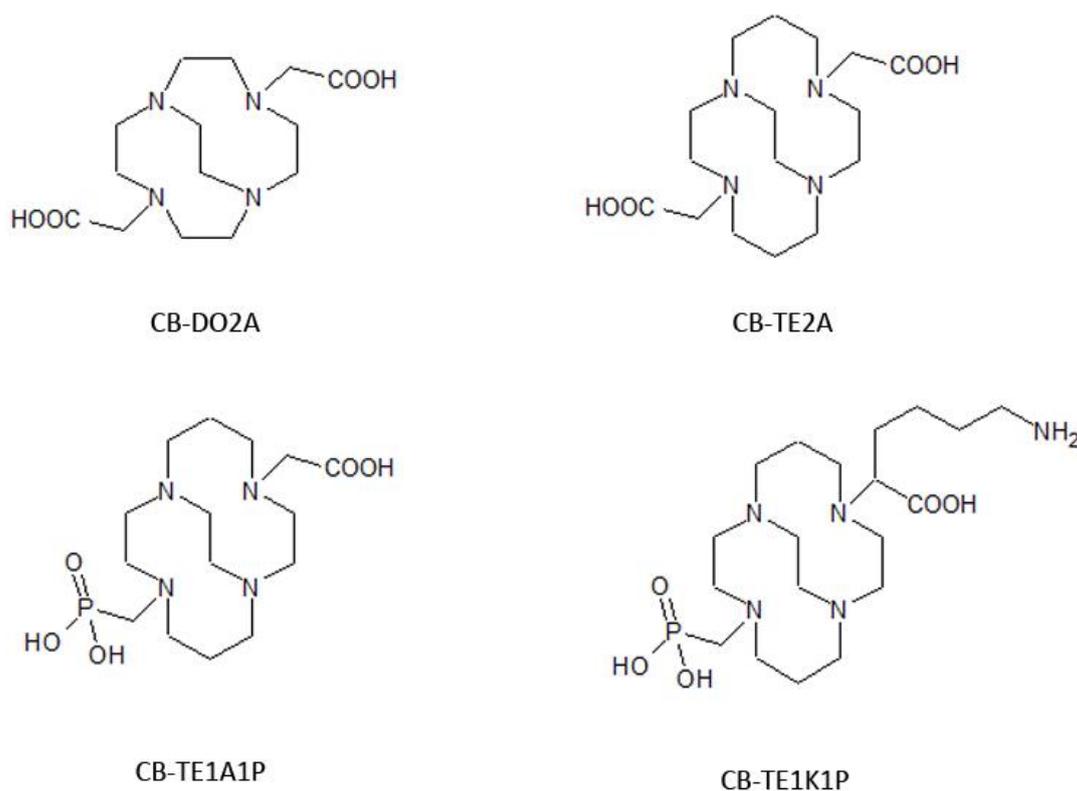


Figure 14 : Représentation schématique de ligands *cross-bridge*.

Les biodistributions réalisées avec ces ligands montrent une variabilité en fonction du ligand utilisé ; le CB-TE2A semble être le plus stable, avec la clairance globale la plus rapide⁹¹. De façon générale, les ligands CB s'avèrent être plus stables *in vivo* que leurs versions non pontées et résistent mieux à la transchélation⁹⁴. En revanche, du fait de leur rigidité, leur cinétique de marquage est considérablement diminuée et nécessite des conditions drastiques (1 h à 90°C pour le CB-TE2A) pour obtenir un rendement satisfaisant. Malgré ses indéniables qualités, l'utilisation *in vivo* du CB-TE2A est de ce fait restreinte car difficile à appliquer aux anticorps et autres protéines thermolabiles⁵⁷. Pour contourner ce problème, le CB-TE1A1P a

été synthétisé : il s'agit d'une version modifiée du CB-TE2A pouvant être radiomarqué à température ambiante⁹⁵. La conversion du carboxylate pour la fonction de coordination entraîne néanmoins une diminution de la stabilité des complexes de cuivre, notamment de leur résistance à la réduction.

Parmi les dernières avancées afin de conserver à la fois les qualités de stabilité du complexe CB-TE2A et la possibilité de radiomarquage rapide à température ambiante du CB-TE1A1P, on peut noter la synthèse du CB-TE1K1P⁹⁶. Ce ligand a été fonctionnalisé par le DBCO puis couplé au cétuximab (un antagoniste du récepteur du facteur de croissance épidermique) et a démontré un meilleur ratio tumeur-sur-organe que son homologue CB-TE1A1P.

5. Exemples d'applications en pré-clinique et en clinique

A l'heure actuelle, aucun radiopharmaceutique à base de ⁶⁴Cu n'a obtenu d'AMM. Le ⁶⁴CuCl₂ (Cuprymina) bénéficie d'une autorisation d'utilisation de l'European Medicines Agency, mais seulement comme précurseur. Néanmoins, le développement de ces médicaments en études cliniques et pré-cliniques reste en plein essor, notamment étant donné l'intérêt du ⁶⁴Cu dans le développement de la théranostique.

5.1. Anticorps monoclonaux et peptides

Trois AcM principaux de type IgG₁ marqués au ⁶⁴Cu sont en cours de développement pour des applications en oncologie.

Le trastuzumab est dirigé contre le HER2 et utilisé en thérapie ciblée pour les cancers mammaires exprimant ce récepteur (cf. I.4.1.). Plusieurs études cliniques ont démontré la possibilité d'utiliser le ⁶⁴Cu-DOTA-trastuzumab pour détecter les tumeurs HER2 positives, avec une bonne accumulation du radiopharmaceutique dans la tumeur dès 1 h post-injection et une sensibilité de 89 % deux jours post-injection⁹⁷⁻⁹⁹. De plus, une étude clinique a montré que le ⁶⁴Cu-DOTA-trastuzumab s'accumulait également au niveau des métastases cérébrales du cancer HER2 positif³¹, suggérant un passage du radiopharmaceutique à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE). Les AcM étant généralement trop hydrophiles ou trop volumineux pour traverser la BHE¹⁰⁰, il est possible que ce passage soit permis par une altération de cette barrière due à l'implantation et au développement tumoral. Des peptides

de type affibodies ciblant le HER2 peuvent être aussi utilisés¹⁰¹, comme par exemple le ⁶⁴Cu-DOTA-ZHER2:S1. Les affibodies ont l'avantage de permettre de différencier les tumeurs métastatiques possédant différents niveaux d'expression du HER2, facilitant ainsi le traitement par thérapie ciblée.

Le cétuximab est dirigé contre le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR). L'EGFR fait partie de la famille des récepteurs à la tyrosine kinase¹⁰² et sa dérégulation est impliquée dans plusieurs mécanismes d'oncogenèse, comme la croissance cellulaire tumorale, l'angiogenèse et le développement de métastases¹⁰³. Il est surexprimé dans de nombreuses tumeurs chez l'homme^{104,105} et le cétuximab est ainsi utilisé comme thérapie ciblée pour les cancers colorectaux métastatiques ainsi que dans les cancers épidermoïdes de la tête et du cou. En conséquence, le développement d'une version radiomarquée du cétuximab pour l'imagerie afin de sélectionner les patients éligibles à la thérapie est d'un intérêt certain. Des études pré-cliniques ont montré une excellente sensibilité du ⁶⁴Cu-DOTA-cétuximab pour les tumeurs EGFR positives¹⁰³⁻¹⁰⁵. Tout comme l'HER2, l'EGFR peut également être ciblé avec des fragments d'AcM¹⁰⁶ ou des peptides radiomarqués au ⁶⁴Cu. Moins immunogènes que les AcM, leur plus petite taille leur octroie une clairance sanguine plus rapide, avec comme principal inconvénient une tendance à s'accumuler au niveau du rein *via* des mécanismes de filtration/réabsorption. Plusieurs peptides ont été étudiés, dont le GE11¹⁰⁷ (prouvé non adapté car formant des agrégats) ainsi que le rEgA, un repebody (un peptide comportant des domaines répétés riches en leucine), qui s'est montré plus prometteur¹⁰⁸.

Tout comme le cétuximab et le trastuzumab, le daratumumab¹⁰⁹⁻¹¹¹ possède une AMM en temps qu'immunothérapie, dans le cadre du traitement du myélome multiple. Le daratumumab est un anti-CD38, un marqueur exprimé à la surface des cellules myélomateuses^{112,113} et qui est une cible de choix pour l'imagerie de cette pathologie. Le ⁶⁴Cu-DOTA-daratumumab a été comparé dans un modèle murin au ¹⁸F-FDG, qui est le radiopharmaceutique de référence pour la détection du myélome multiple, et a démontré une plus grande spécificité pour la cible ainsi qu'une meilleure qualité de l'image⁸¹.

5.2. Analogues des récepteurs à la somatostatine

La somatostatine¹¹⁴ est une hormone peptidique impliquée dans l'inhibition et la régulation de nombreuses autres hormones, notamment l'hormone de croissance. Les récepteurs à la somatostatine sont physiologiquement présents à la surface de nombreux

organes (système nerveux central, tractus gastro-intestinal...). Certaines tumeurs endocrines surexpriment les récepteurs à la somatostatine¹¹⁵, ce qui font de ces derniers une cible intéressante pour l'imagerie ainsi que pour la thérapie : en effet, la somatostatine et ses analogues suppriment le signal de transcription et inhibent la croissance cellulaire¹¹⁶. En conséquence, plusieurs analogues de synthèse de la somatostatine ont été étudiés, notamment l'octréotide ainsi que ses dérivés. L'octréotide marqué à l'indium-111 par le biais du DTPA a obtenu l'AMM pour l'imagerie de ces tumeurs endocrines par TEMP (Octreoscan). Ce peptide possède une plus longue demi-vie biologique que la somatostatine et inhibe le développement tumoral de façon plus prononcé¹¹⁷. L'Octreoscan est de moins en moins utilisé à l'heure actuelle, remplacé par la TEP au ⁶⁸Ga-DOTA-TOC, qui permet une meilleure détection des tumeurs¹¹⁸. Cependant, la faible demi-vie du gallium-68 (68 min) oblige à une acquisition rapide de l'image après injection. Dans ce contexte, des analogues de la somatostatine radiomarqués au ⁶⁴Cu permettraient de s'affranchir de cet inconvénient.

Une première étude sur un modèle de rats a démontré que le ⁶⁴Cu-TETA-D-Phe¹-octréotide avait une plus grande affinité pour la tumeur que le ¹¹¹In-DTPA-Phe¹-octréotide^{115,119}. Le ⁶⁴Cu-TETA-D-Phe¹-octréotide présente également une meilleure qualité d'image, partiellement due à la plus grande sensibilité de la TEP par rapport à la TEMP. Néanmoins, il a aussi montré une faible clairance sanguine ainsi qu'une dissociation rapide de la tumeur. Par conséquent, des modifications ont été apportées à l'octréotide afin de pallier ces inconvénients ; on retrouve ainsi notamment le Tyr³-octréotide (Y3-OC) et le Tyr³-octréotate (Y3-TATE). Ce dernier couplé au TETA et au CB-TE2A a démontré un excellent ciblage de la tumeur dans des modèles pré-cliniques^{120,121}.

Au niveau clinique, le ⁶⁴Cu-DOTA-TATE a démontré sa supériorité par rapport à l'Octreoscan pour la détection des tumeurs neuroendocrines¹²². Une étude menée sur 59 patients atteints de tumeurs endocrines a également montré que le ⁶⁴Cu-DOTA-TATE permettait de détecter un plus grand nombre de lésions par rapport au ⁶⁸Ga-DOTA-TOC⁸³.

5.3. Peptides ciblant les intégrines

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires régulant les interactions entre les cellules ainsi qu'avec la matrice extracellulaire. Elles jouent un rôle important dans l'angiogenèse et le développement métastatique tumoral¹²³. L'isoforme $\alpha_v\beta_3$ est surexprimée par les cellules impliquées activement dans l'angiogenèse par rapport aux cellules

endothéliales quiescentes, ce qui en fait un marqueur intéressant pour l'imagerie tumorale *via* l'angiogenèse spécifique^{124,125}. Ainsi, on retrouve une surexpression de $\alpha_v\beta_3$ dans les cellules tumorales de certains cancers comme le glioblastome, le cancer du sein, le cancer de la prostate ou le mélanome¹²⁶⁻¹²⁹. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ se lie à ses cibles extracellulaires par le biais d'une poche protéique reconnaissant la séquence arginine-glycine-acide aspartique¹³⁰ (RGD). Des dérivés de cette séquence ont donc été développés pour le radiomarquage au ^{64}Cu ^{78,131,132}.

5.4. PSMA

Le PSMA (prostate specific membran antigen) est surexprimé de façon spécifique dans les cellules du cancer de la prostate, particulièrement dans les formes avancées et métastatiques¹³³. Pour permettre l'imagerie de ce type de cancer, plusieurs peptides de synthèse ont été développés ; tous comportent une séquence permettant leur reconnaissance par l'enzyme folate hydroxylase du PSMA. Ils possèdent une haute affinité pour le récepteur du PSMA ainsi qu'une rapide clairance sanguine. Si le plus utilisé à l'heure actuelle est le ^{68}Ga -PSMA-11^{134,135}, il souffre des mêmes inconvénients inhérents à la faible demi-vie du gallium-68. En conséquence, d'autres analogues radiomarqués au ^{64}Cu ont été étudiés. Parmi eux, le PSMA-617, qui a été radiomarqué au ^{64}Cu mais également au ^{68}Ga et à l' ^{111}In ¹³⁶⁻¹³⁸. Un essai clinique du ^{64}Cu -PSMA-617 a montré une excellente détection des tumeurs prostatiques¹³⁹, avec une spécificité proche de 100 %. Outre cette application, le ^{64}Cu -PSMA-617 peut être utilisé dans l'imagerie d'autres tumeurs solides, comme le cancer de l'estomac et le cancer du côlon¹⁴⁰.

5.5. Chlorure de cuivre-64

Le ^{64}Cu libre, sous forme $^{64}\text{CuCl}_2$, s'est également révélé être un marqueur prometteur pour certaines tumeurs, telles celles du mélanome, du glioblastome et du cancer de la prostate¹⁴¹⁻¹⁴³. En effet, ces tumeurs présentent une surexpression de la protéine de transport du cuivre 1 (CRP1), sur laquelle va se fixer le ^{64}Cu ¹⁴⁴. Il a montré une meilleure détection des tumeurs du cancer de la prostate sur une étude clinique comparative entre le $^{64}\text{CuCl}_2$ et le ^{18}F -FDG¹⁴⁵. Une autre application intéressante concerne l'imagerie des tumeurs du système

nerveux central, où le $^{64}\text{CuCl}_2$ a montré des résultats comparables à ceux obtenus par une IRM cérébrale¹⁴².

III. UN MODELE POUR L'ETUDE DU MYELOME MULTIPLE : L'ANTICORPS 9E7.4

1. Le myélome multiple

1.1. Physiopathologie et épidémiologie

Le myélome multiple (MM) est un cancer hématologique caractérisé par une prolifération monoclonale d'une lignée de plasmocytes au niveau de la moelle osseuse¹⁴⁶. Tous les clones vont ainsi produire le même type de chaînes lourdes et/ou légères d'immunoglobulines (Ig). De plus, les cellules cancéreuses sécrètent un facteur d'activation des ostéoclastes (OAF) responsable d'une ostéolyse, d'une hypercalcémie et d'une fragilité osseuse. Comme elles engendrent des douleurs et des fractures spontanées, ces manifestations osseuses sont souvent à l'origine de la découverte de la pathologie chez un patient. L'hypersécrétion d'Ig monoclonales entraîne également des anomalies hématologiques. On retrouve ainsi une hyperprotidémie responsable d'une anémie et d'une augmentation de la vitesse de sédimentation, ainsi qu'une protéinurie conduisant irrémédiablement à une insuffisance rénale.

Environ 5 000 nouveaux cas de MM sont diagnostiqués par an, avec une légère prédominance chez l'homme. Il représente 1 % des cancers totaux et 10 à 12 % des hémopathies malignes. Il touche principalement les personnes âgées : l'âge médian au diagnostic est de 70 ans et son incidence augmente avec l'âge. Le MM est une maladie actuellement incurable et de mauvais pronostic, avec un taux de survie à 5 ans d'environ 40 %.

1.2. Classification et manifestations cliniques

Le MM se présente sous différentes formes cliniques en fonction du type de cellule touchée par la prolifération maligne :

- Le myélome à IgG (le plus fréquent) ou à IgA
- Le myélome à chaîne légère, de mauvais pronostic du fait d'une évolution rapide vers une insuffisance rénale chronique sévère.
- Le myélome non sécrétant.
- Le plasmocytome solitaire, résultant d'une prolifération plasmocytaire isolée sans envahissement médullaire et évoluant toujours vers le MM, généralement dans un délai de 3 à 5 ans.

