

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605  
*Biologie Santé*  
Spécialité : *Médecine Nucléaire et Radiopharmaceutiques*

Par

**Anne-Sophie NAVARRO**

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

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 3 février 2020

Unité de recherche : UMR Inserm 1232, CRCINA

Thèse N° :

### **Rapporteurs avant soutenance :**

Jean-Michel Chezal      Professeur des Universités – Université Clermont-Auvergne  
Cécile Perrio              Directeur de Recherche – CNRS (Caen)

### **Composition du Jury :**

Président :	Sophie Lancelot	Maître de Conférence Universitaire / Praticien Hospitalier – Université Lyon I
Examineurs :	Jean-Michel Chezal	Professeur des Universités – Université Clermont-Auvergne
	Cécile Perrio	Directeur de Recherche – CNRS (Caen)
Dir. de thèse :	Alain Faivre-Chauvet	Professeur des Universités, Praticien Hospitalier – CHU de Nantes
Co-dir. de thèse :	Raphaël Tripier	Professeur des Universités – Université de Brest



## REMERCIEMENTS

---

Je souhaite adresser mes plus sincères remerciements :

**À Madame la Docteur Cécile PERRIO et Monsieur le Professeur Jean-Michel CHEZAL**, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs de cette thèse.

**À Madame la Docteur Sophie LANCELOT**, pour sa participation à mon jury de thèse et à qui j'adresse ma profonde gratitude.

**À Monsieur le Professeur Alain FAIVRE-CHAUVET**, mon directeur et encadrant de thèse. Je te remercie infiniment Alain pour tes conseils, ta disponibilité, et surtout ta patience et ta compréhension, qui m'ont aidée et guidée tout au long de cette thèse qui n'aurait jamais abouti sans ton soutien.

**À Monsieur le Professeur Raphaël TRIPIER**, pour avoir accepté de co-encadrer cette thèse. Merci Raphaël pour ton implication, tes retours et ta grande réactivité, qui ont notamment été d'une grande aide pour l'élaboration des articles recueillant notre travail commun. Je tiens également à remercier **Madame le Docteur Nathalie LE BRIS** et **Monsieur le Docteur Thomas LE BIHAN** pour leur aide.

**À Madame le Professeur Françoise KRAEBER-BODERE et Monsieur le Professeur Michel CHÉREL**, directeurs de l'équipe 13 du CRCINA dans laquelle j'ai réalisé ma thèse.

**À Madame Patricia LE SAËC**, pour m'avoir formée aux manipulations, pour sa disponibilité, son immense gentillesse et sa bonne humeur. Ton soutien m'a été inestimable et je te remercie du fond du cœur pour tout.

**À Madame Catherine SAÏ-MAUREL**, qui m'a aidée à réaliser les expérimentations animales. Sa gentillesse, sa disponibilité et son expertise ont été très précieuses. Je remercie également **Madame le Docteur Séverine MARIONNEAU-LAMBOT** pour son aide apportée dans ce domaine et notamment pour les images réalisées.

À mes camarades de laboratoire, et tout particulièrement **Romain EYSCHENNE**, **Marion BERDAL**, **Laurent NAVARRO** et **François GUERARD**. Merci à la « team chimie » pour

sa bonne humeur permanente, son calme et sa positivité, ainsi que pour l'aide apportée à ce travail.

À l'ensemble de **l'équipe 13 du CRCINA** pour m'avoir accueillie. Je tiens à remercier en particulier **Marie DEGRAEF**, ma voisine de bureau, pour son infinie gentillesse, ainsi que **Latifa RBAH-VIDAL** pour son soutien.

**À l'équipe COSM de Brest**, pour avoir synthétisé et fourni le TE1PA et le NCS-TE1PA.

**À mes amis nantais**, Morgane, Guillaume, Adélaïde, Alexia, Ludovic, Christine, Marion ; merci d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenue tout au long de ces années.

**À mes parents, à ma sœur et à mon frère**, toujours prêts à m'aider et me soutenir malgré la distance, pour m'avoir aidée à tenir le coup malgré les difficultés.

Je dédie enfin cette thèse à **Malo**, mon plus fidèle soutien.

# SOMMAIRE

---

<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>12</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>17</b>
<b>PREMIÈRE PARTIE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>19</b>
<b>I. LA TOMOGRAPHIE PAR ÉMISSION DE POSITON ET L'IMAGERIE PHÉNOTYPIQUE</b> .....	<b>20</b>
1. Définitions.....	20
2. Principe de fonctionnement.....	20
2.1. Stratégies de ciblage .....	20
2.2. Détection du rayonnement émis .....	21
3. Applications et limitations de la TEP métabolique .....	23
3.1. Intérêts.....	23
a. En oncologie.....	23
b. Autres applications .....	24
3.2. Limitations du <sup>18</sup> F-FDG et des vecteurs métaboliques en oncologie .....	24
4. Place de l'immuno-TEP .....	25
4.1. Intérêts de l'immuno-TEP .....	25
a. Intérêt dans le cadre de la médecine de précision.....	25
b. Intérêt dans le cadre de la radioimmunothérapie .....	27
4.2. Importance de la cible .....	27
4.3. Importance du vecteur .....	28
a. Généralités .....	28
b. Anticorps entiers.....	29
c. Fragments et dérivés d'anticorps .....	30
d. Vecteurs non dérivés d'anticorps.....	31
4.4. Émetteurs β <sup>+</sup> .....	32
a. Caractéristiques recherchées.....	32
b. Principaux émetteurs β <sup>+</sup> utilisables en immuno-TEP .....	32
<b>II. LE CUIVRE-64</b> .....	<b>35</b>
1. Propriétés .....	35
1.1. Chimiques .....	35
1.2. Physiques .....	36
2. Méthodes de production du cuivre-64 pour les applications en recherche et en clinique.....	37
2.1. Section efficace .....	37
2.2. Production en réacteur .....	37
2.3. Production en cyclotron.....	38
a. Méthode utilisant des protons.....	38
b. Méthode utilisant des deutons .....	39
3. Problématiques inhérentes à la production de cuivre-64 .....	41
4. Métabolisme du cuivre chez l'homme .....	42
4.1. Rôle physiologique.....	42
4.2. Homéostasie du cuivre .....	44
a. Apports.....	44
b. Absorption et distribution sanguine .....	44
c. Métabolisme hépatique .....	44
d. Devenir post-hépatique : la céruléoplasmine .....	45
5. Complexation du cuivre-64.....	46
5.1. Définition d'un ligand.....	46
5.2. Caractéristiques recherchées d'un ligand du cuivre .....	47