- La leucémie à plasmocytes est une forme agressive à très mauvais pronostic, correspondant à l'acutisation qui est l'évolution finale du MM.

- D'autres formes moins fréquentes comme le myélome biclonal.

Le MM est précédé d'un état « prémyélomateux indolent » appelé gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS), ayant 1 % de chance par an d'évoluer en MM¹⁴⁷. Le MGUS correspond à un pic monoclonal sanguin isolé sans signes cliniques ou infiltration osseuse. Le caractère symptomatique du MM est défini par la présence d'un ou plusieurs signes cliniques ou atteinte d'organe, appelés critères CRAB¹⁴⁸ :

C : hyperCalcémie

R : insuffisance Rénale

A : Anémie

B : atteinte osseuse (*Bones* en anglais)

1.3. Diagnostic

Le diagnostic du MM repose sur un certain nombre d'anomalies présentes au bilan biologique ainsi que sur un bilan d'imagerie¹⁴⁹. Au niveau sanguin, on réalise un dosage total des protéines (mettant en évidence une hyperprotidémie) ainsi qu'une électrophorèse des protéines plasmatiques (EPP) où la présence d'un pic évoque une immunoglobine monoclonale. Le cas échéant, une immunofixation des protéines sériques permet de typer la protéine monoclonale. Au niveau urinaire, seules les chaînes lourdes type IgG ou IgA peuvent être détectées par bandelettes. Il faut procéder à une électrophorèse et une immunofixation sur les protéines urinaires pour détecter les chaînes légères sécrétées par certains MM, appelées protéinurie de Bence-Jones. On pratique également un myélogramme sur biopsie médullaire afin de quantifier l'infiltration plasmocytaire.

L'examen de référence en imagerie est la radiographie standard¹⁵⁰, qui permet d'évaluer l'étendue des lésions osseuses. Elles se présentent le plus souvent sous forme lacunaire (**Figure 15**), correspondant à une accumulation de plasmocytes dans une zone de lyse osseuse. La TDM offre une meilleure sensibilité et une plus grande résolution, elle est donc utile en complément du bilan radiographique pour les lésions de petite taille ou difficiles à explorer (sacrum, base du crâne...).



Figure 15 : Radiographie standard du crâne montrant de multiples lésions de type lacunaire à l'« emporte-pièces »¹⁵⁰.

L'IRM conventionnelle est utilisée pour évaluer l'infiltration médullaire tumorale¹⁵¹. La présence de lésions focales est un critère important de diagnostic, mais n'est en revanche pas une indication systématique à la chimiothérapie à l'inverse des lésions lytiques.

Il est intéressant de noter que la scintigraphie au ^{99m}Tc est d'intérêt limité, car contrairement à la majorité des lésions osseuses, celles du MM ne fixent pas directement le pyrophosphate de technétium. Il est possible de visualiser l'environnement tumoral car il existe un remaniement osseux autour des lésions¹⁵² : cependant, le manque de sensibilité et de spécificité par rapport à la TDM et l'IRM font que cette technique n'est pas recommandée pour le diagnostic et le suivi du MM.

L'International Myeloma Working Group définit deux critères diagnostiques du MM : une infiltration plasmocytaire supérieure ou égale à 10 % associée à un ou plusieurs signes CRAB ou à un ou plusieurs marqueurs de malignité¹⁴⁹. Ces derniers regroupent une plasmocytose médullaire monoclonale supérieure ou égale à 60 %, un rapport entre chaînes légères libres impliquées sur chaînes légères libres non impliquées de plus de 100 % ainsi qu'au moins une lésion focale visible à l'IRM.

1.4. Prise en charge thérapeutique

Le MM est à l'heure actuelle une maladie incurable. Les traitements visent à ralentir la progression de la maladie, à préserver les organes sensibles comme les reins et les os ainsi qu'à améliorer la qualité de vie du patient.

La chimiothérapie doit débiter dès le stade du MM symptomatique, c'est-à-dire lorsque l'on retrouve la présence d'un ou plusieurs critères CRAB (cf. III.1.2.). Plusieurs protocoles peuvent être utilisés, en fonction du contexte, des symptômes et de l'âge du patient ; les molécules les plus couramment retrouvées sont le melphalan, la cyclophosphamide, la dexaméthasone, la prednisone, la thalidomide, le lénalidomide et le bortezomib¹⁵³. A noter que la réalisation d'une autogreffe de cellules souches permet d'augmenter les doses de cytotoxiques administrées¹⁵⁴.

D'autres approches classiques peuvent être utilisées. La radiothérapie externe permet de cibler les tumeurs osseuses, notamment en cas de risque de complication (compression médullaire) ou de douleurs importantes. Enfin, la chirurgie d'exérèse peut être possible en fonction de la localisation des tumeurs.

1.5. Place de l'immuno-TEP dans la prise en charge du myélome multiple

La radiographie/TDM ainsi que l'IRM conventionnelle occupent toujours une place centrale dans l'établissement du diagnostic et du pronostic du MM, en permettant d'établir une imagerie morphologique avec une « carte » des différentes lésions en présence. Néanmoins, elles sont peu pertinentes pour le suivi de la maladie : les lésions lytiques vues aux rayons X persistent malgré la chimiothérapie et les lésions focales IRM s'atténuent de façon beaucoup plus tardive que la réponse biologique, entraînant un risque de faux positif¹⁵⁰.

L'imagerie fonctionnelle obtenue grâce à la TEP offre ainsi une approche intéressante. Le ¹⁸F-FDG permet d'évaluer l'activité métabolique des lésions en se fixant au niveau des plasmocytes¹⁵⁵ : en conséquence, seuls les MM actifs seront détectés par cette méthode. La TEP/CT au ¹⁸F-FDG est beaucoup plus sensible que la radiographie et offre des performances comparables à celles de l'IRM, voire meilleures pour dépister les lésions extramédullaires^{156,157,158}. Elle permet une évaluation plus précoce de la réponse au traitement et est particulièrement utile pour établir le pronostic de la maladie. Elle souffre néanmoins des problèmes inhérents à la technique, notamment son manque de spécificité et

la difficulté de visualiser les lésions au niveau crânien à cause de l'hyperfixation cérébrale du ^{18}F -FDG ainsi que les lésions quiescentes^{159,160}. De plus, son utilisation relativement récente entraîne un manque de standardisation de l'interprétation des images. Dans le cadre du MM, l'hétérogénéité tumorale caractéristique de la maladie rend les tumeurs difficiles à visualiser¹⁶¹. Ainsi, une étude a reporté que sur 227 patients présentant un MM symptomatique, l'examen TEP-CT était négatif pour 11 % d'entre eux. Ces patients présentaient une mutation conduisant à une faible expression de l'hexokinase 2 catalysant la glycolyse, entraînant une hypofixation du ^{18}F -FDG dans les cellules myélomateuses¹⁶². Pour toutes ces raisons, l'immuno-TEP s'inscrit parfaitement dans l'arsenal diagnostique du MM en complément des techniques actuellement utilisées.

Une des voies prometteuses pour l'immuno-TEP est celle ciblant le CXCR4 (C-X-C chemokine receptor 4), impliqué dans les processus de migration cellulaire ainsi que dans la prolifération cellulaire et l'angiogenèse des cellules hématopoïétiques au niveau de la moelle osseuse¹⁶³. Dans le cadre du MM, l'expression de CXCR4 est associée à la progression tumorale et donc à un mauvais pronostic. Ce récepteur est surexprimé à la surface des cellules myélomateuses pour les 2/3 des patients et constitue une cible de choix pour l'imagerie du MM. Dans le cadre d'une approche théranostique, il permettrait également le traitement des patients présentant des MM CXCR4 positifs. Le pentixafor, ciblant le CXCR4, a été évalué pour la TEP après radiomarquage au ^{68}Ga . Malgré des résultats préliminaires encourageants, l'inconvénient majeur de cette technique est la variabilité de l'expression du CXCR4, dépendante notamment de l'administration passée ou concomitante de chimiothérapie impactant le ciblage à la tumeur¹⁶⁴.

D'autres marqueurs ont été étudiés dans le cadre d'essais cliniques et pré-cliniques : le CD38^{81,111} et le CD138. Dans les deux cas, ils sont ciblés à l'aide d'un anticorps monoclonal. L'immuno-TEP peut donc bénéficier de ces AcM comme vecteurs et s'inscrire également dans une approche théranostique, notamment avec le couple $^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$.

2. L'anticorps monoclonal 9E7.4

2.1. Cible de l'anticorps

Le CD138, aussi appelé syndecan-1, est une protéine transmembranaire de type protéoglycane. Elle est principalement impliquée dans les mécanismes d'interactions entre

cellules ou entre la cellule et la matrice extracellulaire. Il s'agit d'un marqueur des plasmocytes sains ainsi que des cellules tumorales du MM¹⁶⁵. Ces dernières présentent une surexpression quasi-constante du CD138, qui semble impliqué dans divers mécanismes de l'oncogenèse telles la prolifération cellulaire et l'angiogenèse¹⁶⁶. En conséquent, des essais cliniques sont en cours pour des médicaments ciblant le CD138 afin de provoquer l'apoptose des cellules exprimant ce marqueur. L'indatuximab ravstansine (AcM anti-CD138 associé à une molécule anticancéreuse de la classe des poisons du fuseau) a ainsi montré son efficacité, notamment sur les MM récidivants ou réfractaires^{167,168}.

Le CD138 présente un intérêt comme cible de la TEP, car il permet d'imager toutes les cellules myélomateuses, y compris celles présentant une faible division cellulaire et qui échappent donc à la TEP par ¹⁸F-FDG. Des essais sur des modèles pré-cliniques ont montré son potentiel d'utilisation pour le diagnostic du MM^{33,169,170}. C'est donc un AcM anti-CD138 qui a été choisi pour le radiomarquage au ⁶⁴Cu dans les travaux expérimentaux qui sont présentés ici.

2.2. Production et propriétés

Le 9E7.4 est un anticorps monoclonal de type IgG_{2ax} produit au sein de l'équipe 13 du CRCINA¹⁷⁰. Il a été obtenu par immunisation de rats avec un peptide de 40 acides aminés dérivé du CD138 murin. Appelé peptide-2, il est synthétisé « à façon » et correspond aux acides aminés 90 à 130 du CD138 murin. Les rats injectés avec le peptide-2 vont produire des anticorps ciblés contre ce peptide, soit le 9E7.4. L'AcM ainsi obtenu a été caractérisé à l'aide d'un kit d'isotypage de rat.

Afin de s'assurer de la capacité du 9E7.4 à reconnaître sa cible, son affinité a été évaluée par cytométrie en flux sur deux lignées cellulaires exprimant le CD138 murin. Le 9E7.4 a montré une affinité pour sa cible équivalente à celle d'un AcM anti-CD138 commercial, testé dans les mêmes conditions. Une technique simple a été aussi mise au point afin d'évaluer l'immunoréactivité du 9E7.4. Le peptide-2 peut être greffé sur un support solide, par exemple des billes magnétiques coatées par des fonctions NHS. L'AcM est radiomarké puis mis en contact avec les billes. Il est ainsi possible de mesurer la fraction d'AcM capable de reconnaître le peptide-2 et ainsi de se fixer sur le support solide.

3. Radiomarquage de l'anticorps 9E7.4

3.1. Principes généraux

Comme vu en II.4.1., le ^{64}Cu nécessite un ligand bifonctionnel pour se lier de façon stable à l'AcM. Il s'agit d'un radiomarquage dit indirect, à la différence d'un radiomarquage direct où l'isotope se fixe directement sur la molécule vectrice. La préparation d'un radioimmunoconjugué se fait donc en deux étapes. Le couplage consiste en la modification de l'AcM par le ligand bifonctionnel, permettant d'obtenir un immunoconjugué. Le marquage consiste en l'association entre la molécule d'intérêt et le radionucléide : ici, il s'agit de la réaction de complexation du ^{64}Cu par le macrocycle du ligand.

Deux approches sont alors possibles. La première est le marquage « pré-couplage », qui consiste d'abord dans le marquage du ligand, puis du couplage entre le ligand et l'AcM. Cette approche a l'avantage de permettre des conditions réactionnelles plus dures pour le radiomarquage (haute température...) sans risque d'abîmer le vecteur biologique. Néanmoins, si elle est viable en recherche, elle n'est pas transposable pour une utilisation clinique en routine, car trop longue et complexe. Dans ce cas, il est préférable d'utiliser la deuxième approche, où le radiomarquage intervient sur l'AcM après son couplage au ligand. L'immunoconjugué ainsi obtenu peut être produit et contrôlé en amont et être conservé jusqu'au radiomarquage. C'est le principe des « troussees froides » couramment utilisées en médecine nucléaire. Dans le cas de l'anticorps 9E7.4, c'est cette deuxième approche qui a été choisie.

Au cours de ce mémoire, différents ligands ont été couplés au 9E7.4 à but comparatif. L'AcM 9E7.4 est un modèle aux propriétés connues, aisément disponible au sein du laboratoire et possédant un potentiel d'application en clinique. De plus, un modèle murin de MM est disponible, facilitant le passage de *in vitro* à *in vivo*.

Des radiomarquages tests ont permis d'évaluer différentes propriétés des radioimmunoconjugés ainsi obtenus :

- Le nombre de ligands couplés par anticorps, nécessaire pour obtenir une activité spécifique suffisante.
- Le rendement de radiomarquage.

- L'immunoréactivité, soit la fraction de l'anticorps capable de reconnaître sa cible après couplage et radiomarquage.

- L'activité spécifique.

3.2. Ligands utilisés

a. Ligands commerciaux

Plusieurs ligands commerciaux de type azamacrocycle ont été utilisés dans ce mémoire (**Figure 16**) : le DOTA, qui possède un cycle de type cyclène (4 atomes d'azote), le NOTA et le NODA-GA qui sont à base TACN (triazacyclononane, 3 atomes d'azote). Dans ces cycles, les atomes d'azote sont reliés par 2 atomes de carbone. Deux fonctions de couplage sont disponibles avec ces ligands : les esters de NHS (NHS-DOTA, NHS-NODA-GA) et les dérivés NCS (NCS-NOTA, NCS-DOTA).

b. Le ligand TE1PA, un ligand original de type cyclame

Les ligands commerciaux précédemment cités ont été évalués par comparaison avec un ligand à base cyclame (4 azotes reliés par 2 ou 3 carbones, en alternance), le TE1PA. C'est un ligand spécifique du cuivre développé par l'équipe CNRS 6521 de Brest^{171,172}. Ce travail intervient dans le cadre d'une collaboration avec cette équipe, afin d'évaluer les propriétés du TE1PA et de le comparer aux autres ligands disponibles dans le commerce. Le TE1PA est présent sous deux formes : une non-fonctionnalisée et une C-fonctionnalisée, le NCS-TE1PA.

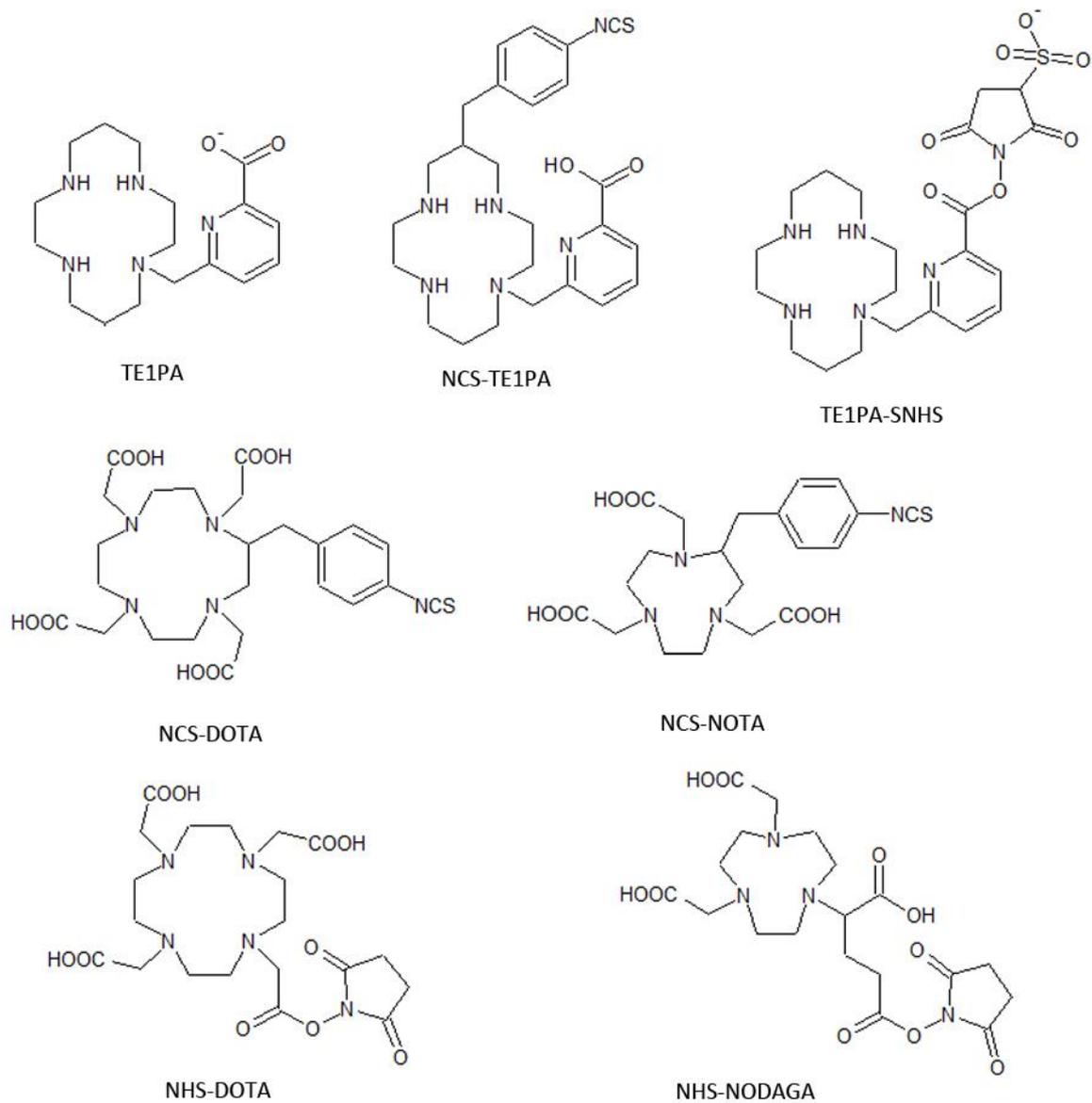


Figure 16 : Représentation schématique des ligands utilisés dans cette étude.

IV. PARTIE EXPERIMENTALE

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel

L'acétate de sodium, le phosphate de sodium (qualité TraceSelect), le citrate de sodium et l'acide chlorhydrique ont été obtenus chez VWR. La BSA (bovine serum albumine), l'EDC (*N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide hydrochloride), le NHS (*N*-hydroxysulfosuccinimide), le MES (2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid) ainsi que l'EDTA ont été achetés auprès de Sigma. L'eau utilisée a été produite à l'aide d'un système de filtration Gradient Milli-Q de chez Millipore, avec une résistivité de 18,2 MΩ.cm (correspondant à un taux résiduel de métaux de 3 ppb).

L'anticorps 9E7.4 a été produit au sein du laboratoire¹⁷⁰ (cf. III. 2.). Les ligands bifonctionnels NHS-DOTA, NCS-DOTA et NCS-NOTA ont été achetés auprès de Macrocyclics. Le NHS-NODA-GA a été obtenu chez CheMatech. Les ligands TE1PA et NCS-TE1PA ont été synthétisés et gracieusement fournis par l'équipe CNRS 6521¹⁷¹.

Le système UPLC Acquity utilisé pour les contrôles comportait une colonne Protein BEH SEC (Waters). L'élution isocratique a été réalisée avec un tampon phosphate 0,1 M (pH 7,2) à un débit de 0,4 mL/min, pendant 10 min avec une détection UV à 280 nm. L'analyse a été effectuée à l'aide du système Empowers Pro 1154.

Le ⁶⁴Cu a été obtenu sous forme de chlorure de ⁶⁴Cu en solution dans du HCl 0,1 M. Il a été produit par le cyclotron ARRONAX localisé à Saint-Herblain⁵². La pureté radionucléidique a été déterminée par spectrométrie gamma à l'aide d'un détecteur HPGe DSPEC-JR-2.0 type 98-24B de chez Ametek et la pureté radiochimique par ICP-OES avec un détecteur iCAP 6500 Duo (Thermo Fischer Scientific).

1.2. Couplage

a. Préparation de l'AcM

L'AcM 9E7.4 est conservé à 4°C dans du PBS (phosphate buffer saline) 0,01 M à une concentration de 2,2 mg/mL. Afin de complexer les métaux résiduels présents dans la solution d'AcM et non sous forme de phosphates, on ajoute 10 % (vol/vol) d'EDTA (10 mM ; pH 4,5) de façon à obtenir une concentration finale en EDTA de 1 mM. Après une incubation de 2 h à

25°C, les complexes métalliques d'EDTA sont éliminés par ultrafiltration sur une membrane Amicon Ultra-15 30 K (Millipore) par 3 cycles de centrifugation à 2000 g (centrifuge 2-16KP, Sigma) en utilisant un tampon carbonate 0,3 M (pH 8,6). La concentration de la solution est ensuite ajustée entre 2 et 4 mg/mL. Le volume exact est déterminé par pesée et la concentration par spectrométrie d'absorption UV-visible en utilisant un NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific). La pureté de l'AcM est vérifiée à l'aide du système UPLC décrit précédemment et montre un seul pic au temps de rétention $t_r = 2,94$ min (**Figure 17**).

b. NHS-DOTA, NCS-DOTA, NCS-NOTA, NHS-NODA-GA et NCS-TE1PA

La méthode de couplage est la même pour tous les ligands fonctionnalisés. Ils sont dissous dans du HCl 0,1 M puis ajoutés à la solution d'AcM de façon à obtenir un ratio de 20 équivalents molaire de ligands pour 1 équivalent molaire d'AcM. La solution est ensuite incubée pendant 12 h à 25°C sous agitation.

c. TE1PA non fonctionnalisé

Le TE1PA nécessite une étape préalable d'activation au niveau du groupement carboxylate de la fonction picolinate¹⁷³. Le TE1PA, l'EDC et le SNHS sont dissous dans un tampon MES 50 mM (pH 5). L'EDC et le SNHS sont ajoutés à la solution de TE1PA de façon à obtenir un ratio molaire de 1:1:1. La solution est incubée sous agitation à 4°C pendant 30 min. Le TE1PA activé est ensuite ajouté à la solution d'AcM en suivant un ratio de 500 équivalents molaires de ligands pour 1 équivalent molaire d'AcM. La solution est incubée pendant 12 h à 4°C.

1.3. Purification

L'étape de purification permet d'enlever les ligands en excès qui n'ont pas été couplés à l'AcM. Pour ce faire, on utilise une méthode de perméation sur gel Sepharose à l'aide d'une colonne PD-10 (GE Healthcare). La colonne PD-10 est préalablement saturée avec une solution de PBS/BSA 0,5 % afin de bloquer les sites potentiels de fixation de l'AcM, puis conditionnée dans le tampon d'élution (phosphate de sodium 0,1 M, pH 7). Après dépôt de la solution à purifier, la colonne est éluée avec 10 fractions de 500 μ L de tampon phosphate de sodium

0,1 M. Dans ces conditions, l'AcM est élué dans un volume de rétention d'entre 2,5 et 4 mL, alors que les ligands, d'un poids moléculaire inférieur à 10 kDa, sont élués dans un volume de rétention d'entre 5 et 7 mL.

Les fractions d'éluion contenant l'AcM sont ensuite réunies puis concentrées par ultrafiltration de façon à obtenir une concentration d'environ 2 à 4 mg/mL. Le volume exact de la solution finale a été déterminé par pesée et la concentration par spectrométrie d'absorption UV-visible. Les AcM modifiés ont été contrôlés par UPLC, afin de s'assurer de leur pureté et de l'absence d'agrégats.

1.4. Caractérisation des immunoconjugués

a. Détermination du nombre de ligands couplés par AcM et pureté radiochimique

Le $^{64}\text{CuCl}_2$ est en solution dans de l'HCl 0,1 M. Afin d'obtenir le pH nécessaire pour permettre la réaction de radiomarquage, la solution est tamponnée à pH 5,5 par un tampon acétate de sodium 2,5 M. Le $^{64}\text{CuCl}_2$ est ajouté à différents ratio (1, 3 et 5 équivalents molaires) afin de réaliser une gamme : elle servira ensuite à évaluer le nombre de ligands par AcM. Les solutions sont mises à incuber à 40°C pendant 30 min. On ajoute ensuite une quantité d'EDTA 1 mM (pH 6) de façon à obtenir un ratio molaire 10:1 par rapport à l'anticorps, avant d'incuber 5 min à 25°C sous agitation. Cela permet de complexer le $^{64}\text{CuCl}_2$ libre restant.

Le radiomarquage est contrôlé par CCM sur un support en silice de type iTLC-SG (Agilent Technologies) avec comme phase mobile un tampon citrate de sodium 0,1 M (pH 4,5). Après migration, les CCM sont mises 5 min à exposer sur des plaques au phosphore photostimulables, qui sont ensuite révélées par un imageur radiométrique type Cyclone Plus (Perkin Elmer). Le logiciel d'analyse Optiquant permet alors d'obtenir des radiochromatogrammes. Dans ces conditions, l'AcM radiomarqué reste au niveau du point de dépôt (Rf. 0) alors que les complexes ^{64}Cu -EDTA migrent au niveau du front de solvant (Rf. 1). La pureté radiochimique, correspondant au rendement de radiomarquage, peut ainsi être déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Rendement de marquage} = \frac{\text{Radioactivité en Rf. 1}}{\text{Radioactivité totale (Rf. 0 et Rf. 1)}}$$

b. Purification des radioimmunoconjugués

La purification permet d'éliminer le ^{64}Cu libre en excès présent dans la solution de radiomarquage. On utilise la même technique de filtration sur gel avec colonne PD-10 que lors de la purification des immunoconjugués (cf. IV.1.3.). La solution de marquage est déposée sur la colonne puis celle-ci est éluée 10 fois avec 500 μL de tampon phosphate de sodium 0,1 M (pH 7). Dans ces conditions, l'anticorps radiomarqué est élué dans un volume de rétention de 2,5 à 4 mL, alors que le ^{64}Cu libre reste à l'intérieur de la colonne. Les fractions contenant le radioimmunoconjugué sont ensuite réunies et le rendement de radiomarquage après purification est contrôlé par CCM.

c. Evaluation de l'immunoréactivité

L'immunoréactivité permet d'évaluer si la capacité de l'AcM à reconnaître sa cible a été ou non altérée par le couplage et le marquage. On utilise des billes magnétiques coatées avec une fonction NHS (Thermo Fisher Scientific) et préalablement couplées au peptide-2 (reconnu par l'AcM 9E7.4) suivant le protocole fourni par Thermo Fisher Scientific. La concentration finale des billes couplées en suspension était de 10 mg/mL dans du PBS.

10 μL de la suspension de billes (soit 0,2 mg) ont été ajoutés à 1 pmol de la solution purifiée de radioimmunoconjugués. La solution a été complétée à 150 μL avec du PBS/BSA 0,5 % puis incubée pendant 1 h à 35°C. Le surnageant (contenant l'AcM n'ayant pas réagi) a été séparé des billes (sur lesquelles est fixée l'AcM ayant conservé ses propriétés) en utilisant un portoir magnétique MagRack (GE Healthcare). La radioactivité présente dans les deux fractions (surnageant et billes) a ensuite été mesurée à l'aide d'un compteur gamma Wallac 1480-Wizard (Perkin Elmer). L'immunoréactivité a été obtenue par calcul du pourcentage de l'activité de la fraction billes par rapport à l'activité totale (billes et surnageant).

2. Résultats

2.1. Contrôle du pourcentage d'agrégats d'AcM après couplage

Le pourcentage d'agrégats d'AcM après couplage avec le ligand a été évalué par UPLC. Les chromatogrammes UV obtenus pour chaque immunoconjugué sont regroupés dans la **Figure 17**, avec comme référence l'AcM non modifié dans les mêmes conditions

chromatographiques. Ils ont ensuite permis d'obtenir les pourcentages d'agrégats, visibles dans le **Tableau 2**.

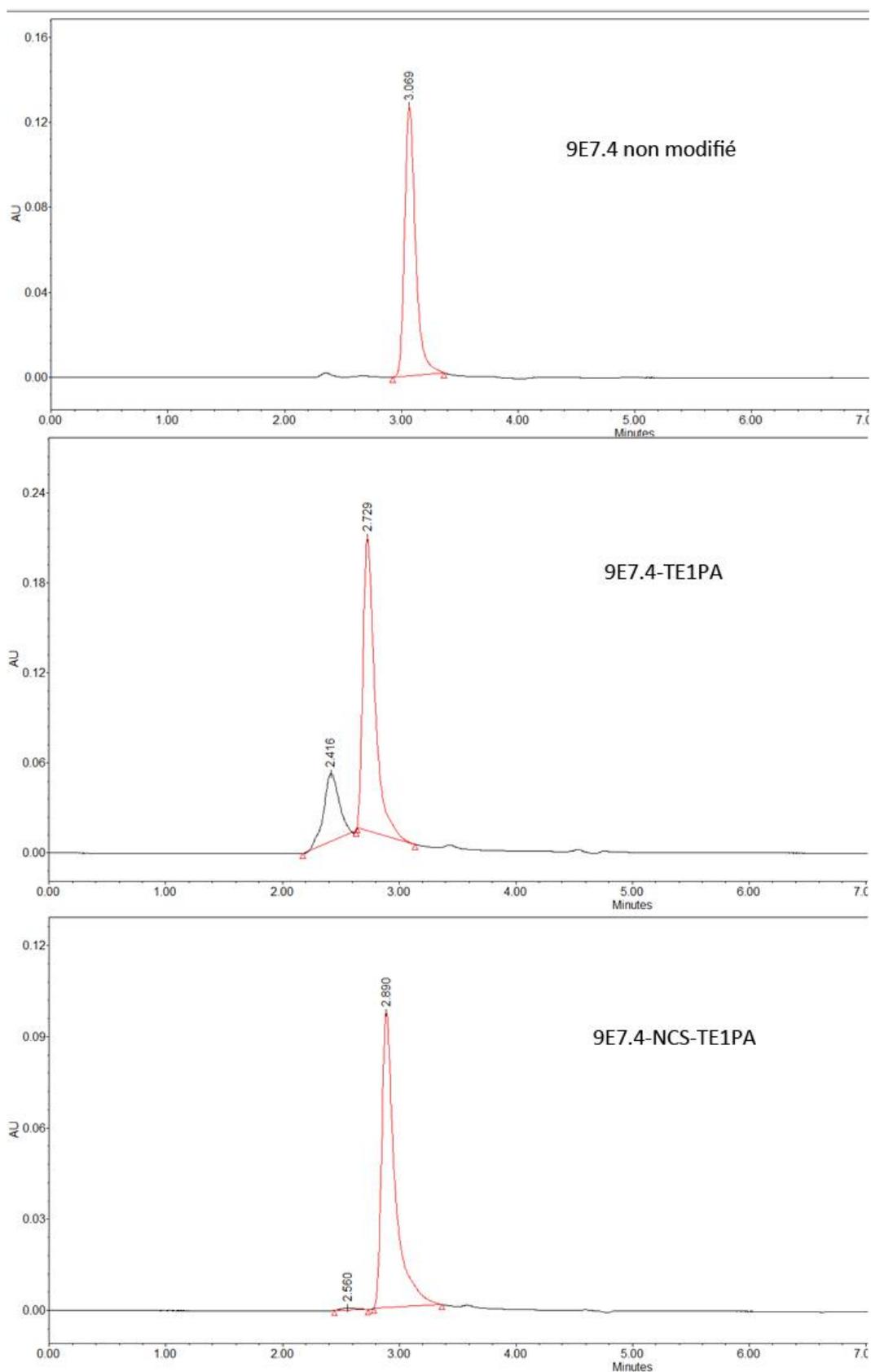


Figure 17a : Chromatogrammes UV obtenus pour l'AcM 9E7.4 non modifié, le 9E7.4-TE1PA et le 9E7.4-NCS-TE1PA.