a. Stabilité thermodynamique .....	47
b. Inertie cinétique .....	48
c. Sélectivité du ligand pour le cuivre.....	49
d. Cinétique de complexation .....	49
5.3. Paramètres influençant la stabilité <i>in vivo</i> des complexes.....	50
a. Résistance à la transchélation .....	50
b. Résistance à la réduction .....	51
c. Résistance à la transmétallation.....	51
5.4. Fonctions de couplage à un vecteur .....	51
a. Généralités sur la fonctionnalisation des ligands.....	51
b. Approches conventionnelles .....	52
c. Approches « chimie click » .....	54
5.5. Exemples de ligands du cuivre-64.....	55
a. Ligands acycliques .....	55
b. Ligands azamacrocycliques .....	57
c. Ligands dérivés du triaminocyclohexane.....	59
d. Ligands type sarcophagine .....	59
e. Ligands pontés du cyclam et du cyclen .....	60
6. Exemples d'applications en clinique et pré-clinique .....	61
6.1. Anticorps monoclonaux et peptides .....	61
a. Trastuzumab .....	61
b. Cétuximab .....	62
c. Daratumumab .....	63
6.2. Analogues des récepteurs à la somatostatine .....	63
6.3. Peptides ciblant les intégrines .....	64
6.4. PSMA.....	64
6.5. Chlorure de cuivre-64 .....	65
III. UN MODÈLE POUR L'ÉTUDE DU MYÉLOME MULTIPLE : L'ANTICORPS 9E7.4 .....	66
1. <i>Le myélome multiple</i> .....	66
1.1. Physiopathologie et épidémiologie.....	66
1.2. Classification et manifestations cliniques .....	66
1.3. Diagnostic .....	67
1.4. Prise en charge thérapeutique.....	68
1.5. Place de l'immuno-TEP dans la prise en charge du myélome multiple.....	69
2. <i>L'anticorps monoclonal 9E7.4</i> .....	70
2.1. Cible de l'anticorps.....	70
2.2. Production et propriétés.....	71
3. <i>Radiomarquage de l'anticorps 9E7.4</i> .....	71
IV. CONCLUSION .....	73
<b>DEUXIÈME PARTIE : EXPÉRIMENTATION <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>75</b>
I. INTRODUCTION .....	76
1. <i>Présentation des ligands picolinates</i> .....	76
2. <i>Objectifs de l'étude in vitro</i> .....	79
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	81
1. <i>Matériel</i> .....	81
1.1. Produits chimiques .....	81
1.2. Anticorps 9E7.4 et ligands.....	81
1.3. Système chromatographique.....	81
1.4. Isotopes radioactifs.....	81
2. <i>Couplage</i> .....	82
2.1. Préparation de l'AcM .....	82
2.2. NHS-DOTA, NCS-DOTA, NCS-NOTA, NHS-NODA-GA et NCS-TE1PA .....	83
2.3. TE1PA non fonctionnalisé .....	83
3. <i>Purification des immunoconjugués</i> .....	83
4. <i>Radiomarquages</i> .....	84
4.1. Radiomarquage au cuivre-64 .....	84

4.2. Radiomarquage à l'iode-125 .....	85
4.3. Purification des radioimmunoconjugués .....	85
4.4. Évaluation de l'immunoréactivité .....	86
<b>III. RÉSULTATS .....</b>	<b>87</b>
1. <i>Mise au point du couplage et du marquage du NCS-TE1PA</i> .....	87
1.1. Caractérisation de l'AcM 9E7.4 non modifié.....	87
1.2. Résultats obtenus avec le TE1PA non fonctionnalisé.....	88
1.3. Mise au point du couplage du NCS-TE1PA.....	90
2. <i>Sélection d'un ligand commercial pour l'étude comparative</i> .....	93
2.1. Le NCS-DOTA.....	93
2.2. NCS-NOTA .....	94
2.3. NHS-DOTA.....	94
3. <i>Récapitulatif des résultats obtenus pour les couplages des ligands azamacrocycliques au 9E7.4</i> .....	96
4. <i>Activité spécifique molaire</i> .....	97
<b>IV. DISCUSSION .....</b>	<b>98</b>
<b>TROISIÈME PARTIE : EXPÉRIMENTATION <i>IN VIVO</i>.....</b>	<b>103</b>
I. INTRODUCTION .....	104
II. MATÉRIEL ET MÉTHODE .....	105
1. <i>Produits utilisés</i> .....	105
2. <i>Radioimmunoconjugués</i> .....	105
3. <i>Modèle animal</i> .....	105
4. <i>Étude de biodistribution</i> .....	106
5. <i>Étude de métabolisme</i> .....	106
6. <i>Étude d'imagerie</i> .....	107
7. <i>Analyse statistique</i> .....	107
III. RÉSULTATS .....	108
1. <i>Caractérisation des radioimmunoconjugués</i> .....	108
2. <i>Étude de biodistribution</i> .....	108
3. <i>Étude métabolique au niveau hépatique</i> .....	113
4. <i>Étude d'imagerie</i> .....	115
IV. DISCUSSION .....	117
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>121</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>125</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>147</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

AcM : Anticorps Monoclonal

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

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

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

ATSM : Diacetyl-2,3-*bis*(*N*<sup>4</sup>-methyl-3-thiosemicarbazone)

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

BSA : Bovine Serum Albumin

CB : Cross-Bridge

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CCO : Cytochrome C Oxydase

CCS : Copper Chaperon for Superoxyde dismutase

CD : Cluster de Différentiation

CDR : Complementarity Determining Region

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

COX : Cyclooxygénase

CRCINA : Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes Angers

Ctr1 : High affinity copper uptake protein 1

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

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

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EPP : Electrophorèse des Protéines Plasmatiques

éq. : Equivalent

ESH : Electrode Standard à Hydrogène

FDG : Fluorodésoxyglucose

HER2 : Human Epidermal Growth factor Receptor-2

ICP-OES : Inductively coupled plasma mass spectrometry

Ig : Immunoglobuline

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

ITLC-SG : Instant Thin Layer Chromatography Silica Gel

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

MET : L-[methyl-<sup>11</sup>C]methionine

MGUS : Monoclonal Gammopathy of Uncertain Significance

MM : Myélome Multiple

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

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

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

SATA : *N*-succinimide *S*-acétylthioacétate

SNHS : *N*-hydroxysulfosuccinimide

SOD : Superoxyde dismutase

SPAAC : Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition

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

TACN : 1,4,7-triazacyclononane

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

TEP : Tomographie par Emission de Positons

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

TDM : Tomodensitométrie

THPTA : Tris(hydroxypropyltriazolyl)methylamine

Tr : Temps de rétention

UMR : Unité Mixte de Recherche

UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography

Y3-OC : Tyr<sup>3</sup>-octréotide

Y3-TATE : Tyr<sup>3</sup>-octréotate

## LISTE DES FIGURES

---

**Figure 1 :** Représentation schématique du principe de détection du rayonnement dans le cadre de l'imagerie TEP.

**Figure 2 :** Représentation schématique d'une IgG ; les chaînes légères sont notées « L » (pour *light*), les chaînes lourdes « H » (pour *heavy*), les fragments variables « V » et les fragments constants « C ».

**Figure 3 :** Représentation schématique de divers fragments et dérivés d'anticorps.

**Figure 4 :** Exemple de complexation du Cu(II) avec l'EDTA : représentation schématique (à gauche) et photo du produit sous forme de poudre.

**Figure 5 :** Représentation schématique de la décroissance du cuivre-64.

**Figure 6 :** Représentation simplifiée du trajet d'une particule au sein d'un cyclotron.

**Figure 7 :** Comparaison entre les sections efficaces de production du  $^{64}\text{Cu}$  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).

**Figure 8 :** Photographie d'une cible de  $^{64}\text{Ni}$  sur son support en or utilisée pour la production de  $^{64}\text{Cu}$ .

**Figure 9 :** Représentation schématique de quelques fonctions de couplage conventionnelles ; R représentant le ligand portant la fonction.

**Figure 10 :** 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.

**Figure 11 :** 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.

**Figure 12 :** Représentation schématique de la réaction SPAAC avec l'exemple du DBCO **(a)** et de la cycloaddition retro-Diels-Alder **(b)**.