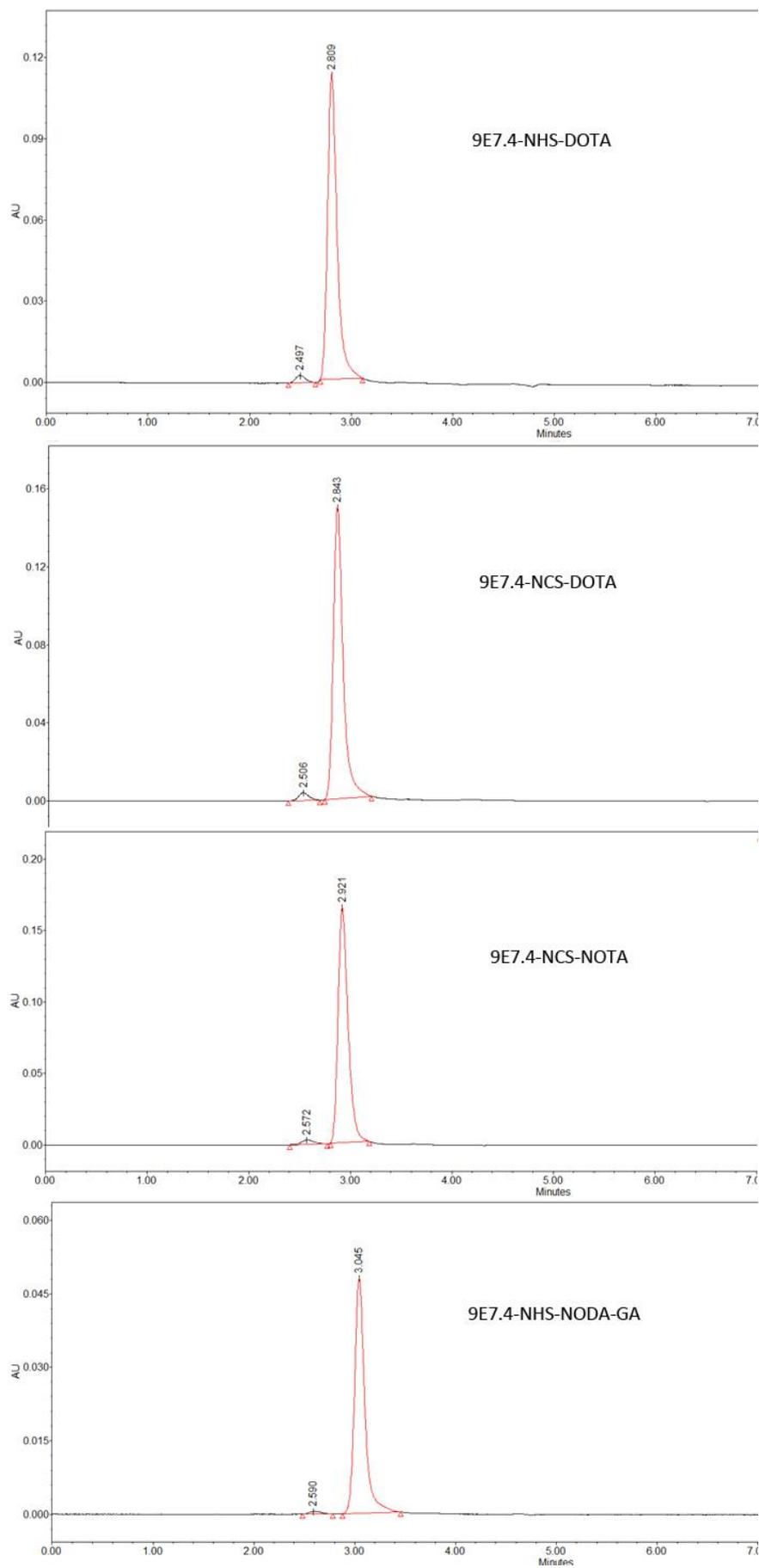


Figure 17b : Chromatogrammes UV obtenus pour le 9E7.4-NHS-DOTA, le 9E7.4-NCS-DOTA, le 9E7.4-NCS-NOTA et le 9E7.4-NHS-NODA-GA.

	TE1PA	NCS-TE1PA	NHS-DOTA	NCS-DOTA	NCS-NOTA	NHS-NODA-GA
Agrégats (%)	14,4	0,7	2,2	2,4	1,9	1,4

Tableau 2 : Pourcentage d'agrégats mesurés par UPLC pour les immunoconjugués 9E7.4-TE1PA, 9E7.4-NCS-TE1PA, 9E7.4-NHS-DOTA, 9E7.4-NCS-DOTA, 9E7.4-NCS-NOTA et 9E7.4-NHS-NODA-GA.

Le pourcentage d'agrégats a également été vérifié pour le TE1PA après avoir fait varier le nombre d'équivalents de ligands ajoutés dans le couplage. On obtient ainsi :

- 500 eq. : 14,4 %
- 700 eq. : 23,6 %
- 1000 eq. : 57,1 %

2.2. Mise au point du couplage du NCS-TE1PA sur les AcM 9E7.4 et hLL2

Le couplage du NCS-TE1PA a été mis au point sur deux AcM, un de rat et un humanisé. Chacun des deux AcM a été couplé avec un ratio de 10 eq., 20 eq. et 30 eq. molaires de ligands. Le nombre de ligands par AcM a été évalué par des radiomarquages tests et les résultats sont présentés dans le **Tableau 3**.

	hLL2-NCS-TE1PA	9E7.4-NCS-TE1PA
10 eq.	2,5	2
20 eq.	4,2	5
50 eq.	> 5	> 5

Tableau 3 : Nombre de ligands couplés par AcM pour le hLL2-NCS-TE1PA et le 9E7.4-NCS-TE1PA, lors de couplages réalisés avec 10, 20 et 50 eq. molaires de ligands.

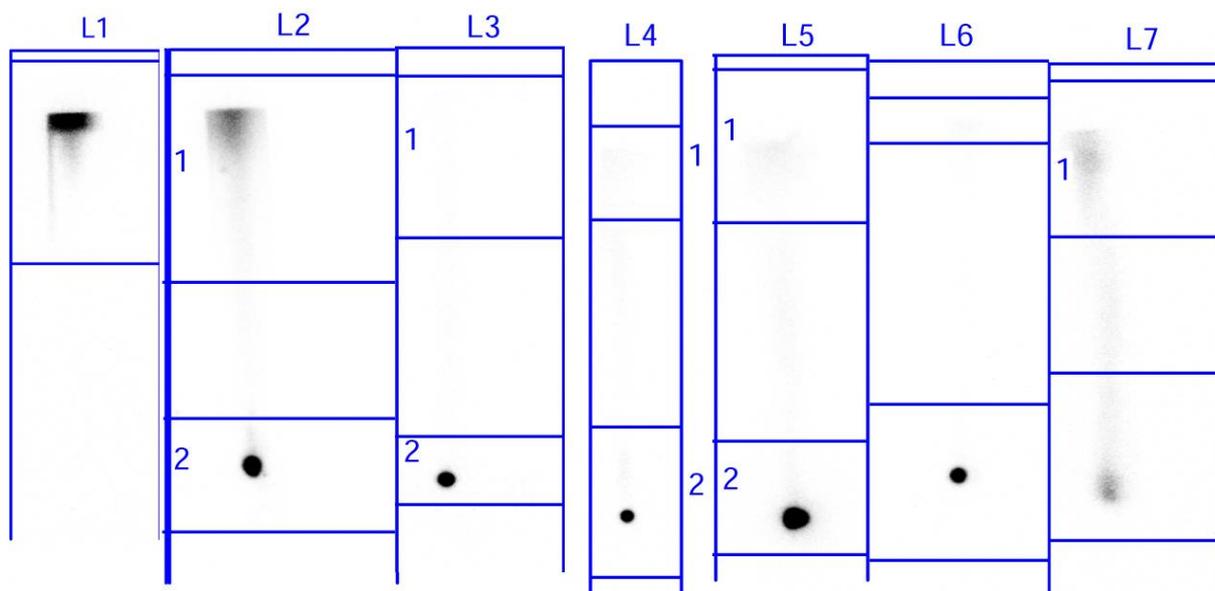
2.3. Nombre de ligands par anticorps et rendement de radiomarquage

Le rendement de radiomarquage ainsi que le nombre de ligands couplés par AcM sont présentés dans le **Tableau 4**.

$X = {}^{64}\text{Cu-9E7.4}$	X-TE1PA	X-NCS-TE1PA	X-NHS- DOTA	X-NCS- DOTA	X-NCS- NOTA	X-NHS- NODA-GA
Nombre de ligands / AcM	0,8 ± 0,2	5 ± 1	4 ± 1	2,4 ± 0,5	1,2 ± 0,2	0,5 ± 0,2
Rendement de radiomarquage (%)	77 ± 2,9	97,2 ± 2	97,7 ± 2,9	92,9 ± 3,7	95,7 ± 3,6	57,2 ± 2,8

Tableau 4 : Nombre de ligands couplés par AcM 9E7.4 et rendement de radiomarquage au ${}^{64}\text{Cu}$ pour les immunoconjugués à base de TE1PA, NCS-TE1PA, NHS-DOTA, NCS-DOTA, NCS-NOTA et NHS-NODA-GA (n = 3).

Le rendement de radiomarquage a été évalué sur un marquage de ratio molaire 1:1 en équivalents de métaux totaux par rapport à l'AcM. La **Figure 18** présente les radiochromatogrammes obtenus pour chacun des radioimmunoconjugués.



Lane #1	ID	Gross DLU	% Sum
	1 - Prof	1,189,719.1	100.0

Lane #5	ID	Gross DLU	% Sum
	1 - Prof	34,135.7	3.8
	2 - Prof	859,832.6	96.2

Lane #2	ID	Gross DLU	% Sum
	1 - Prof	1,310,573.0	55.4
	2 - Prof	1,054,598.2	44.6

Lane #6	ID	Gross DLU	% Sum
	1 - Prof	18,304.1	5.1
	2 - Prof	342,057.5	94.9

Lane #3	ID	Gross DLU	% Sum
	1 - Prof	34,135.7	3.8
	2 - Prof	859,832.6	96.2

Lane #7	ID	Gross DLU	% Sum
	1 - Prof	220,862.8	44.8
	2 - Prof	271,606.4	55.2

Lane #4	ID	Gross DLU	% Sum
	1 - Prof	24,595.6	8.0
	2 - Prof	281,103.1	92.0

Figure 18 : Radiochromatogrammes obtenus pour les radioimmunoconjugués dérivés du TE1PA (lane #2), du NCS-TE1PA (lane #3), du NHS-DOTA (lane #4), du NCS-DOTA (lane #5), du NCS-NOTA (lane #6) et du NHS-NODA-GA (lane #7). La lane #1 représente le témoin $^{64}\text{CuCl}_2$ libre (non radiomarqué).

2.4. Immunoréactivité

L'immunoréactivité a été déterminée pour les immunoconjugués ayant au minimum un ligand couplé par AcM (c'est-à-dire ne nécessitant pas de purification), soit ceux contenant

le NCS-TE1PA, le NHS-DOTA, le NCS-DOTA et le NCS-NOTA. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 5**. L'immunoréactivité de l'AcM 9E7.4 non modifié est de 85 %.

$X = {}^{64}\text{Cu-9E7.4}$	X-NCS-TE1PA	X-NHS-DOTA	X-NCS-DOTA	X-NCS-NOTA
Immunoréactivité (%)	84 ± 0,8	75,3 ± 1,8	51,9 ± 5,1	58,3 ± 4,5

Tableau 5 : Immunoréactivité déterminée après marquage au ${}^{64}\text{Cu}$ pour le 9E7.4-*p*-NCS-Bn-TE1PA, le 9E7.4-NHS-DOTA, le 9E7.4-*p*-NCS-Bn-DOTA et le 9E7.4-*p*-NCS-Bn-NOTA (n = 3).

2.5. Activité spécifique molaire

L'activité molaire des immunoconjugués contenant les ligands NCS-TE1PA, NCS-NOTA et NHS-DOTA a été évaluée sur des couplages provenant de la même source de ${}^{64}\text{Cu}$, afin de s'affranchir de la variabilité inter-sources due aux contaminants métalliques. Elle a été réalisée sur un marquage avec excès de ${}^{64}\text{Cu}$ suivi d'une purification par filtration sur gel. Les résultats obtenus sont :

- ${}^{64}\text{Cu-9E7.4-p-NCS-Bn-TE1PA}$: 40 MBq/nmol

- ${}^{64}\text{Cu-9E7.4-p-NCS-Bn-NOTA}$: 13 MBq/nmol

- ${}^{64}\text{Cu-9E7.4-NHS-DOTA}$: 34 MBq/nmol

V. DISCUSSION

Le ligand bifonctionnel joue un rôle crucial au sein d'un radiopharmaceutique à base de ^{64}Cu . L'intérêt croissant des isotopes du cuivre pour l'imagerie et la thérapie a conduit à un développement concomitant des ligands disposants des qualités nécessaires à cette utilisation. Parmi les différents candidats potentiels, la classe des tétraazamacrocycles a démontré sa capacité à former des complexes thermodynamiquement et cinétiquement stables⁶⁰. Cependant, cette stabilité reste insuffisante en milieu biologique, où la présence de protéines affines pour le cuivre et d'ions entraîne une dissociation des complexes et un relargage du ^{64}Cu dans l'organisme.

Afin de développer un ligand plus performant pour le cuivre, une collaboration est née entre notre équipe et l'unité CNRS 6521 de Brest. Elle permet de réaliser des preuves de concept et d'évaluer l'intérêt des différents ligands sur des modèles *in vitro* et *in vivo*^{172,173}. Le travail présenté dans ce mémoire concerne l'étude d'un de ces ligands et a pour but d'évaluer ses différentes propriétés dans un même modèle, tout en le comparant à d'autres chélates équivalents disponibles sur le marché. Il vient également compléter l'étude de l'AcM 9E7.4 produit au sein du laboratoire.

L'équipe de Brest a réalisé la synthèse organique de plusieurs chélates azamacrocycles comportant une fonction picolinate. Parmi eux, le plus prometteur est le TE1PA. Il s'agit d'un ligand à base cyclame comportant une fonction dérivée de l'acide picolinique au niveau d'un des azotes du cycle. En conséquence, après la mise au point de la synthèse, l'étape suivante a été d'évaluer les propriétés de chélation de ce ligand par des tests *in vitro*. Le TE1PA a démontré une cinétique de complexation très rapide, y compris à pH acide. La stabilité thermodynamique des complexes est également élevée ($p = 18,64$), notamment par rapport à celle des complexes Zn-TE1PA, montrant ainsi une importante sélectivité du ligand pour le Cu^{2+} . Également, les complexes Cu-TE1PA possèdent une plus grande inertie cinétique en milieu acide que les autres ligands macrocycliques utilisés dans la littérature pour complexer le cuivre. La structure en trois dimensions des complexes a été étudiée par cristallographie et a démontré que le TE1PA complexait le cuivre en utilisant tous les atomes donneurs d'électrons disponibles sur le cycle, formant ainsi une géométrie très stable de type pyramide à base carrée.

Après avoir démontré le potentiel du TE1PA comme chélate du cuivre, l'étape suivante prise en charge par notre équipe a été de déterminer si le ligand conservait ses propriétés en milieu biologique. Ces études ont ainsi montré une stabilité *in vitro* des complexes ^{64}Cu -TE1PA à 37°C dans du sérum humain. Le TE1PA radiomarqué a ensuite été injecté dans un modèle murin afin d'observer sa cinétique de distribution *in vivo* et de réaliser une étude de métabolisme hépatique. Les résultats obtenus ont validé la stabilité des complexes Cu-TE1PA et sa résistance à la transchélation¹⁷².

Ces tests préliminaires reposaient uniquement sur le ligand seul : cependant, pour envisager une application en radiopharmacie, il doit être couplé à un vecteur. Le TE1PA a donc été greffé sur plusieurs anticorps monoclonaux pour vérifier s'il conservait ses propriétés. Ce ligand ne disposant pas d'une fonctionnalisation de type NHS ou NCS comme la majorité de ses équivalents commerciaux, il a donc été nécessaire de modifier l'acide carboxylique du bras picolinate afin d'introduire une fonction SNHS capable de réagir avec les amines primaires de l'anticorps. Une première étude a été menée après couplage à l'AcM F6, dirigé contre l'antigène carcino-embryonnaire¹⁷³ (ACE). Si elle a démontré la faisabilité de l'utilisation du TE1PA, la mobilisation de l'acide carboxylique pour la fonctionnalisation du ligand entraînait une diminution de ses capacités de chélation du cuivre. Ainsi, la cinétique de complexation à 25°C atteint son maximum en 45 min, contre moins de 5 min pour la version non conjuguée. De même, la stabilité *in vivo* des complexes ^{64}Cu -F6-TE1PA ne semble pas supplanter celle de ^{64}Cu -F6-DOTA.

Afin de conserver les propriétés du TE1PA, il a été envisagé d'intégrer une fonction de couplage à un vecteur sur un carbone du macrocycle (C-fonctionnalisation). L'équipe de Brest a donc procédé à la synthèse organique d'une version C-fonctionnalisée du TE1PA, avec un cycle benzénique portant en *para* une fonction NCS capable de réagir avec les amines primaires du vecteur¹⁷⁴. Le NCS-TE1PA obtenu a été intégré à l'étude présentée ici, en comparaison avec sa version non fonctionnalisée ainsi qu'avec plusieurs ligands azamacrocycles non pontés parmi les plus utilisés dans la littérature.

L'introduction d'une fonction de couplage sur le TE1PA présente plusieurs avantages. En effet, elle simplifie la réaction de couplage, qui se réalise en une seule étape puisqu'il n'est plus nécessaire de procéder à l'activation de l'acide carboxylique du bras picolinate. Le

couplage du TE1PA par la voie SNHS entraîne un changement de charge de +1 dû à l'évolution de l'acide en amide. Le NCS-TE1PA C-fonctionnalisé permet une diminution de la charge globale du complexe, restaurant les capacités de chélation. Également, on diminue drastiquement la quantité de ligands utilisés : le TE1PA nécessitait l'addition d'un large excès par rapport à l'AcM, entraînant un pourcentage important d'agrégats.

Lors de la mise au point du couplage du NCS-TE1PA, plusieurs équivalents molaires de ligands ont été testés : 10 eq., 20 eq. et 30 eq. La médiane de 20 eq. a été choisie car c'est la plus utilisée dans la littérature avec les ligands azamacrocycles portant ce type de fonctionnalisation^{62,175,176}. C'est également la proportion qui a été retenue pour les ligands commerciaux utilisés dans cette étude. Les tests de couplage du NCS-TE1PA ont été réalisés sur deux AcM : le 9E7.4 et un anticorps anti-CD22 humanisé, le hLL2, utilisé pour confirmer la méthode. Le nombre de ligands obtenu a été équivalent entre les deux AcM et a validé la procédure de couplage du NCS-TE1PA à un AcM. A la suite de ces résultats, le protocole utilisant 20 eq. de ligands a été choisi pour la poursuite de l'étude sur le 9E7.4.

Le nombre de ligands couplés par AcM est un paramètre clé à maîtriser lors de l'élaboration du radiopharmaceutique, car il conditionne ensuite l'activité spécifique molaire du radioimmunoconjugué et permet de limiter la quantité de vecteur injectée. Des ligands étudiés, le NCS-TE1PA s'est montré le plus performant sur le 9E7.4, permettant de greffer environ 5 ligands par AcM. Ce résultat n'a pas pu être atteint pour ses équivalents NCS-NOTA et NCS-DOTA, pour lesquels ont été obtenus respectivement 1,2 et 2,4 ligands par AcM. Le NHS-NOGA-GA n'a pas permis un couplage de tous les AcM dans ces conditions, et ce même lors d'essais de couplage en utilisant 50 eq. molaires de ligands. Dans le modèle de l'AcM 9E7.4, le NCS-TE1PA ainsi que le NHS-DOTA ont plus de facilités à se lier aux amines primaires sans endommager les fonctions impliquées dans l'interaction antigène/anticorps. En effet, le 9E7.4-NCS-NOTA et le 9E7.4-NCS-DOTA montrent un déclin de l'immunoréactivité après couplage. Cette diminution est d'autant plus importante que l'on augmente le nombre de ligands greffés par AcM.

L'activité spécifique molaire étudiée pour le ⁶⁴Cu-9E7.4-NCS-TE1PA, le ⁶⁴Cu-9E7.4-NCS-NOTA et le ⁶⁴Cu-9E7.4-NHS-DOTA découle directement de ces données. Les meilleurs résultats obtenus pour le ⁶⁴Cu-9E7.4-NCS-TE1PA sont également le reflet de sa plus grande affinité pour

le Cu^{2+} : la réaction de complexation n'était que peu affectée par la présence de contaminants métalliques, contrairement au DOTA ou au NOTA.

La C-fonctionnalisation du TE1PA a également grandement amélioré son couplage à un vecteur de type AcM. Le TE1PA non fonctionnalisé a permis de coupler seulement 0,5 ligands par AcM ; un essai à 700 eq. n'a montré qu'une modeste amélioration, avec 0,8 ligands par AcM. Au-delà de 700 eq., le pourcentage d'agrégats générés par le processus de couplage entraîne une perte conséquente de l'AcM. En comparaison, le NCS-TE1PA permet de greffer environ 10 fois plus de ligands que le TE1PA, avec peu d'agrégats générés (moins de 5 %, résultat partagé par tous les ligands commerciaux).

L'immunoréactivité a été évaluée pour les radioimmunoconjugués ayant au moins un ligand greffé par AcM. Le 9E7.4-NCS-TE1PA a montré une immunoréactivité de $84 \pm 0,8$ %, soit non significativement différente de celle de l'AcM non modifié, évaluée à 85 %. Chez tous les ligands commerciaux étudiés, on observe une perte plus au moins importante de l'immunoréactivité. Elle est probablement imputable à une interaction plus importante de ces ligands avec la zone de reconnaissance de l'antigène.

Cette étude a donc permis de valider le couplage et le radiomarquage du NCS-TE1PA et de prouver sa supériorité par rapport à sa version non fonctionnalisée, particulièrement en ce qui concerne la liaison à un vecteur biologique. Dans le modèle du 9E7.4, le NCS-TE1PA s'est également montré plus performant que les équivalents commerciaux sur tous les paramètres *in vitro* étudiés. Cela confirme le passage à une étude *in vivo*. Le 9E7.4 avait notamment été choisi car disposant d'un modèle animal syngénique de myélome multiple¹⁷⁷. L'étape suivante sera donc d'étudier si le NCS-TE1PA conserve ses excellentes propriétés de chélation du Cu^{2+} en milieu biologique. Le F6-TE1PA ayant été comparé au DOTA, le 9E7.4-NCS-TE1PA sera étudié *versus* le 9E7.4-NHS-DOTA, la version N-fonctionnalisée avec le NHS ayant donné de meilleurs résultats *in vitro* que son homologue C-fonctionnalisé avec le NCS.

CONCLUSION

L'imagerie phénotypique est un outil diagnostique en plein essor dans plusieurs domaines cruciaux de la santé publique, dont l'oncologie. Parmi les applications possibles de l'immuno-TEP, on retrouve le myélome multiple, dont les tumeurs hétérogènes ou quiescentes sont difficiles à visualiser avec les méthodes actuelles de TEP au ^{18}F -FDG. Associée aux techniques de radiothérapie ciblée, elle permet une approche dite « théranostique » s'inscrivant dans la démarche d'une médecine personnalisée adaptée à chaque patient.

Lors du développement d'un radiopharmaceutique pour une application en imagerie phénotypique, le choix du vecteur va dépendre majoritairement de la cible souhaitée ainsi que de la pharmacocinétique du produit final. Le radionucléide, ayant le rôle de traceur, sera choisi en fonction de son type de rayonnement, son énergie ainsi que sa demi-vie radioactive. Étant donné ses propriétés, le ^{64}Cu fait partie des isotopes d'intérêt pour le développement de ces techniques d'imagerie. Cependant, il nécessite l'introduction d'un ligand dit bifonctionnel, soit capable de se fixer au vecteur et de chélater l'ion radioactif, pour pouvoir radiomarquer un vecteur biologique avec une liaison suffisamment stable. Dans cette optique, une collaboration est née entre notre équipe et l'UMR 6521 de Brest afin d'élaborer un ligand spécifique du cuivre pouvant être utilisé dans un radiopharmaceutique : le TE1PA.

Ce travail intervient au sein de cette collaboration, en étudiant deux versions de ce ligand sur un modèle *in vitro* d'un anticorps monoclonal potentiellement utilisable dans le cadre du myélome multiple. Ce ligand a été comparé à une sélection de ligands équivalents disponibles commercialement. Différents paramètres ont été évalués en lien avec la faisabilité d'une application clinique. Le TE1PA a montré sa supériorité dans ce modèle, avec un nombre supérieur de ligands par AcM sans perte d'immunoréactivité, une meilleure sélectivité pour le Cu^{2+} , une cinétique de complexation rapide et une stabilité du radiomarquage. En conséquence, ce ligand sera par la suite évalué dans un modèle pré-clinique afin de compléter l'étude de ses propriétés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Basu, S.; Alavi, A. Unparalleled Contribution of ^{18}F -FDG PET to Medicine over 3 Decades. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49* (10), 17N-21N, 37N.
- (2) Merrall, N. W.; Plevin, R.; Gould, G. W. Growth Factors, Mitogens, Oncogenes and the Regulation of Glucose Transport. *Cell. Signal.* **1993**, *5* (6), 667–675.
- (3) Weber, W. A.; Schwaiger, M.; Avril, N. Quantitative Assessment of Tumor Metabolism Using FDG-PET Imaging. *Nucl. Med. Biol.* **2000**, *27* (7), 683–687.
- (4) Papanastasiou, G.; Williams, M. C.; Dweck, M. R.; Mirsadraee, S.; Weir, N.; Fletcher, A.; Lucatelli, C.; Patel, D.; van Beek, E. J. R.; Newby, D. E.; et al. Multimodality Quantitative Assessments of Myocardial Perfusion Using Dynamic Contrast Enhanced Magnetic Resonance and ^{15}O -Labelled Water Positron Emission Tomography Imaging. *IEEE Trans. Radiat. Plasma Med. Sci.* **2018**, *2* (3), 259–271.
- (5) Wright, B. D.; Lapi, S. E. Designing the Magic Bullet? The Advancement of Immuno-PET into Clinical Use. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54* (8), 1171–1174.
- (6) Van Der Veldt, A.; Smit, E.; Lammertsma, A. A. Positron Emission Tomography as a Method for Measuring Drug Delivery to Tumors in Vivo: The Example of ^{11}C -Docetaxel. *Front. Oncol.* **2013**, *3*.
- (7) Bruyant, P. D. Analytic and Iterative Reconstruction Algorithms in SPECT. *J. Nucl. Med.* **2002**, vol. 43 no. 10 1343-1358
- (8) Surti, S.; Kuhn, A.; Werner, M. E.; Perkins, A. E.; Kolthammer, J.; Karp, J. S. Performance of Philips Gemini TF PET/CT Scanner with Special Consideration for Its Time-of-Flight Imaging Capabilities. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48* (3), 471–480.
- (9) El-Galaly, T. C.; Gormsen, L. C.; Hutchings, M. PET/CT for Staging; Past, Present, and Future. *Semin. Nucl. Med.* **2018**, *48* (1), 4–16.
- (10) Schütz, F.; Lautenschläger, C.; Lorenz, K.; Haerting, J. Positron Emission Tomography (PET) and PET/CT in Thyroid Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Eur. Thyroid J.* **2018**, *7* (1), 13–20.
- (11) Vali, R.; Loidl, W.; Pirich, C.; Langesteger, W.; Beheshti, M. Imaging of Prostate Cancer with PET/CT Using ^{18}F -Fluorocholine. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2015**, *5* (2), 96–108.
- (12) Pichler, B. J.; Wehrl, H. F.; Judenhofer, M. S. Latest Advances in Molecular Imaging Instrumentation. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49* (Suppl 2), 5S-23S.
- (13) Karp, J. S.; Surti, S.; Daube-Witherspoon, M. E.; Freifelder, R.; Cardi, C. A.; Adam, L.-E.; Bilger, K.; Muehlechner, G. Performance of a Brain PET Camera Based on Anger-Logic Gadolinium Oxyorthosilicate Detectors. *J. Nucl. Med.* **2003**, *44* (8), 1340–1349.
- (14) Bockisch, A.; Freudenberg, L. S.; Schmidt, D.; Kuwert, T. Hybrid Imaging by SPECT/CT and PET/CT: Proven Outcomes in Cancer Imaging. *Semin. Nucl. Med.* **2009**, *39* (4), 276–289.
- (15) Reske, S. N.; Kotzerke, J. FDG-PET for Clinical Use. *Eur. J. Nucl. Med.* **2001**, *28* (11), 1707–1723.
- (16) Marcus, C.; Mena, E.; Subramaniam, R. M. Brain PET in the Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Clin. Nucl. Med.* **2014**, *39* (10), e413-22; quiz e423-426.

- (17) Pan, J. A.; Salerno, M. Clinical Utility and Future Applications of PET/CT and PET/CMR in Cardiology. *Diagnostics (Basel)* **2016**, *6* (3).
- (18) Evans, N. R.; Tarkin, J. M.; Buscombe, J. R.; Markus, H. S.; Rudd, J. H. F.; Warburton, E. A. PET Imaging of the Neurovascular Interface in Cerebrovascular Disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2017**, *13* (11), 676–688.
- (19) Mapelli, P.; Picchio, M. Initial Prostate Cancer Diagnosis and Disease Staging — the Role of Choline-PET-CT. *Nat. Rev. Urol.* **2015**, *12* (9), 510–518.
- (20) Kulshrestha, R. K.; Vinjamuri, S.; England, A.; Nightingale, J.; Hogg, P. The Role of ¹⁸F-Sodium Fluoride PET/CT Bone Scans in the Diagnosis of Metastatic Bone Disease from Breast and Prostate Cancer. *J. Nucl. Med. Technol.* **2016**, *44* (4), 217–222.
- (21) Li, W.; Lao-Kaim, N. P.; Roussakis, A. A.; Martín-Bastida, A.; Valle-Guzman, N.; Paul, G.; Loane, C.; Widner, H.; Politis, M.; Foltynie, T.; et al. ¹¹C-PE2I and ¹⁸F-Dopa PET for Assessing Progression Rate in Parkinson's: A Longitudinal Study. *Mov. Disord.* **2018**, *33* (1), 117–127.
- (22) Bozkurt, M. F.; Virgolini, I.; Balogova, S.; Beheshti, M.; Rubello, D.; Decristoforo, C.; Ambrosini, V.; Kjaer, A.; Delgado-Bolton, R.; Kunikowska, J.; et al. Guideline for PET/CT Imaging of Neuroendocrine Neoplasms with ⁶⁸Ga-DOTA-Conjugated Somatostatin Receptor Targeting Peptides and ¹⁸F-DOPA. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2017**, *44* (9), 1588–1601.
- (23) Martínez, G.; Vernooij, R. W.; Fuentes Padilla, P.; Zamora, J.; Bonfill Cosp, X.; Flicker, L. ¹⁸F PET with Florbetapir for the Early Diagnosis of Alzheimer's Disease Dementia and Other Dementias in People with Mild Cognitive Impairment (MCI). *Cochrane Database Syst. Rev.* **2017**, *2017* (11).
- (24) Jadvar, H. Is There Utility for FDG PET in Prostate Cancer? *Semin. Nucl. Med.* **2016**, *46* (6), 502–506.
- (25) Liu, Y. The Place of FDG PET/CT in Renal Cell Carcinoma: Value and Limitations. *Front. Oncol.* **2016**, *6*.
- (26) Bouchelouche, K.; Physician, C.; Choyke, P. L. PET/CT in Renal, Bladder and Testicular Cancer. *PET Clin.* **2015**, *10* (3), 361–374.
- (27) Trapani, J. A.; Darcy, P. K. Immunotherapy of Cancer. *Aust Fam Physician* **2017**, *46* (4), 194–199.
- (28) Mitri, Z.; Constantine, T.; O'Regan, R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother. Res. Pract.* **2012**.
- (29) Lindström, L. S.; Karlsson, E.; Wilking, U. M.; Johansson, U.; Hartman, J.; Lidbrink, E. K.; Hatschek, T.; Skoog, L.; Bergh, J. Clinically Used Breast Cancer Markers Such As Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Are Unstable Throughout Tumor Progression. *JCO* **2012**, *30* (21), 2601–2608.
- (30) McCabe, K. E.; Wu, A. M. Positive Progress in ImmunoPET—Not Just a Coincidence. *Cancer Biother. Radio.* **2010**, *25* (3), 253–261.
- (31) Kurihara, H.; Hamada, A.; Yoshida, M.; Shimma, S.; Hashimoto, J.; Yonemori, K.; Tani, H.; Miyakita, Y.; Kanayama, Y.; Wada, Y.; et al. ⁶⁴Cu-DOTA-Trastuzumab PET Imaging and HER2 Specificity of Brain Metastases in HER2-Positive Breast Cancer Patients. *Eur. J. Med. Nucl. Mol. Imaging Res.* **2015**, *5*.