**Figure 13 :** Représentation schématique des ligands acycliques EDTA, DTPA, SALEN, diphosphine, ATSM et PTSM.

**Figure 14** : Représentation schématique des bases cyclam et cyclen, ainsi que des ligands DOTA, NOTA et TETA.

**Figure 15** : Représentation schématique des ligands tachpyr et sarcophagine.

**Figure 16** : Représentation schématique de ligands *cross-bridge*.

**Figure 17** : Représentation simplifiée des ligands DO1PA et TE1PA.

**Figure 18** : Schéma de la structure tridimensionnelle du complexe [Cu-TE1PA]<sup>+</sup>.

**Figure 19** : Les ligands utilisés lors de l'étude *in vitro*.

**Figure 20** : Chromatogramme UPLC de l'AcM 9E7.4 non modifié.

**Figure 21** : Chromatogrammes obtenus par UPLC pour l'épratuzumab-TE1PA couplé avec 500, 700 et 1000 éq.

**Figure 22** : Chromatogramme obtenu par UPLC pour le 9E7.4-NCS-TE1PA.

**Figure 23** : Radiochromatogrammes obtenus pour les radiomarquages du 9E7.4-NCS-TE1PA avec 1 éq. de <sup>64</sup>Cu (lane #2), 2 éq. de <sup>64</sup>Cu (lane #3), 5 éq. de <sup>64</sup>Cu (lane #4), 10 éq. de <sup>64</sup>Cu (lane #5) et 20 éq. de <sup>64</sup>Cu (lane #6). La lane #1 représente le témoin <sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub> libre (non radiomarké).

**Figure 24** : Chromatogrammes UPLC obtenus pour le 9E7.4-NCS-DOTA.

**Figure 25** : Chromatogramme UPLC obtenu pour le 9E7.4-NCS-NOTA.

**Figure 26** : Chrommatogramme UPLC obtenu pour le 9E7.4-NHS-DOTA.

**Figure 27** : Chrommatogramme UPLC obtenu pour le 9E7.4-NHS-NODA-GA.

**Figure 28a** : Biodistribution du <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NCS-TE1PA et du <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA exprimée en %DI/g d'organe à 2 h post-injection.

**Figure 28b** : Biodistribution du <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NCS-TE1PA et du <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA exprimée en %DI/g d'organe à 24 h post-injection.

**Figure 28c** : Biodistribution du <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NCS-TE1PA, du <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA et du <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NCS-NOTA exprimée en %DI/g d'organe à 48 h post-injection.

**Figure 29** : Chromatogramme des extraits hépatiques des souris sacrifiées à 2 h, 24 h et 48 h après injection pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA et le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité totale.

**Figure 30** : Images TEP-scan des souris greffées en sous-cutané avec les cellules 5T33, à 2 h, 24 h et 48 h après injection du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA (rang du haut), du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA (rang du milieu) et du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-NOTA (rang du bas). Les flèches jaunes pointent les tumeurs.

## LISTE DES TABLEAUX

---

**Tableau 1** : Caractéristiques des principaux émetteurs  $\beta^+$  utilisables pour la TEP.

**Tableau 2** : Exemples de protéines dépendantes du cuivre, de leurs fonctions physiologiques et des troubles associés à un déficit en ces protéines.

**Tableau 3** : Quelques propriétés chimiques des complexes Cu-DOTA, Cu-TETA et Cu-NOTA.

**Tableau 4** : Résultats obtenus pour les radiomarquages de l'épratuzumab-TE1PA pour les couplages ayant utilisé 500 éq. (n = 4), 700 éq. (n = 2) et 1000 éq. (n = 2) de ligands pour 1 éq. d'AcM.

**Tableau 5** : Nombre de ligands couplés par AcM pour l'épratuzumab-NCS-TE1PA et le 9E7.4-NCS-TE1PA, lors de couplages réalisés avec 10, 20 et 50 eq. molaires de ligands.

**Tableau 6** : Récapitulatif des résultats obtenus pour les différents couplages entre le NCS-DOTA et l'AcM 9E7.4.

**Tableau 7** : Nombre de ligands couplés par AcM 9E7.4, rendement de radiomarquage au  $^{64}\text{Cu}$  et immunoréactivité pour les immunoconjugués à base de TE1PA, NCS-TE1PA, NHS-DOTA, NCS-DOTA, NCS-NOTA et NHS-NODA-GA, ainsi que la charge globale des complexes radiomarqués.

**Tableau 8** : Caractéristiques des radioimmunoconjugués après radiomarquage au  $^{64}\text{Cu}$  (n = 4, excepté pour l'activité spécifique).

**Tableau 9** : %DI/g pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA à 2 h, 24 h et 48 h post-injection.

**Tableau 10** : %ID/g pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS DOTA à 2 h, 24 h et 48 h post-injection et pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-DOTA à 48 h post-injection.



## INTRODUCTION

---

Depuis son introduction en 1976, la tomographie par émission de positons (TEP) est rapidement devenue un outil indispensable dans le domaine de l'imagerie médicale. Les radiopharmaceutiques utilisés actuellement en TEP permettent de visualiser les organes et les tissus en fonction de leur métabolisme ou de leur phénotype. Cette technique d'imagerie apporte ainsi des informations diagnostiques et pronostiques de première importance qui ont révolutionnées l'approche de certaines maladies. Aujourd'hui, elle occupe une place de choix dans le dépistage et le suivi de pathologies sévères dans des domaines telles que la cancérologie, la neurologie ou la cardiologie.

Depuis le début des années 2000 et encore aujourd'hui, le radiopharmaceutique le plus utilisé pour la TEP est un analogue du glucose marqué au fluor-18. Cependant, l'essor de la TEP métabolique a permis le développement d'autres approches utilisant la détection par caméra TEP. L'imagerie phénotypique cible ainsi les cellules en fonction des marqueurs qu'elles expriment, selon le concept de reconnaissance ligand-récepteur. Pour cela, il est nécessaire de développer des molécules capables de se fixer spécifiquement sur les cellules cibles, puis d'y associer un traceur qui, dans le cadre de la médecine nucléaire, est un isotope radioactif. Parmi les radionucléides disponibles pour l'élaboration de radiopharmaceutiques, le cuivre-64 possède des propriétés intéressantes et a donc été choisi pour les études décrites dans ce manuscrit.

Pour pouvoir utiliser le cuivre-64 dans l'imagerie vectorisée, il est nécessaire d'utiliser un ligand bifonctionnel, qui pourra à la fois chélater le cuivre de façon stable et se fixer au vecteur par une liaison covalente. Plusieurs familles chimiques de ligands sont actuellement disponibles, la plus utilisée étant celle des dérivés azamacrocycles. Néanmoins, ces ligands présentent plusieurs inconvénients, notamment un manque de stabilité des complexes *in vivo*. Ce travail de thèse s'inscrit au sein d'un projet de développement de nouveaux ligands azamacrocycliques destinés à la complexation du cuivre-64 dans le cadre de l'imagerie phénotypique. L'objectif a été d'évaluer le plus prometteur d'entre eux, le TE1PA, dans un modèle *in vitro* et *in vivo* en le comparant à d'autres ligands azamacrocycliques commerciaux utilisés en études précliniques et/ou cliniques avec le cuivre-64.

La première partie de ce mémoire rappellera le principe de l'imagerie phénotypique TEP ainsi que la place du cuivre-64 au sein de cette technique, tout en détaillant les qualités attendues d'un ligand du cuivre pour l'élaboration d'un radiopharmaceutique. La deuxième partie sera consacrée à l'étude *in vitro* de deux versions du TE1PA (une non fonctionnalisée et une C-fonctionnalisée) et de quatre ligands commerciaux potentiellement utilisables pour l'imagerie phénotypique-TEP au cuivre-64. Les résultats obtenus ont permis de sélectionner les ligands les plus appropriés pour mener une étude comparative *in vivo* dans un modèle murin de greffe syngénique de myélome multiple, qui sera décrite dans la troisième partie. Cette étude mettra notamment en lumière la meilleure stabilité *in vivo* du TE1PA par rapport à ses homologues commerciaux.