- (32) Velikyan, I.; Schweighöfer, P.; Feldwisch, J.; Seemann, J.; Frejd, F. Y.; Lindman, H.; Sörensen, J. Diagnostic HER2-Binding Radiopharmaceutical, ^{68}Ga -ABY-025, for Routine Clinical Use in Breast Cancer Patients. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2019**, *9* (1), 12–23.
- (33) Bailly, C.; Gouard, S.; Guérard, F.; Chalopin, B.; Carlier, T.; Faivre-Chauvet, A.; Remaud-Le Saëc, P.; Bourgeois, M.; Chouin, N.; Rbah-Vidal, L.; et al. What Is the Best Radionuclide for Immuno-PET of Multiple Myeloma? A Comparison Study Between ^{89}Zr - and ^{64}Cu -Labeled Anti-CD138 in a Preclinical Syngeneic Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (10), 2564.
- (34) Lawrentschuk, N.; Davis, I. D.; Bolton, D. M.; Scott, A. M. Positron Emission Tomography (PET), Immuno-PET and Radioimmunotherapy in Renal Cell Carcinoma: A Developing Diagnostic and Therapeutic Relationship. *BJU International* **2006**, *97* (5), 916–922.
- (35) Muylle, K.; Flamen, P.; Vugts, D. J.; Guiot, T.; Ghanem, G.; Meuleman, N.; Bourgeois, P.; Vanderlinden, B.; van Dongen, G. A. M. S.; Everaert, H.; et al. Tumour Targeting and Radiation Dose of Radioimmunotherapy with ^{90}Y -Rituximab in CD20+ B-Cell Lymphoma as Predicted by ^{89}Zr -Rituximab Immuno-PET: Impact of Preloading with Unlabelled Rituximab. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2015**, *42* (8), 1304–1314.
- (36) Ménager, J.; Gorin, J.-B.; Fichou, N.; Gouard, S.; Morgenstern, A.; Bruchertseifer, F.; Davodeau, F.; Kraeber-Bodéré, F.; Chérel, M.; Gaschet, J.; et al. Radio-immunothérapie alpha - Principes et intérêts en immunité antitumorale. *Med. Sci. (Paris)* **2016**, *32* (4), 362–369.
- (37) Bailly, C.; Cléry, P.-F.; Faivre-Chauvet, A.; Bourgeois, M.; Guérard, F.; Haddad, F.; Barbet, J.; Chérel, M.; Kraeber-Bodéré, F.; Carlier, T.; et al. Immuno-PET for Clinical Theranostic Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *18* (1).
- (38) Boswell, C. A.; Brechbiel, M. W. Development of Radioimmunotherapeutic and Diagnostic Antibodies: An Inside-Out View. *Nucl. Med. Biol.* **2007**, *34* (7), 757–778.
- (39) Bander, N. H. Technology Insight: Monoclonal Antibody Imaging of Prostate Cancer. *Nat. Clin. Pract. Urol.* **2006**, *3* (4), 216–225.
- (40) Wu, A. M.; Olafsen, T. Antibodies for Molecular Imaging of Cancer. *Cancer J.* **2008**, *14* (3), 191–197.
- (41) Todorovska, A.; Roovers, R. C.; Dolezal, O.; Kortt, A. A.; Hoogenboom, H. R.; Hudson, P. J. Design and Application of Diabodies, Triabodies and Tetrabodies for Cancer Targeting. *J. Immunol. Methods* **2001**, *248* (1), 47–66.
- (42) Grönwall, C.; Ståhl, S. Engineered Affinity Proteins—Generation and Applications. *J. Biotechnol.* **2009**, *140* (3), 254–269.
- (43) Barbet, J.; Chatal, J.-F.; Gauché, F.; Martino, J. Which Radionuclides Will Nuclear Oncology Need Tomorrow? *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2006**, *33* (6), 627–630.
- (44) Linder, M. C.; Hazegh-Azam, M. Copper Biochemistry and Molecular Biology. *Am. J. Clin. Nutr.* **1996**, *63* (5), 797S-811S.
- (45) Yamazaki, I. M.; Koskinas, M. F.; Moreira, D. S.; Takeda, M. N.; Dias, M. S. Disintegration Rate and Gamma-Ray Emission Probability per Decay Measurement of ^{64}Cu . *Appl. Radiat. Isotopes* **2018**, *134*, 312–315.

- (46) Zinn, K. R.; Morris, S. Production of No-Carrier-Added ^{64}Cu from Zinc Metal Irradiated under Boron Shielding. *Cancer* **1994**; *73*: 774-8
- (47) Peach, K.; Wilson, P.; Jones, B. Accelerator Science in Medical Physics. *Br. J. Radiol.* **2011**, *84* (Spec Iss 1), S004-S010.
- (48) Kim, J. H.; Park, H.; Chun, K. S. Effective Separation Method of ^{64}Cu from ^{67}Ga Waste Product with a Solvent Extraction and Chromatography. *Appl. Radiat. Isotopes* **2010**, *68* (9), 1623–1626.
- (49) Szelecsényi, F.; Blessing, G.; Qaim, S. M. Excitation Functions of Proton Induced Nuclear Reactions on Enriched ^{61}Ni and ^{64}Ni : Possibility of Production of No-Carrier-Added ^{61}Cu and ^{64}Cu at a Small Cyclotron. *Appl. Radiat. Isotopes* **1993**, *44* (3), 575–580.
- (50) McCarthy, D. W.; Shefer, R. E.; Klinkowstein, R. E.; Bass, L. A.; Margeneau, W. H.; Cutler, C. S.; Anderson, C. J.; Welch, M. J. Efficient Production of High Specific Activity ^{64}Cu Using a Biomedical Cyclotron. *Nucl. Med. Biol.* **1997**, *24* (1), 35–43.
- (51) Obata, A.; Kasamatsu, S.; McCarthy, D. W.; Welch, M. J.; Saji, H.; Yonekura, Y.; Fujibayashi, Y. Production of Therapeutic Quantities of ^{64}Cu Using a 12 MeV Cyclotron. *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30* (5), 535–539.
- (52) Haddad, F.; Ferrer, L.; Guertin, A.; Carlier, T.; Michel, N.; Barbet, J.; Chatal, J.-F. ARRONAX, a High-Energy and High-Intensity Cyclotron for Nuclear Medicine. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *35* (7), 1377–1387.
- (53) Alliot, C.; Audouin, N.; Barbet, J.; Bonraisin, A.-C.; Bossé, V.; Bourdeau, C.; Bourgeois, M.; Duchemin, C.; Guertin, A.; Haddad, F.; et al. Is There an Interest to Use Deuteron Beams to Produce Non-Conventional Radionuclides? *Front. Med. (Lausanne)* **2015**, *2*.
- (54) Cai, Z.; Anderson, C. J. Chelators for Copper Radionuclides in Positron Emission Tomography Radiopharmaceuticals. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2014**, *57* (4), 224–230.
- (55) Zeglis, B. M.; Lewis, J. S. A Practical Guide to the Construction of Radiometallated Bioconjugates for Positron Emission Tomography. *Dalton Trans* **2011**, *40* (23), 6168–6195.
- (56) Jones-Wilson, T. M.; Deal, K. A.; Anderson, C. J.; McCarthy, D. W.; Kovacs, Z.; Motekaitis, R. J.; Sherry, A. D.; Martell, A. E.; Welch, M. J. The in Vivo Behavior of Copper-64-Labeled Azamacrocyclic Complexes. *Nucl. Med. Biol.* **1998**, *25* (6), 523–530.
- (57) Wadas, T.; Wong, E.; Weisman, G.; Anderson, C. Copper Chelation Chemistry and Its Role in Copper Radiopharmaceuticals. *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13* (1), 3–16.
- (58) Bass, L. A.; Wang, M.; Welch, M. J.; Anderson, C. J. In Vivo Transchelation of Copper-64 from TETA-Octreotide to Superoxide Dismutase in Rat Liver. *Bioconjug. Chem.* **2000**, *11* (4), 527–532.
- (59) Mirick, G. R.; O'Donnell, R. T.; DeNardo, S. J.; Shen, S.; Meares, C. F.; DeNardo, G. L. Transfer of Copper from a Chelated ^{67}Cu -Antibody Conjugate to Ceruloplasmin in Lymphoma Patients. *Nucl. Med. Biol.* **1999**, *26* (7), 841–845.
- (60) Woodin, K. S.; Heroux, K. J.; Boswell, C. A.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Niu, W.; Tomellini, S. A.; Anderson, C. J.; Zakharov, L. N.; Rheingold, A. L. Kinetic Inertness and Electrochemical Behavior of Copper(II) Tetraazamacrocyclic Complexes: Possible Implications for in Vivo Stability. *E. J. Inorg. Chem.* **2005**, *2005* (23), 4829–4833.

- (61) Schubiger, P. A.; Alberto, R.; Smith, A. Vehicles, Chelators, and Radionuclides: Choosing the “Building Blocks” of an Effective Therapeutic Radioimmunoconjugate. *Bioconjug. Chem.* **1996**, *7* (2), 165–179.
- (62) Lewis, M. R.; Boswell, C. A.; Laforest, R.; Buettner, T. L.; Ye, D.; Connett, J. M.; Anderson, C. J. Conjugation of Monoclonal Antibodies with TETA Using Activated Esters: Biological Comparison of ^{64}Cu -TETA-1A3 with ^{64}Cu -BAT-2IT-1A3. *Cancer Biother. Radio.* **2001**, *16* (6), 483–494.
- (63) Rana, T. M.; Meares, C. F. N-Terminal Modification of Immunoglobulin Polypeptide Chains Tagged with Isothiocyanato Chelates. *Bioconjug. Chem.* **1990**, *1* (5), 357–362.
- (64) Adumeau, P.; Davydova, M.; Zeglis, B. M. Thiol-Reactive Bifunctional Chelators for the Creation of Site-Selectively Modified Radioimmunoconjugates with Improved Stability. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29* (4), 1364–1372.
- (65) Baskin, J. M.; Bertozzi, C. R. Bioorthogonal Click Chemistry: Covalent Labeling in Living Systems. *QSAR & Combinatorial Science* **2007**, *26* (11–12), 1211–1219.
- (66) Debets, M. F.; Prins, J. S.; Merckx, D.; Berkel, S. S. van; Delft, F. L. van; Hest, J. C. M. van; Rutjes, F. P. J. T. Synthesis of DIBAC Analogues with Excellent SPAAC Rate Constants. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (27), 5031–5037.
- (67) Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. The Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (41), 13518–13519.
- (68) Meares, C. F.; McCall, M. J.; Reardan, D. T.; Goodwin, D. A.; Diamanti, C. I.; McTigue, M. Conjugation of Antibodies with Bifunctional Chelating Agents: Isothiocyanate and Bromoacetamide Reagents, Methods of Analysis, and Subsequent Addition of Metal Ions. *Anal. Biochem.* **1984**, *142* (1), 68–78.
- (69) Parker, D. Tumour Targeting with Radiolabelled Macrocyclic–Antibody Conjugates. *Chem. Soc. Rev.* **1990**, *19* (3), 271–291.
- (70) Cole, W. C.; DeNardo, S. J.; Meares, C. F.; McCall, M. J.; DeNardo, G. L.; Epstein, A. L.; O’Brien, H. A.; Moi, M. K. Comparative Serum Stability of Radiochelates for Antibody Radiopharmaceuticals. *J. Nucl. Med.* **1987**, *28* (1), 83–90.
- (71) Blower, P. J.; Lewis, J. S.; Zweit, J. Copper Radionuclides and Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine. *Nucl. Med. Biol.* **1996**, *23* (8), 957–980.
- (72) Lewis, J. S.; Dearling, J. L.; Sosabowski, J. K.; Zweit, J.; Carnochan, P.; Kelland, L. R.; Coley, H. M.; Blower, P. J. Copper Bis(Diphosphine) Complexes: Radiopharmaceuticals for the Detection of Multi-Drug Resistance in Tumours by PET. *Eur. J. Nucl. Med.* **2000**, *27* (6), 638–646.
- (73) Fujibayashi, Y.; Taniuchi, H.; Yonekura, Y.; Ohtani, H.; Konishi, J.; Yokoyama, A. Copper-62-ATSM: A New Hypoxia Imaging Agent with High Membrane Permeability and Low Redox Potential. *J. Nucl. Med.* **1997**, *38* (7), 1155–1160.
- (74) Herrero, P.; Hartman, J. J.; Green, M. A.; Anderson, C. J.; Welch, M. J.; Markham, J.; Bergmann, S. R. Regional Myocardial Perfusion Assessed with Generator-Produced Copper-62-PTSM and PET. *J. Nucl. Med.* **1996**, *37* (8), 1294–1300.
- (75) Brown, J. M. The Hypoxic Cell: A Target for Selective Cancer Therapy--Eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer. Res.* **1999**, *59* (23), 5863–5870.

- (76) Tatum, J. L.; Kelloff, G. J.; Gillies, R. J.; Arbeit, J. M.; Brown, J. M.; Chao, K. S. C.; Chapman, J. D.; Eckelman, W. C.; Fyles, A. W.; Giaccia, A. J.; et al. Hypoxia: Importance in Tumor Biology, Noninvasive Measurement by Imaging, and Value of Its Measurement in the Management of Cancer Therapy. *Int. J. Radiat. Biol.* **2006**, *82* (10), 699–757.
- (77) Lewis, J. S.; McCarthy, D. W.; McCarthy, T. J.; Fujibayashi, Y.; Welch, M. J. Evaluation of ^{64}Cu -ATSM in Vitro and in Vivo in a Hypoxic Tumor Model. *J. Nucl. Med.* **1999**, *40* (1), 177–183.
- (78) Wu, Y.; Zhang, X.; Xiong, Z.; Cheng, Z.; Fisher, D. R.; Liu, S.; Gambhir, S. S.; Chen, X. MicroPET Imaging of Glioma Integrin $\alpha\beta 3$ Expression Using ^{64}Cu -Labeled Tetrameric RGD Peptide. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46* (10), 1707–1718.
- (79) McQuade, P.; Miao, Y.; Yoo, J.; Quinn, T. P.; Welch, M. J.; Lewis, J. S. Imaging of Melanoma Using ^{64}Cu - and ^{86}Y -DOTA-ReCCMSH(Arg11), a Cyclized Peptide Analogue of Alpha-MSH. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (8), 2985–2992.
- (80) Chen, X.; Park, R.; Tohme, M.; Shahinian, A. H.; Bading, J. R.; Conti, P. S. MicroPET and Autoradiographic Imaging of Breast Cancer Alpha V-Integrin Expression Using ^{18}F - and ^{64}Cu -Labeled RGD Peptide. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15* (1), 41–49.
- (81) Caserta, E.; Chea, J.; Minnix, M.; Viola, D.; Vonderfecht, S.; Yazaki, P.; Crow, D.; Khalife, J.; Sanchez, J. F.; Palmer, J. M.; et al. Copper 64 -Labeled Daratumumab as a PET/CT Imaging Tracer for Multiple Myeloma. *Blood* **2018**, *131* (7), 741–745.
- (82) Pfeifer, A.; Knigge, U.; Mortensen, J.; Oturai, P.; Berthelsen, A. K.; Loft, A.; Binderup, T.; Rasmussen, P.; Elema, D.; Klausen, T. L.; et al. Clinical PET of Neuroendocrine Tumors Using ^{64}Cu -DOTATATE: First-in-Humans Study. *J. Nucl. Med.* **2012**, *53* (8), 1207–1215.
- (83) Johnbeck, C. B.; Knigge, U.; Loft, A.; Berthelsen, A. K.; Mortensen, J.; Oturai, P.; Langer, S. W.; Elema, D. R.; Kjaer, A. Head-to-Head Comparison of ^{64}Cu -DOTATATE and ^{68}Ga -DOTATOC PET/CT: A Prospective Study of 59 Patients with Neuroendocrine Tumors. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (3), 451–457.
- (84) Malmberg, C.; Ripa, R. S.; Johnbeck, C. B.; Knigge, U.; Langer, S. W.; Mortensen, J.; Oturai, P.; Loft, A.; Hag, A. M.; Kjaer, A. ^{64}Cu -DOTATATE for Noninvasive Assessment of Atherosclerosis in Large Arteries and Its Correlation with Risk Factors: Head-to-Head Comparison with ^{68}Ga -DOTATOC in 60 Patients. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56* (12), 1895–1900.
- (85) Cooper, M. S.; Ma, M. T.; Sunassee, K.; Shaw, K. P.; Williams, J. D.; Paul, R. L.; Donnelly, P. S.; Blower, P. J. Comparison of ^{64}Cu -Complexing Bifunctional Chelators for Radioimmunoconjugation: Labeling Efficiency, Specific Activity, and in Vitro/in Vivo Stability. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23* (5), 1029–1039.
- (86) Maheshwari, V.; Dearling, J. L. J.; Treves, S. T.; Packard, A. B. Measurement of the Rate of Copper(II) Exchange for ^{64}Cu Complexes of Bifunctional Chelators. *Inorganica Chimica Acta* **2012**, *393*, 318–323.
- (87) Park, G.; Dadachova, E.; Przyborowska, A.; Lai, S.; Ma, D.; Broker, G.; Rogers, R. D.; Planalp, R. P.; Brechbiel, M. W. Synthesis of Novel 1,3,5-Cis,Cis-Triaminocyclohexane Ligand Based Cu(II) Complexes as Potential Radiopharmaceuticals and Correlation of Structure and Serum Stability. *Polyhedron* **2001**, *20* (26), 3155–3163.
- (88) Ma, D.; Lu, F.; Overstreet, T.; Milenic, D. E.; Brechbiel, M. W. Novel Chelating Agents for Potential Clinical Applications of Copper. *Nucl. Med. Biol.* **2002**, *29* (1), 91–105.

- (89) Cai, H.; Li, Z.; Huang, C.-W.; Park, R.; Shahinian, A. H.; Conti, P. S. An Improved Synthesis and Biological Evaluation of a New Cage-like Bifunctional Chelator, 4-((8-Amino-3,6,10,13,16,19-Hexaazabicyclo[6.6.6]icosane-1-Ylamino)(Methyl)Benzoic Acid, for ^{64}Cu Radiopharmaceuticals. *Nucl. Med. Biol.* **2010**, *37* (1), 57–65.
- (90) Ferreira, C. L.; Yapp, D. T.; Lamsa, E.; Gleave, M.; Bensimon, C.; Jurek, P.; Kiefer, G. E. Evaluation of Novel Bifunctional Chelates for the Development of ^{64}Cu -Based Radiopharmaceuticals. *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35* (8), 875–882.
- (91) Sun, X.; Wuest, M.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Reed, D. P.; Boswell, C. A.; Motekaitis, R.; Martell, A. E.; Welch, M. J.; Anderson, C. J. Radiolabeling and In Vivo Behavior of Copper-64-Labeled Cross-Bridged Cyclam Ligands. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (2), 469–477.
- (92) Anderson, C. J.; Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R. Cross-Bridged Macrocyclic Chelators for Stable Complexation of Copper Radionuclides for PET Imaging. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *52* (2), 185–192.
- (93) Heroux, K. J.; Woodin, K. S.; Tranchemontagne, D. J.; Widger, P. C. B.; Southwick, E.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Tomellini, S. A.; Wadas, T. J.; Anderson, C. J.; et al. The Long and Short of It: The Influence of N-Carboxyethyl versus N-Carboxymethyl Pendant Arms on in Vitro and in Vivo Behavior of Copper Complexes of Cross-Bridged Tetraamine Macrocycles. *Dalton Trans* **2007**, No. 21, 2150–2162.
- (94) Boswell, C. A.; Sun, X.; Niu, W.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Rheingold, A. L.; Anderson, C. J. Comparative in Vivo Stability of Copper-64-Labeled Cross-Bridged and Conventional Tetraazamacrocyclic Complexes. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (6), 1465–1474.
- (95) Ferdani, R.; Stigers, D. J.; Fiamengo, A. L.; Wei, L.; Li, B. T. Y.; Golen, J. A.; Rheingold, A. L.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Anderson, C. J. Synthesis, Cu(II) Complexation, ^{64}Cu -Labeling and Biological Evaluation of Cross-Bridged Cyclam Chelators with Phosphonate Pendant Arms. *Dalton Trans* **2012**, *41* (7), 1938–1950.
- (96) Zeng, D.; Ouyang, Q.; Cai, Z.; Xie, X.-Q.; Anderson, C. J. New Cross-Bridged Cyclam Derivative CB-TE1K1P, an Improved Bifunctional Chelator for Copper Radionuclides. *Chem. Commun. (Camb.)* **2014**, *50* (1), 43–45.
- (97) Sasada, S.; Kurihara, H.; Kinoshita, T.; Yoshida, M.; Honda, N.; Shimoi, T.; Shimomura, A.; Yunokawa, M.; Yonemori, K.; Shimizu, C.; et al. ^{64}Cu -DOTA-Trastuzumab PET Imaging for HER2-Specific Primary Lesions of Breast Cancer. *Ann. Oncol.* **2017**, *28* (8), 2028–2029.
- (98) Mortimer, J. E.; Bading, J. R.; Park, J. M.; Frankel, P. H.; Carroll, M. I.; Tran, T. T.; Poku, E. K.; Rockne, R. C.; Raubitschek, A. A.; Shively, J. E.; et al. Tumor Uptake of ^{64}Cu -DOTA-Trastuzumab in Patients with Metastatic Breast Cancer. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (1), 38–43.
- (99) Mortimer, J. E.; Bading, J. R.; Colcher, D. M.; Conti, P. S.; Frankel, P. H.; Carroll, M. I.; Tong, S.; Poku, E.; Miles, J. K.; Shively, J. E.; et al. Functional Imaging of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Metastatic Breast Cancer Using ^{64}Cu -DOTA-Trastuzumab PET. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55* (1), 23–29.
- (100) Steeg, P. S.; Camphausen, K. A.; Smith, Q. R. Brain Metastases as Preventive and Therapeutic Targets. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11* (5), 352–363.
- (101) Tolmachev, V.; Yim, C.-B.; Rajander, J.; Perols, A.; Karlström, A. E.; Haaparanta-Solin, M.; Grönroos, T. J.; Solin, O.; Orlova, A. Comparative Evaluation of Anti-HER2 Affibody Molecules Labeled with ^{64}Cu Using NOTA and NODAGA. *Contrast Media Mol. Imaging* **2017**, *2017*, 8565802.

- (102) Arteaga, C. Targeting HER1/EGFR: A Molecular Approach to Cancer Therapy. *Semin. Oncol.* **2003**, *30* (3 Suppl 7), 3–14.
- (103) Ping Li, W.; Meyer, L. A.; Capretto, D. A.; Sherman, C. D.; Anderson, C. J. Receptor-Binding, Biodistribution, and Metabolism Studies of ⁶⁴Cu-DOTA-Cetuximab, a PET-Imaging Agent for Epidermal Growth-Factor Receptor-Positive Tumors. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2008**, *23* (2), 158–171.
- (104) Eiblmaier, M.; Meyer, L. A.; Watson, M. A.; Fracasso, P. M.; Pike, L. J.; Anderson, C. J. Correlating EGFR Expression with Receptor-Binding Properties and Internalization of ⁶⁴Cu-DOTA-Cetuximab in 5 Cervical Cancer Cell Lines. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49* (9), 1472–1479.
- (105) Cai, W.; Chen, K.; He, L.; Cao, Q.; Koong, A.; Chen, X. Quantitative PET of EGFR Expression in Xenograft-Bearing Mice Using ⁶⁴Cu-Labeled Cetuximab, a Chimeric Anti-EGFR Monoclonal Antibody. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, *34* (6), 850–858.
- (106) van Dijk, L. K.; Yim, C.-B.; Franssen, G. M.; Kaanders, J. H. A. M.; Rajander, J.; Solin, O.; Grönroos, T. J.; Boerman, O. C.; Bussink, J. PET of EGFR with ⁶⁴Cu-Cetuximab-F(Ab')₂ in Mice with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Xenografts. *Contrast Media Mol. Imaging* **2016**, *11* (1), 65–70.
- (107) Striese, F.; Sihver, W.; Gao, F.; Bergmann, R.; Walther, M.; Pietzsch, J.; Steinbach, J.; Pietzsch, H.-J. Exploring Pitfalls of ⁶⁴Cu-Labeled EGFR-Targeting Peptide GE11 as a Potential PET Tracer. *Amino Acids* **2018**, *50* (10), 1415–1431.
- (108) Pyo, A.; Yun, M.; Kim, H. S.; Kim, T.-Y.; Lee, J.; Kim, J. Y.; Lee, S.; Kwon, S. Y.; Bom, H.-S.; Kim, H.-S.; et al. ⁶⁴Cu-Labeled Repebody Molecules for Imaging of Epidermal Growth Factor Receptor-Expressing Tumors. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (2), 340–346.
- (109) Dimopoulos, M. A.; Oriol, A.; Nahi, H.; San-Miguel, J.; Bahlis, N. J.; Usmani, S. Z.; Rabin, N.; Orlovski, R. Z.; Komarnicki, M.; Suzuki, K.; et al. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375* (14), 1319–1331.
- (110) Plesner, T.; Arkenau, H.-T.; Gimsing, P.; Krejcik, J.; Lemech, C.; Minnema, M. C.; Lassen, U.; Laubach, J. P.; Palumbo, A.; Lisby, S.; et al. Phase 1/2 Study of Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma. *Blood* **2016**, *128* (14), 1821–1828.
- (111) Lokhorst, H. M.; Plesner, T.; Laubach, J. P.; Nahi, H.; Gimsing, P.; Hansson, M.; Minnema, M. C.; Lassen, U.; Krejcik, J.; Palumbo, A.; et al. Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373* (13), 1207–1219.
- (112) Lin, P.; Owens, R.; Tricot, G.; Wilson, C. S. Flow Cytometric Immunophenotypic Analysis of 306 Cases of Multiple Myeloma. *Am. J. Clin. Pathol.* **2004**, *121* (4), 482–488.
- (113) Santonocito, A. M.; Consoli, U.; Bagnato, S.; Milone, G.; Palumbo, G. A.; Di Raimondo, F.; Stagno, F.; Guglielmo, P.; Giustolisi, R. Flow Cytometric Detection of Aneuploid CD38(++) Plasmacells and CD19(+) B-Lymphocytes in Bone Marrow, Peripheral Blood and PBSC Harvest in Multiple Myeloma Patients. *Leuk. Res.* **2004**, *28* (5), 469–477.
- (114) Patel, Y. C. Somatostatin and Its Receptor Family. *Front. Neuroendocrinol.* **1999**, *20* (3), 157–198.
- (115) Hanaoka, H.; Tominaga, H.; Yamada, K.; Paudyal, P.; Iida, Y.; Watanabe, S.; Paudyal, B.; Higuchi, T.; Oriuchi, N.; Endo, K. Evaluation of ⁶⁴Cu-Labeled DOTA-D-Phe(1)-Tyr (3)-Octreotide (⁶⁴Cu-DOTA-TOC) for Imaging Somatostatin Receptor-Expressing Tumors. *Ann. Nucl. Med.* **2009**, *23* (6), 559–567.

- (116) Anderson, C. J.; Jones, L. A.; Bass, L. A.; Sherman, E. L.; McCarthy, D. W.; Cutler, P. D.; Lanahan, M. V.; Cristel, M. E.; Lewis, J. S.; Schwarz, S. W. Radiotherapy, Toxicity and Dosimetry of Copper-64-TETA-Octreotide in Tumor-Bearing Rats. *J. Nucl. Med.* **1998**, *39* (11), 1944–1951.
- (117) Anderson, C. J.; Ferdani, R. Copper-64 Radiopharmaceuticals for PET Imaging of Cancer: Advances in Preclinical and Clinical Research. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2009**, *24* (4), 379–393.
- (118) Gabriel, M.; Decristoforo, C.; Kandler, D.; Dobrozemsky, G.; Heute, D.; Uprimny, C.; Kovacs, P.; Guggenberg, E. V.; Bale, R.; Virgolini, I. J. ⁶⁸Ga-DOTA-Tyr3-Octreotide PET in Neuroendocrine Tumors: Comparison with Somatostatin Receptor Scintigraphy and CT. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48* (4), 508–518.
- (119) Anderson, C. J.; Pajeau, T. S.; Edwards, W. B.; Sherman, E. L.; Rogers, B. E.; Welch, M. J. In Vitro and in Vivo Evaluation of Copper-64-Octreotide Conjugates. *J. Nucl. Med.* **1995**, *36* (12), 2315–2325.
- (120) de Jong, M.; Breeman, W. A.; Bakker, W. H.; Kooij, P. P.; Bernard, B. F.; Hofland, L. J.; Visser, T. J.; Srinivasan, A.; Schmidt, M. A.; Erion, J. L.; et al. Comparison of ¹¹¹In-Labeled Somatostatin Analogues for Tumor Scintigraphy and Radionuclide Therapy. *Cancer Res.* **1998**, *58* (3), 437–441.
- (121) Sprague, J. E.; Peng, Y.; Sun, X.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Achilefu, S.; Anderson, C. J. Preparation and Biological Evaluation of Copper-64-Labeled Tyr3-Octreotate Using a Cross-Bridged Macrocyclic Chelator. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10* (24), 8674–8682.
- (122) Pfeifer, A.; Knigge, U.; Binderup, T.; Mortensen, J.; Oturai, P.; Loft, A.; Berthelsen, A. K.; Langer, S. W.; Rasmussen, P.; Elema, D.; et al. ⁶⁴Cu-DOTATATE PET for Neuroendocrine Tumors: A Prospective Head-to-Head Comparison with ¹¹¹In-DTPA-Octreotide in 112 Patients. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56* (6), 847–854.
- (123) Hynes, R. O. Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in Cell Adhesion. *Cell* **1992**, *69* (1), 11–25.
- (124) Hood, J. D.; Cheresch, D. A. Role of Integrins in Cell Invasion and Migration. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2* (2), 91–100.
- (125) Zhang, Y.; Yang, Y.; Cai, W. Multimodality Imaging of Integrin $\alpha\beta3$ Expression. *Theranostics* **2011**, *1*, 135–148.
- (126) Albelda, S. M.; Mette, S. A.; Elder, D. E.; Stewart, R.; Damjanovich, L.; Herlyn, M.; Buck, C. A. Integrin Distribution in Malignant Melanoma: Association of the Beta 3 Subunit with Tumor Progression. *Cancer Res.* **1990**, *50* (20), 6757–6764.
- (127) Bello, L.; Francolini, M.; Marthyn, P.; Zhang, J.; Carroll, R. S.; Nikas, D. C.; Strasser, J. F.; Villani, R.; Cheresch, D. A.; Black, P. M. $\alpha\beta3$ and $\alpha\beta5$ Integrin Expression in Glioma Periphery. *Neurosurgery* **2001**, *49* (2), 380–390.
- (128) Brooks, P. C.; Strömblad, S.; Klemke, R.; Visscher, D.; Sarkar, F. H.; Cheresch, D. A. Antiintegrin Alpha v Beta 3 Blocks Human Breast Cancer Growth and Angiogenesis in Human Skin. *J. Clin. Invest.* **1995**, *96* (4), 1815–1822.
- (129) Jin, H.; Varner, J. Integrins: Roles in Cancer Development and as Treatment Targets. *Br. J. Cancer* **2004**, *90* (3), 561–565.
- (130) Dijkgraaf, I.; Terry, S. Y. A.; McBride, W. J.; Goldenberg, D. M.; Laverman, P.; Franssen, G. M.; Oyen, W. J. G.; Boerman, O. C. Imaging Integrin Alpha-v-Beta-3 Expression in Tumors with an ¹⁸F-Labeled Dimeric RGD Peptide. *Contrast Media Mol. Imaging* **2013**, *8* (3), 238–245.