---

**PREMIÈRE PARTIE : RAPPELS  
BIBLIOGRAPHIQUES**

---

# I. LA TOMOGRAPHIE PAR ÉMISSION DE POSITON ET L'IMAGERIE PHÉNOTYPIQUE

## 1. Définitions

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 non invasive et indirecte des positons (rayonnement  $\beta^+$ ) 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).

## 2. Principe de fonctionnement

### 2.1. Stratégies de ciblage

Actuellement, la détection des radiopharmaceutiques utilisés en clinique pour l'exploration TEP repose 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-( $^{18}\text{F}$ )fluoro-D-glucose ou fluorodésoxyglucose (FDG)<sup>1</sup>, 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-1<sup>2</sup>. 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 »<sup>3</sup>. Une fois internalisé, le  $^{18}\text{F}$ -

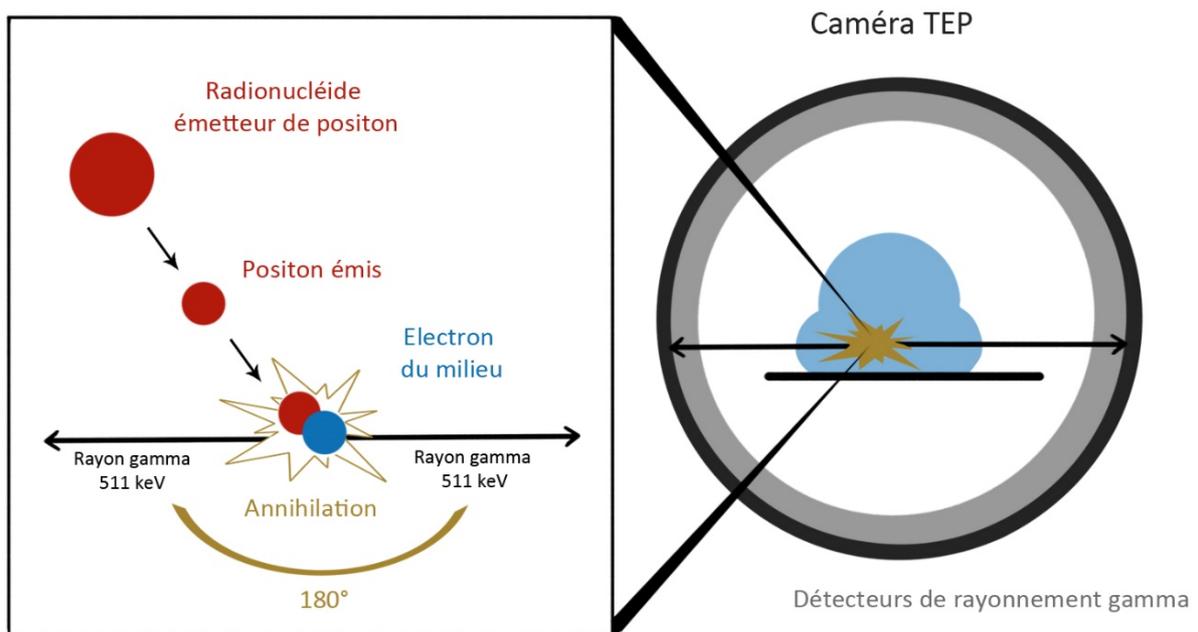
FDG est métabolisé en fluorodésoxyglucose-6-phosphate, qui représente une impasse métabolique pour la cellule et de ce fait reste piégé localement où il s'accumule.

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)<sup>4</sup>.

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 anticorps<sup>5</sup> 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  $\beta^+$ . Pour rappel, les rayonnements  $\beta^+$  sont émis par des noyaux instables car trop riches en protons, au sein desquels un proton est converti en neutron avec émission d'une particule  $\beta^+$  (aussi appelée positon) et d'un neutrino. 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  $\gamma$  d'énergie 511 keV, émis simultanément dans la même direction mais en sens opposés. Ces photons sont détectés par un capteur en anneau qui entoure le patient (**Figure 1**). 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 de reconstituer en trois dimensions la répartition de l'isotope au sein du patient à partir d'images planes obtenues suivant plusieurs incidences<sup>6</sup>.



**Figure 1** : Représentation schématique du principe de détection du rayonnement dans le cadre de l'imagerie TEP.

La TEP est toujours couplée à une imagerie anatomique : tomодensitométrie (TDM) dans la majorité des cas, ou IRM. On parle alors de TEP-TDM (PET-CT en anglais)<sup>7</sup> 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 tissus<sup>8-10</sup>. 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 rat<sup>11</sup>.

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 secondairement un signal lumineux d'énergie parfaitement définie, permettant la création d'électrons au niveau d'une photocathode placée à l'arrière des détecteurs. 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 gadolinium<sup>12</sup>.

### **3. Applications et limitations de la TEP métabolique**

#### 3.1. Intérêts

##### *a. En oncologie*

Depuis l'obtention de son AMM en 1998, le <sup>18</sup>F-FDG a permis à la TEP de prendre une place prépondérante en imagerie médicale<sup>1</sup>, principalement en oncologie<sup>13</sup>. Les cellules tumorales malignes présentent un hypermétabolisme, entraînant une surexpression de GLUT-1 et par conséquent une accumulation du FDG radiomarqué en leur sein. La TEP possède une bonne sensibilité et spécificité dans le cadre de l'oncologie, respectivement de 84 % et 88 % en moyenne<sup>14</sup>. Elle permet en effet la visualisation 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'extension<sup>15</sup>. Elle est également un outil pronostic de première importance car l'intensité de fixation du <sup>18</sup>F-FDG est corrélée à l'hypermétabolisme des tumeurs, et donc à leur agressivité. Il est également possible d'évaluer la réponse au traitement ainsi que le suivi après rémission pour surveiller l'apparition d'une éventuelle rechute.

Outre le <sup>18</sup>F-FDG, d'autres marqueurs métaboliques peuvent être utilisés. Les croissances tumorales rapides sont associées à des synthèses protéiques exagérées : il est possible d'utiliser des acides aminés radiomarqués, qui seront tout comme le glucose préférentiellement pris en charge par les cellules à fort renouvellement. Parmi eux, la L-[methyl-<sup>11</sup>C]méthionine (MET) qui, contrairement au <sup>18</sup>F-FDG, ne s'accumule pas dans les neurones : elle est donc indiquée pour l'imagerie des tumeurs cérébrales<sup>16</sup>. La choline marquée au <sup>11</sup>C ou au <sup>18</sup>F est également utilisée pour le diagnostic des cancers de la prostate<sup>17</sup>. Autre marqueur, le <sup>18</sup>F-Na permet la visualisation de métastases osseuses<sup>18</sup>.

### *b. Autres applications*

La TEP métabolisme a également d'autres applications en dehors de la cancérologie. 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 utiliser le  $^{18}\text{F}$ -FDG pour suivre la progression de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer<sup>19</sup> par quantification de la radioactivité associée aux zones d'hypofixation correspondant à la dégénérescence. D'autres marqueurs plus spécifiques, comme le  $^{18}\text{F}$ -florbétapir qui se fixe au niveau des plaques séniles  $\beta$ -amyloïdes, sont également disponibles<sup>20</sup>.

Autre marqueur, la 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) marquée au  $^{18}\text{F}$  permet l'exploration métabolique des systèmes dopaminergiques, ce qui a un intérêt pour le diagnostic différentiel des troubles du mouvement d'origine neurologique, comme la maladie de Parkinson<sup>21</sup>. Elle est également indiquée pour l'imagerie de certaines tumeurs endocrines<sup>22</sup>.