- (131) Li, Z.; Cai, W.; Cao, Q.; Chen, K.; Wu, Z.; He, L.; Chen, X. ^{64}Cu -Labeled Tetrameric and Octameric RGD Peptides for Small-Animal PET of Tumor $\text{Av}\beta 3$ Integrin Expression. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48* (7), 1162–1171.
- (132) Shi, J.; Kim, Y.-S.; Zhai, S.; Liu, Z.; Chen, X.; Liu, S. Improving Tumor Uptake and Pharmacokinetics of ^{64}Cu -Labeled Cyclic RGD Peptide Dimers with Gly3 and PEG4 Linkers. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20* (4), 750–759.
- (133) Ghosh, A.; Heston, W. D. W. Tumor Target Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA) and Its Regulation in Prostate Cancer. *J. Cell. Biochem.* **2004**, *91* (3), 528–539.
- (134) Schwenck, J.; Rempp, H.; Reischl, G.; Kruck, S.; Stenzl, A.; Nikolaou, K.; Pfannenber, C.; la Fougère, C. Comparison of ^{68}Ga -Labelled PSMA-11 and ^{11}C -Choline in the Detection of Prostate Cancer Metastases by PET/CT. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2017**, *44* (1), 92–101.
- (135) Calais, J.; Fendler, W. P.; Herrmann, K.; Eiber, M.; Ceci, F. Comparison of ^{68}Ga -PSMA-11 and ^{18}F -Fluciclovine PET/CT in a Case Series of 10 Patients with Prostate Cancer Recurrence. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (5), 789–794.
- (136) Afshar-Oromieh, A.; Zechmann, C. M.; Malcher, A.; Eder, M.; Eisenhut, M.; Linhart, H. G.; Holland-Letz, T.; Hadaschik, B. A.; Giesel, F. L.; Debus, J.; et al. Comparison of PET Imaging with a ^{68}Ga -Labelled PSMA Ligand and ^{18}F -Choline-Based PET/CT for the Diagnosis of Recurrent Prostate Cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2014**, *41* (1), 11–20.
- (137) Mix, M.; Reichel, K.; Stoykow, C.; Bartholomä, M.; Drendel, V.; Gourni, E.; Wetterauer, U.; Schultze-Seemann, W.; Meyer, P. T.; Jilg, C. A. Performance of ^{111}In -Labelled PSMA Ligand in Patients with Nodal Metastatic Prostate Cancer: Correlation between Tracer Uptake and Histopathology from Lymphadenectomy. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2018**, *45* (12), 2062–2070.
- (138) Grubmüller, B.; Baum, R. P.; Capasso, E.; Singh, A.; Ahmadi, Y.; Knoll, P.; Floth, A.; Righi, S.; Zandieh, S.; Meleddu, C.; et al. ^{64}Cu -PSMA-617 PET/CT Imaging of Prostate Adenocarcinoma: First In-Human Studies. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2016**, *31* (8), 277–286.
- (139) Cantiello, F.; Gangemi, V.; Cascini, G. L.; Calabria, F.; Moschini, M.; Ferro, M.; Musi, G.; Butticiè, S.; Salonia, A.; Briganti, A.; et al. Diagnostic Accuracy of Copper-64 Prostate-Specific Membrane Antigen Positron Emission Tomography/Computed Tomography for Primary Lymph Node Staging of Intermediate- to High-Risk Prostate Cancer: Our Preliminary Experience. *Urology* **2017**, *106*, 139–145.
- (140) Haffner, M. C.; Kronberger, I. E.; Ross, J. S.; Sheehan, C. E.; Zitt, M.; Mühlmann, G.; Öfner, D.; Zelger, B.; Ensinger, C.; Yang, X. J.; et al. Prostate-Specific Membrane Antigen Expression in the Neovasculature of Gastric and Colorectal Cancers. *Human Pathology* **2009**, *40* (12), 1754–1761.
- (141) Qin, C.; Liu, H.; Chen, K.; Hu, X.; Ma, X.; Lan, X.; Zhang, Y.; Cheng, Z. Theranostics of Malignant Melanoma with $^{64}\text{CuCl}_2$. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55* (5), 812–817.
- (142) Panichelli, P.; Villano, C.; Cistaro, A.; Bruno, A.; Barbato, F.; Piccardo, A.; Duatti, A. Imaging of Brain Tumors with Copper-64 Chloride: Early Experience and Results. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2016**, *31* (5), 159–167.
- (143) Peng, F.; Lu, X.; Janisse, J.; Muzik, O.; Shields, A. F. PET of Human Prostate Cancer Xenografts in Mice with Increased Uptake of $^{64}\text{CuCl}_2$. *J. Nucl. Med.* **2006**, *47* (10), 1649–1652.

- (144) Lee, J.; Prohaska, J. R.; Dagenais, S. L.; Glover, T. W.; Thiele, D. J. Isolation of a Murine Copper Transporter Gene, Tissue Specific Expression and Functional Complementation of a Yeast Copper Transport Mutant. *Gene* **2000**, *254* (1–2), 87–96.
- (145) Piccardo, A.; Paparo, F.; Puntoni, M.; Righi, S.; Bottoni, G.; Bacigalupo, L.; Zanardi, S.; DeCensi, A.; Ferrarazzo, G.; Gambaro, M.; et al. $^{64}\text{CuCl}_2$ PET/CT in Prostate Cancer Relapse. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (3), 444–451.
- (146) Palumbo, A.; Anderson, K. Multiple Myeloma. *N. Eng. J. Med.* **2011**, *364* (11), 1046–1060.
- (147) Kuehl, W. M.; Bergsagel, P. L. Multiple Myeloma: Evolving Genetic Events and Host Interactions. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2* (3), 175–187.
- (148) Kyle, R. A.; Rajkumar, S. V. Criteria for Diagnosis, Staging, Risk Stratification and Response Assessment of Multiple Myeloma. *Leukemia* **2009**, *23* (1), 3–9.
- (149) Rajkumar, S. V.; Dimopoulos, M. A.; Palumbo, A.; Blade, J.; Merlini, G.; Mateos, M.-V.; Kumar, S.; Hillengass, J.; Kastiris, E.; Richardson, P.; et al. International Myeloma Working Group Updated Criteria for the Diagnosis of Multiple Myeloma. *The Lancet Oncology* **2014**, *15* (12), e538–e548.
- (150) Azaïs, I.; Debais, F. Imagerie des lésions osseuses du myélome. *Revue du Rhumatisme Monographies* **2017**, *84* (2), 187–195.
- (151) Dimopoulos, M. A.; Hillengass, J.; Usmani, S.; Zamagni, E.; Lentzsch, S.; Davies, F. E.; Rajee, N.; Sezer, O.; Zweegman, S.; Shah, J.; et al. Role of Magnetic Resonance Imaging in the Management of Patients With Multiple Myeloma: A Consensus Statement. *J. Clin. Onc.* **2015**, *33* (6), 657–664.
- (152) Mileshkin, L.; Blum, R.; Seymour, J. F.; Patrikeos, A.; Hicks, R. J.; Prince, H. M. A Comparison of Fluorine-18 Fluoro-Deoxyglucose PET and Technetium-99m Sestamibi in Assessing Patients with Multiple Myeloma. *Eur. J. Hematol.* **2004**, *72* (1), 32–37.
- (153) Rajkumar, S. V. Multiple Myeloma: 2016 Update on Diagnosis, Risk-Stratification and Management. *Am. J. Hematol* **2016**, *91* (7), 719–734.
- (154) Kumar, A.; Loughran, T.; Alsina, M.; Durie, B. G. M.; Djulbegovic, B. Management of Multiple Myeloma: A Systematic Review and Critical Appraisal of Published Studies. *Lancet Oncol.* **2003**, *4* (5), 293–304.
- (155) Jamet, B.; Bailly, C.; Carlier, T.; Touzeau, C.; Nanni, C.; Zamagni, E.; Barré, L.; Michaud, A.-V.; Chérel, M.; Moreau, P.; et al. Interest of Pet Imaging in Multiple Myeloma. *Front. Med. (Lausanne)* **2019**, *6*.
- (156) Weng, W.-W.; Dong, M.-J.; Zhang, J.; Yang, J.; Xu, Q.; Zhu, Y.-J.; Liu, N.-H. A Systematic Review of MRI, Scintigraphy, FDG-PET and PET/CT for Diagnosis of Multiple Myeloma Related Bone Disease-- Which Is Best? *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, *15* (22), 9879–9884.
- (157) Lu, Y.-Y.; Chen, J.-H.; Lin, W.-Y.; Liang, J.-A.; Wang, H.-Y.; Tsai, S.-C.; Kao, C.-H. FDG PET or PET/CT for Detecting Intramedullary and Extramedullary Lesions in Multiple Myeloma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin. Nucl. Med* **2012**, *37* (9), 833–837.
- (158) Moreau, P.; Attal, M.; Caillot, D.; Macro, M.; Karlin, L.; Garderet, L.; Facon, T.; Benboubker, L.; Escoffre-Barbe, M.; Stoppa, A.-M.; et al. Prospective Evaluation of Magnetic Resonance Imaging and [^{18}F]Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography-Computed Tomography at Diagnosis and

Before Maintenance Therapy in Symptomatic Patients With Multiple Myeloma Included in the IFM/DFCI 2009 Trial: Results of the IMAJEM Study. *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35* (25), 2911–2918.

(159) Bredella, M. A.; Steinbach, L.; Caputo, G.; Segall, G.; Hawkins, R. Value of FDG PET in the Assessment of Patients with Multiple Myeloma. *Am. J. Roentgenol.* **2005**, *184* (4), 1199–1204.

(160) Agarwal, A.; Chirindel, A.; Shah, B. A.; Subramaniam, R. M. Evolving Role of FDG PET/CT in Multiple Myeloma Imaging and Management. *Am. J. Roentgenol.* **2013**, *200* (4), 884–890.

(161) Brioli, A.; Melchor, L.; Cavo, M.; Morgan, G. J. The Impact of Intra-Clonal Heterogeneity on the Treatment of Multiple Myeloma. *Br. J. Haemat.* **2014**, *165* (4), 441–454.

(162) Rasche, L.; Angtuaco, E.; McDonald, J. E.; Buros, A.; Stein, C.; Pawlyn, C.; Thanendrarajan, S.; Schinke, C.; Samant, R.; Yaccoby, S.; et al. Low Expression of Hexokinase-2 Is Associated with False-Negative FDG-Positron Emission Tomography in Multiple Myeloma. *Blood* **2017**, *130* (1), 30–34.

(163) Wester, H. J.; Keller, U.; Schottelius, M.; Beer, A.; Philipp-Abbrederis, K.; Hoffmann, F.; Šimeček, J.; Gerngross, C.; Lassmann, M.; Herrmann, K.; et al. Disclosing the CXCR4 Expression in Lymphoproliferative Diseases by Targeted Molecular Imaging. *Theranostics* **2015**, *5* (6), 618–630.

(164) Lapa, C.; Schreder, M.; Schirbel, A.; Samnick, S.; Kortüm, K. M.; Herrmann, K.; Kropf, S.; Einsele, H.; Buck, A. K.; Wester, H.-J.; et al. [⁶⁸Ga]Pentixafor-PET/CT for Imaging of Chemokine Receptor CXCR4 Expression in Multiple Myeloma - Comparison to [¹⁸F]FDG and Laboratory Values. *Theranostics* **2017**, *7* (1), 205–212.

(165) Sanderson, R. D.; Yang, Y. Syndecan-1: A Dynamic Regulator of the Myeloma Microenvironment. *Clin. Exp. Metastasis* **2008**, *25* (2), 149–159.

(166) Witzig, T. E.; Kimlinger, T.; Stenson, M.; Therneau, T. Syndecan-1 Expression on Malignant Cells from the Blood and Marrow of Patients with Plasma Cell Proliferative Disorders and B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leuk. Lymphoma* **1998**, *31* (1–2), 167–175.

(167) Heffner, L. T.; Jagannath, S.; Zimmerman, T. M.; Lee, K. P.; Rosenblatt, J.; Lonial, S.; Lutz, R. J.; Czeloth, N.; Osterroth, F.; Ruehle, M.; et al. BT062, an Antibody-Drug Conjugate Directed Against CD138, Given Weekly for 3 Weeks in Each 4 Week Cycle: Safety and Further Evidence of Clinical Activity. *Blood* **2012**, *120* (21), 4042–4042.

(168) Kelly, K. R.; Siegel, D. S.; Chanan-Khan, A. A.; Somlo, G.; Heffner, L. T.; Jagannath, S.; Zimmerman, T.; Munshi, N. C.; Madan, S.; Mohrbacher, A.; et al. Indatuximab Ravtansine (BT062) in Combination with Low-Dose Dexamethasone and Lenalidomide or Pomalidomide: Clinical Activity in Patients with Relapsed / Refractory Multiple Myeloma. *Blood* **2016**, *128* (22), 4486–4486.

(169) Bailly, C.; Gouard, S.; Lacombe, M.; Saëc, P. R.-L.; Chalopin, B.; Bourgeois, M.; Chouin, N.; Tripier, R.; Halime, Z.; Haddad, F.; et al. Comparison of Immuno-PET of CD138 and PET Imaging with ⁶⁴CuCl₂ and ¹⁸F-FDG in a Preclinical Syngeneic Model of Multiple Myeloma. *Oncotarget* **2018**, *9* (10).

(170) Fichou, N.; Gouard, S.; Maurel, C.; Barbet, J.; Ferrer, L.; Morgenstern, A.; Bruchertseifer, F.; Faivre-Chauvet, A.; Bigot-Corbel, E.; Davodeau, F.; et al. Single-Dose Anti-CD138 Radioimmunotherapy: Bismuth-213 Is More Efficient than Lutetium-177 for Treatment of Multiple Myeloma in a Preclinical Model. *Front. Med.* **2015**, *2*.

(171) Lima, L. M. P.; Esteban-Gómez, D.; Delgado, R.; Platas-Iglesias, C.; Tripier, R. Monopicolinate Cyclen and Cyclam Derivatives for Stable Copper(II) Complexation. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (12), 6916–6927.

- (172) Frindel, M.; Camus, N.; Rauscher, A.; Bourgeois, M.; Alliot, C.; Barre, L.; Gestin, J.-F.; Tripier, R.; Faivre-Chauvet, A. Radiolabeling of HTE1PA: A New Monopicolinate Cyclam Derivative for Cu-64 Phenotypic Imaging. In Vitro and in Vivo Stability Studies in Mice. *Nucl. Med. Biol.* **2014**, *41 Suppl*, e49-57.
- (173) Frindel, M.; Le Saëc, P.; Beyler, M.; Navarro, A.-S.; Saï-Maurel, C.; Alliot, C.; Chérel, M.; Gestin, J.-F.; Faivre-Chauvet, A.; Tripier, R. Cyclam Te1pa for ⁶⁴Cu PET Imaging. Bioconjugation to Antibody, Radiolabeling and Preclinical Application in Xenografted Colorectal Cancer. *RSC Advances* **2017**, *7* (15), 9272–9283.
- (174) Le Bihan, T.; Navarro, A.-S.; Le Bris, N.; Le Saec, P.; Gouard, S.; Haddad, F.; Gestin, J.-F.; Chérel, M.; Faivre-Chauvet, A.; Tripier, R. Synthesis of C-Functionalized TE1PA and Comparison with Its Analogues. An Example of Bioconjugation on 9E7.4 MAb for Multiple Myeloma ⁶⁴Cu-PET Imaging. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (23), 4261–4271.
- (175) Sun, H.; England, C. G.; Hernandez, R.; Graves, S. A.; Majewski, R. L.; Kamkaew, A.; Jiang, D.; Barnhart, T. E.; Yang, Y.; Cai, W. ImmunoPET for Assessing the Differential Uptake of a CD146-Specific Monoclonal Antibody in Lung Cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2016**, *43* (12), 2169–2179.
- (176) Li, L.; Bading, J.; Yazaki, P. J.; Ahuja, A. H.; Crow, D.; Colcher, D.; Williams, L. E.; Wong, J. Y. C.; Raubitschek, A.; Shively, J. E. A Versatile Bifunctional Chelate for Radiolabeling Humanized Anti-CEA Antibody with In-111 and Cu-64 at Either Thiol or Amino Groups: PET Imaging of CEA-Positive Tumors with Whole Antibodies. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19* (1), 89–96.
- (177) Radl, J.; Croese, J. W.; Zurcher, C.; Van den Enden-Vieveen, M. H.; de Leeuw, A. M. Animal Model of Human Disease. Multiple Myeloma. *Am. J. Pathol.* **1988**, *132* (3), 593–597.

Vu, le Président du jury,

Alain FAIVRE-CHAUVET

Vu, le Directeur de thèse,

Marie DEGRAEF

Vu, le Directeur de l'UFR,

Nom – Prénom : NAVARRO Anne-Sophie

Titre de la thèse : Développement de nouveaux radiopharmaceutiques à base de cuivre-64 pour application théranostique en cancérologie

Résumé de la thèse : La tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie primordiale en médecine nucléaire, tout particulièrement dans le domaine de la cancérologie. L'immuno-TEP, qui cible les cellules en fonction de leur expression phénotypique, est un des axes majeurs de recherche pour améliorer le diagnostic et le suivi de certaines maladies. Parmi les isotopes pouvant être utilisés, le ^{64}Cu possède des propriétés intéressantes et permet d'envisager une approche combinée de diagnostic et de thérapie pour adapter au mieux le traitement à chaque patient. Afin de pouvoir développer un radiopharmaceutique contenant du ^{64}Cu , il est nécessaire d'utiliser un ligand bifonctionnel, servant à complexer le cuivre et à assurer la liaison à la molécule vectrice. Ce travail est une étude comparative *in vitro* de plusieurs ligands commerciaux azamacrocycles du cuivre ainsi que d'un ligand original, le TE1PA. Ces ligands ont été couplés à l'anticorps monoclonal 9E7.4, ciblant le CD138 qui est un marqueur d'intérêt pour le diagnostic du myélome multiple. Les résultats ont montré la supériorité *in vitro* du ligand TE1PA dans ce modèle par rapport à ses équivalents commerciaux, en termes de nombre de ligands greffés par anticorps et d'immunoréactivité. Le TE1PA a donc validé son utilité comme ligand potentiel pour le ^{64}Cu dans le cadre de l'immuno-TEP.

MOTS CLÉS

Immuno-TEP, cuivre-64, myélome multiple, ligand bifonctionnel

JURY

PRÉSIDENT : M Alain FAIVRE-CHAUVET, Professeur de Biophysique à l'Université de Nantes et Praticien Hospitalier au CHU de Nantes

ASSESEURS : Mme Marie DEGRAEF, Maître de Conférence de Biophysique à l'Université de Nantes et Praticien Hospitalier au CHU de Nantes

Mme Nathalie LE BRIS, Maître de Conférence Habilitée à Diriger la Recherche de Chimie à l'Université de Brest

Adresse de l'auteur : 8 rue Auguste Brizeux 44 000 Nantes