Le  $^{18}\text{F}$ -FDG est aussi largement utilisé en cardiologie pour évaluer la viabilité myocardique pour les patients présentant une maladie des artères coronaires<sup>23</sup>. Son accumulation non spécifique au niveau des foyers inflammatoires et infectieux est également mise à profit pour l'imagerie de certaines maladies ; parmi elles, des maladies chroniques inflammatoires comme les vascularites<sup>24</sup> ou les infections sur prothèses<sup>25</sup>.

### 3.2. Limitations du $^{18}\text{F}$ -FDG et des vecteurs métaboliques en oncologie

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...)<sup>26,27</sup>. De même, les tumeurs de très petite taille ou celles proches d'organes hyperfixant le glucose (cerveau, vessie, cœur) seront difficiles à visualiser<sup>28</sup>. 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 en oncologie**

##### **4.1. Intérêts de l'immuno-TEP**

###### *a. Intérêt dans le cadre de la médecine de précision*

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, à l'époque majoritairement composé des chimiothérapies dites cytotoxiques. Ces médicaments se fixent sur des cibles moléculaires spécifique d'un phénotype tumoral, plutôt que d'inhiber et détruire de façon non spécifique les cellules à renouvellement rapide<sup>29</sup>. Les thérapies ciblées sont particulièrement intéressantes dans le cadre d'une approche innovante appelée « médecine de précision » : le traitement sera ainsi adapté à chaque patient, en fonction des marqueurs phénotypiques présents sur ses tumeurs.

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, ces thérapies présentent plusieurs inconvénients : outre leur prix élevé, elles peuvent être à l'origine d'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 sein<sup>30</sup>. 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 échantillons tissulaires. De plus, ces échantillons peuvent être non représentatifs de la pathologie du patient car prélevés au mauvais endroit, ou encore au sein d'une tumeur à l'expression phénotypique hétérogène. 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 maladie<sup>31</sup>. Ceci explique en partie 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.

Dans ce contexte, l'immuno-TEP intervient comme méthode non-invasive de choix 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 thérapeutique<sup>32</sup>. Des radiopharmaceutiques ciblant HER2 sont en développement dans ce sens<sup>33,34</sup>. D'autres vecteurs sont explorés pour les cancers présentant des problématiques similaires, comme le myélome multiple<sup>35</sup>, le carcinome rénal<sup>36</sup> ou les lymphomes<sup>37</sup>. L'immuno-TEP s'inscrit ainsi dans une approche innovante appelée théranostique, qui utilise la combinaison des techniques diagnostiques et de la thérapie pour une meilleure prise en charge des patients.

### *b. Intérêt dans le cadre de la radioimmunothérapie*

La radioimmunothérapie est un type de radiothérapie interne vectorisée utilisant des vecteurs immunologiques tout comme l'immuno-TEP. Elle se différencie de la radiothérapie externe, où l'irradiation provient d'une source extérieure au patient. 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. Elle peut utiliser des isotopes émetteurs  $\beta^-$ , dont l'énergie maximale émise constitue un des critères de choix du radionucléide en fonction de la taille des tumeurs à irradier. Parmi les plus utilisés, on retrouve l'yttrium-90 ( $T_{1/2} = 2,7$  j ;  $E_{\beta\text{max}} \text{ majoritaire} = 2,284$  MeV), le lutécium-177 ( $T_{1/2} = 6,7$  j ;  $E_{\beta\text{max}} \text{ majoritaire} = 0,497$  MeV) ou l'iode-131 ( $T_{1/2} = 8$  j ;  $E_{\beta\text{max}} \text{ majoritaire} = 0,606$  MeV). La RIT  $\beta^-$  a montré son efficacité en pré-clinique et en clinique, tout particulièrement dans les cancers hématologiques<sup>38</sup>. 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  $\alpha$ , très peu pénétrantes mais beaucoup plus énergétiques (de 5 à 9 MeV, contre 30 keV à 2,3 MeV pour les particules  $\beta^-$ ). La RIT  $\alpha$  a été étudiée en clinique notamment dans le traitement du glioblastome avec l'astate-211 ( $T_{1/2} = 7,2$  h), dans la leucémie myéloïde aigüe avec l'actinium-225 ( $T_{1/2} = 10$  j) ou également dans le lymphome B non hodgkinien avec le bismuth-213 ( $T_{1/2} = 46$  min)<sup>39</sup>.

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 sains<sup>40</sup>. 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  $\beta^+$  et un émetteur  $\beta^-$ , 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

Un antigène doit répondre à un certain nombre de critères pour pouvoir être considéré comme une cible acceptable pour l'immuno-TEP<sup>41</sup>. 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. Son devenir dans les cellules est aussi à prendre en compte : dans l'idéal, l'antigène ne devrait être internalisé 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 d'utiliser des antigènes membranaires comme cible théranostique.

#### 4.3. Importance du vecteur

##### *a. Généralités*

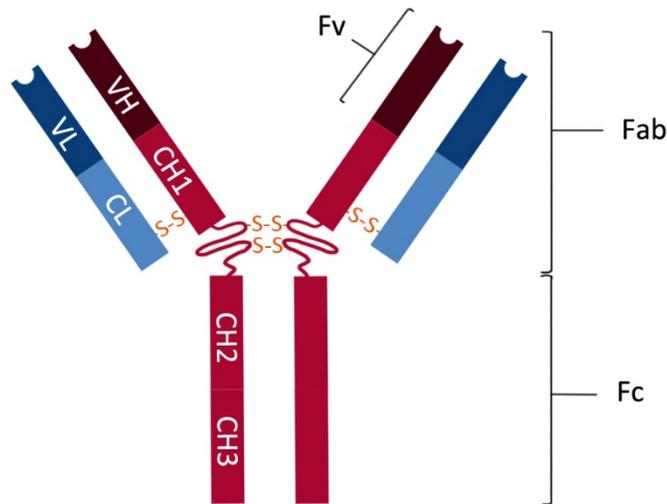
Le vecteur idéal doit se fixer de façon spécifique et rapide sur sa cible. Pour cela, plusieurs facteurs doivent être considérés ; son affinité doit notamment être importante et la fraction non fixée doit s'éliminer rapidement, afin de permettre une clairance sanguine du radiopharmaceutique et une accumulation spécifique au niveau de la tumeur. Ces deux facteurs clés que sont la fixation spécifique et la clairance du produit depuis les organes sains vont influencer sur la qualité de l'image qui dépend directement du ratio tumeur-sur-tissus sains.

En fonction du type de molécule choisie comme vecteur, la biodistribution du radiopharmaceutique ainsi que sa demi-vie biologique seront variables. 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, son hydrophilie, les structures chimiques présentes et sa nature. Dans ce contexte, la dosimétrie reçue par les différents organes capables de fixer le vecteur et qui, en première approche, est proportionnelle à l'activité cumulée dans un gramme d'organe multiplié par un facteur propre au radionucléide utilisé, sera fortement influencée par le choix du vecteur et sa biodistribution dans l'organisme.

Comme annoncé précédemment, ce travail est centré sur l'utilisation des vecteurs immunologiques ; les autres vecteurs potentiellement utilisables pour cibler les tumeurs ne seront donc pas abordés ici.

### b. Anticorps entiers

Les anticorps sont des glycoprotéines appartenant à la famille des immunoglobulines (Ig). Les IgG sont constituées de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes (environ 50 kDa chacune) et deux chaînes légères (environ 25 kDa chacune), reliées entre elles par des ponts disulfures formant un « Y » caractéristique (**Figure 2**). Ces chaînes sont composées de domaines immunoglobulines de 110 acides aminés chacun, pouvant être de deux types. Les domaines constants varient peu d'un anticorps à l'autre, alors que les domaines variables, situés aux extrémités N-terminales de la protéine, sont spécifiques d'un clone donné. L'association entre une chaîne légère variable (VL) et une chaîne lourde variable (VH) constitue le paratope qui permet la reconnaissance de la cible par l'anticorps.



**Figure 2 :** Représentation schématique d'une IgG ; les chaînes légères sont notées « L » (pour *light*), les chaînes lourdes « H » (pour *heavy*), les fragments variables « V » et les fragments constants « C ».

Les IgG sont des molécules de grande taille (environ 150 kDa), avec une longue demi-vie sanguine, en moyenne 1 à 3 semaines<sup>42,43</sup>. En conséquence, le ratio optimal tumeur-sur-organe est atteint vers 2 à 4 jours après l'injection<sup>44</sup>. Cela un inconvénient pour l'imagerie, nécessitant parfois un délai entre l'administration du radiopharmaceutique et l'acquisition de

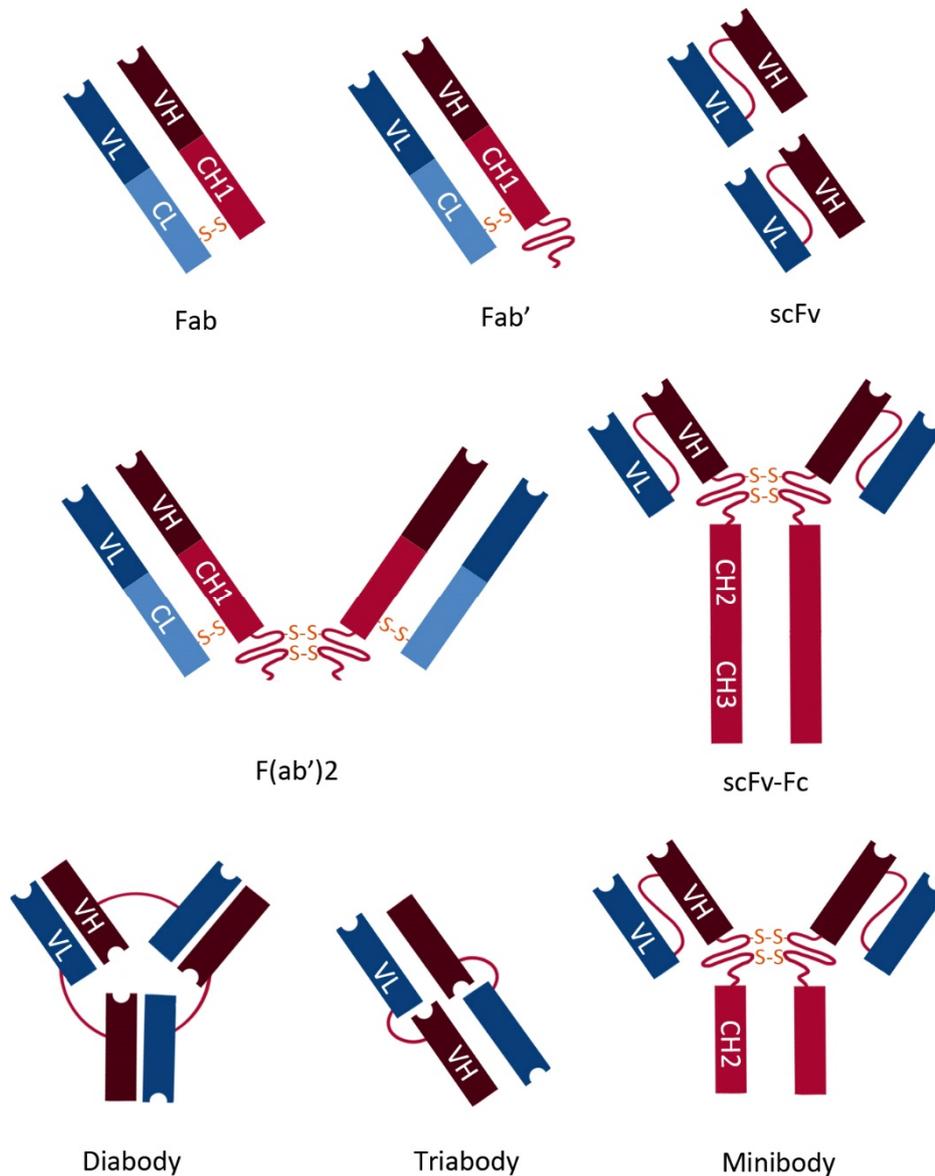
l'image, entraînant des contraintes techniques ainsi que l'irradiation du patient et de son entourage.

D'autres approches sont ainsi étudiées pour optimiser l'utilisation d'anticorps monoclonaux (AcM) entiers en imagerie, et parmi elle le pré-ciblage<sup>45</sup>. Cette technique repose sur des AcM préalablement modifiés, de façon à introduire une fonction capable de lier spécifiquement un deuxième élément, en plus de ses capacités de reconnaissance de la cible. Deux injections sont donc réalisées : une première avec l'AcM modifié, puis après un délai une molécule radiomarquée allant se fixer sur l'AcM. Le temps de latence entre les deux injections permet la clairance sanguine de l'AcM.

La grande taille des AcM entiers limite leur excrétion sous forme inchangée au niveau rénal : ils sont en majorité éliminés après avoir subi un métabolisme au niveau hépatique<sup>43</sup>. Leurs caractéristiques d'élimination sont à prendre en compte dans le cas de l'imagerie des organes concernés, qui pourront recevoir des doses conséquentes susceptibles de limiter les posologies de radiopharmaceutiques à administrer (dans le cas de la thérapie) ou de diminuer les contrastes d'imagerie pour les tumeurs à proximité.

### *c. Fragments et dérivés d'anticorps*

Les fragments d'anticorps sont spécifiquement produits de façon à conserver les propriétés de fixation sur la cible, mais avec des propriétés pharmacocinétiques différentes dues à leur plus petite taille (**Figure 3**)<sup>46,47</sup>. Ils sont produits par digestion enzymatique de l'AcM (en utilisant par exemple la papaïne ou la pepsine) ou par génie génétique *via* des vecteurs d'expression type bactériophage. D'une taille généralement comprise entre 7 et 100 kDa en fonction du type de fragment considéré, ils sont rapidement éliminés au niveau rénal par filtration glomérulaire, menant à des demi-vies sanguines de l'ordre de quelques heures. Ils ne s'accumulent donc pas au niveau du foie puisqu'ils ne sont pas métabolisés. Néanmoins, malgré une pénétration plus importante dans les tissus étant donné leur petite taille, les fragments d'AcM sont moins affins et surtout moins avides que les AcM entiers, avec des constantes de dissociation beaucoup plus élevées. On observe donc généralement une diminution du ciblage tumoral. Les formes les plus petites peuvent également s'accumuler au niveau du rein suite à des mécanismes de filtration/réabsorption.



**Figure 3** : Représentation schématique de divers fragments et dérivés d'anticorps.

*d. Vecteurs non dérivés d'anticorps*

D'autres vecteurs protéiques non dérivés d'AcM ont récemment été développés. Les plus utilisées sont les molécules de type affibody<sup>49,50</sup>, des peptides artificiels de petite taille (environ 7 kDa), constitués de 58 acides aminés repliés en trois hélices alpha. Ils possèdent une haute affinité pour leur cible, proche de celles des AcM. Certains, comme les affitines, sont caractérisés par une haute résistance aux conditions extrêmes, pouvant supporter des températures jusqu'à 100°C et de grandes variations de pH.

#### 4.4. Émetteurs $\beta^+$

##### *a. Caractéristiques recherchées*

Afin de pouvoir permettre une acquisition par imagerie TEP, la concentration en radiopharmaceutique dans une zone de l'espace donnée doit être suffisamment forte pour que les flux de rayonnements puissent être détectés avec une bonne sensibilité<sup>51</sup>. En revanche, des 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 afin d'optimiser la période effective du radiopharmaceutique. 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)<sup>32</sup> mais peut servir pour radiomarquer des dérivés d'AcM. Une émission concomitante  $\gamma$  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 entourage<sup>41</sup>. Cependant, il est intéressant de préciser que cette émission pourrait être utilisée avec un nouveau système d'imagerie dit à 3-photons. En cours d'évaluation expérimentale, cette technique permettrait d'utiliser la coïncidence  $\beta+\gamma$  de façon à améliorer la résolution spatiale par rapport à la TEP classique<sup>52</sup>. Dans le cas d'une approche théranostique, les radioéléments possédant des isotopes émetteurs  $\beta^-$  sont particulièrement intéressants. Un autre facteur important à considérer est la disponibilité du radionucléide : ils nécessitent souvent la proximité d'un cyclotron capable de produire le radionucléide et de le préparer sous une forme appropriée à son utilisation en radiopharmacie. Cette mise en forme fait généralement appel à des techniques de séparation-purification qui se caractérisent par leur robustesse et leur facilité de mise en œuvre. Elles peuvent également, si possible, être automatisables.

##### *b. Principaux émetteurs $\beta^+$ utilisables en immuno-TEP*

Les émetteurs  $\beta^+$  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). Dans la vaste majorité des cas, ces isotopes ne peuvent pas être fixés directement sur les vecteurs biologiques de grande taille utilisés en immuno-TEP<sup>53</sup>. Ils nécessitent l'introduction d'une molécule intermédiaire appelée

ligand, qui permet ou améliore la stabilité du radiomarquage. La nature chimique de l'isotope va influencer la nature de la molécule ligand utilisées. Les différents avantages et inconvénients de ces isotopes sont récapitulés dans le **Tableau 1**.

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

**Tableau 1** : Caractéristiques des principaux émetteurs  $\beta^+$  utilisables pour la TEP.

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.

## II. LE CUIVRE-64

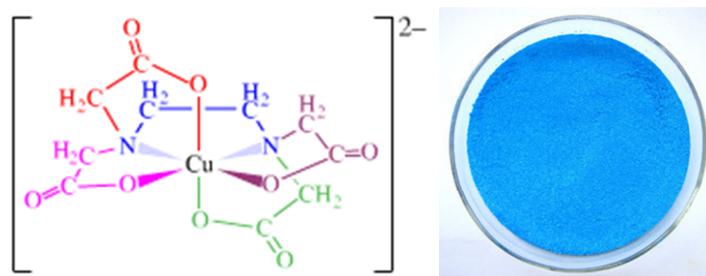
### 1. Propriétés

#### 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), avec une prédominance naturelle des degrés I et II. Ces différentes formes vont influencer la cinétique et la stabilité des complexes de cuivre qui en découlent<sup>54</sup>.

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 4**).



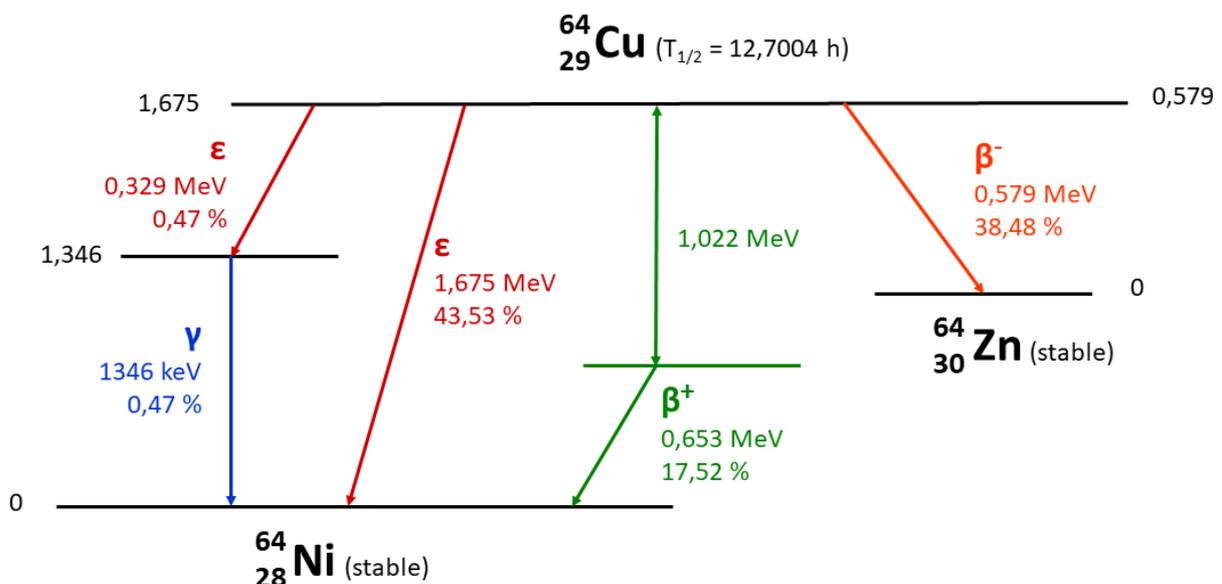
**Figure 4** : Exemple de complexation du Cu(II) avec l'EDTA : représentation schématique (à gauche) et photo du produit sous forme de poudre.

Enfin, le cuivre au degré d'oxydation +III (configuration électronique [Ar] 3d<sup>8</sup>) est relativement rare car sa stabilisation sous forme de complexes nécessite des ligands  $\pi$ -donneurs forts.

Le potentiel  $E^0$  d'oxydoréduction du couple Cu(II)/Cu(I) est relativement bas (0,153 V/ESH), une propriété mise à contribution au sein des organismes ; la facilité de passage du Cu<sup>+</sup> au Cu<sup>2+</sup> (et inversement) est exploitée dans de nombreux processus d'oxydoréduction pour réaliser des transferts d'électrons<sup>55</sup>.

## 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 35 neutrons et dont la période physique est de 12,7 h. Il se désintègre en nickel-64 par émission  $\beta^+$  avec une probabilité de 17,52 % : il s'agit du rayonnement d'intérêt pour une application en immuno-TEP (**Figure 5**). Mais il se désintègre également en zinc-64 par émission  $\beta^-$  (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 %, engendrant l'émission d'un rayonnement  $\gamma$  de forte énergie).



**Figure 5** : Représentation schématique de la décroissance du cuivre-64.

En résumé, le cuivre-64 est à la fois un émetteur de particules ( $\beta^+/\beta^-$ , électrons Auger suite à la capture électronique) et de photons (rayonnement  $\gamma$ , rayonnement X de fluorescence suite à la capture électronique)<sup>56</sup>. Il présente donc des propriétés potentiellement thérapeutiques.

## **2. Méthodes de production du cuivre-64 pour les applications en recherche et en clinique**

La production du cuivre-64 se fait en bombardant une cible solide 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 réacteur soit en accélérateur (cyclotron).

### 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. On peut ainsi

produire le  $^{64}\text{Cu}$  par irradiation de  $^{63}\text{Cu}$  avec 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  $^{64}\text{Cu}$  du  $^{63}\text{Cu}$  de la cible, menant ainsi à un radionucléide de faible activité spécifique (cf. III.3.).

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  $^{64}\text{Cu}$ , ces neutrons rapides vont bombarder une cible de  $^{64}\text{Zn}$  selon la réaction  $^{64}\text{Zn}(n,p)^{64}\text{Cu}$ . Cette méthode a permis pour la première fois de fournir du  $^{64}\text{Cu}$  compatible avec une utilisation médicale par le MURR (Missouri University Research Reactor) en 1994<sup>57</sup>. 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

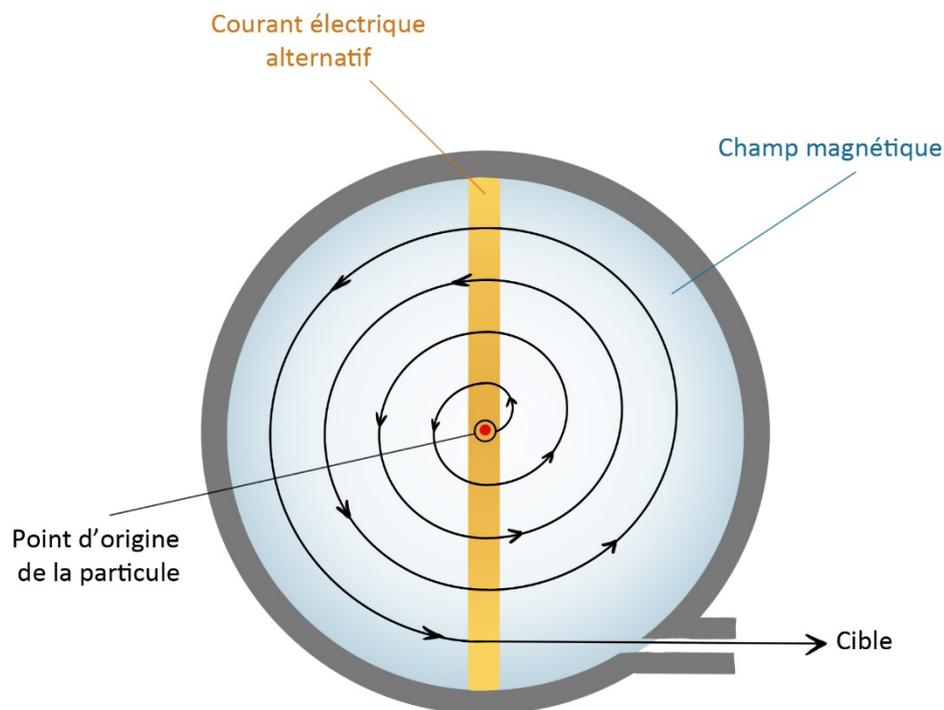
#### *a. Méthode utilisant des protons*

Le cyclotron est un type d'accélérateur de particules qui utilise l'action combinée d'un champ magnétique et d'un champ électrique<sup>58</sup>. 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 6**).

Initialement, le  $^{64}\text{Cu}$  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 quantité<sup>59</sup>. Néanmoins, elle n'est pas compatible avec une production à la demande du  $^{64}\text{Cu}$ , car le radionucléide majoritaire produit est le  $^{67}\text{Ga}$  dont la longue demi-vie ( $T_{1/2} = 72$  h) est presque six fois supérieure à celle du  $^{64}\text{Cu}$ .

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  $^{64}\text{Ni}$  enrichi est déposé par électrolyse sur un support inerte (le plus souvent en or) qui est facilement refroidi durant l'irradiation et qui ne se transmute pas lui-même en radionucléides à période longue sous l'effet du faisceau. Cette méthode a été mise au point sur cyclotron médical par Szelecsenyi *et al.* en 1993<sup>60</sup> et a été

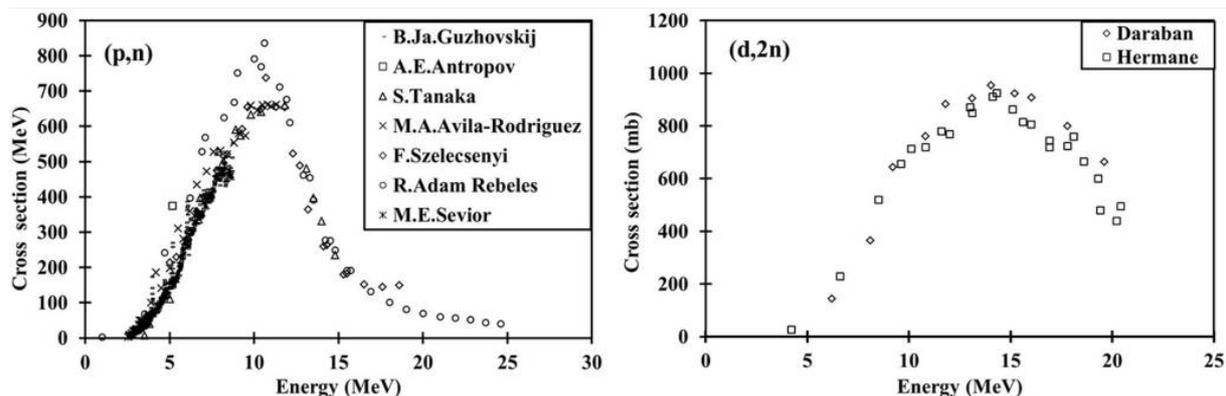
ensuite améliorée : elle permet à présent de produire de larges quantités de  $^{64}\text{Cu}$ , pouvant aller jusqu'à 37 GBq<sup>61</sup>. Elle nécessite l'accélération des protons à une énergie d'environ 20 MeV, ce qui est compatible avec les cyclotrons médicaux de moyenne énergie<sup>62</sup>.



**Figure 6** : Représentation simplifiée du trajet d'une particule au sein d'un cyclotron.

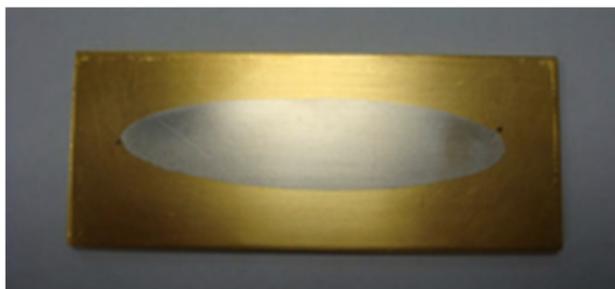
#### *b. Méthode utilisant des deutons*

Le  $^{64}\text{Cu}$  utilisé pour cette étude a été produit par le cyclotron ARRONAX, localisé à Saint-Herblain<sup>63</sup>. 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  $^{64}\text{Cu}$  avec une cible de  $^{64}\text{Ni}$ . Plutôt que de dévier le faisceau avant que les protons n'aient atteint leur énergie maximale, 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 7**). Elle permet l'obtention d'un rendement similaire à celui de la méthode utilisant des protons (206 MBq/ $\mu\text{A}/\text{h}$ ) et a l'avantage de nécessiter une épaisseur de  $^{64}\text{Ni}$  25 % moindre<sup>64</sup>. 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.



**Figure 7** : Comparaison entre les sections efficaces de production du  $^{64}\text{Cu}$  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)<sup>62</sup>.

Le  $^{64}\text{Ni}$  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  $^{64}\text{Ni}$ , électrodéposé sur un support en or (**Figure 8**). Afin de tirer parti au mieux de la section efficace, l'épaisseur des cibles est comprise entre 10 et 30  $\mu\text{m}$ . Une irradiation moyenne dure environ 3 h, avec une intensité sur cible de 90  $\mu\text{A}$ . Une fois la cible irradiée, elle est placée en quarantaine pour être « refroidie », c'est-à-dire jusqu'à ce que les radionucléides à période très courte générés par l'irradiation aient décréus. La cible est ensuite dissoute dans une solution de HCl concentré à 9 N. Afin d'éliminer les ions contaminants issus du processus de production ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ), on procède à une purification sur résine échangeuse d'ions en utilisant des solutions de HCl de moins en moins concentrées. 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, on utilise une technique par échanges d'anions. La dissolution de la cible dans du HCl 9 N permet la formation de complexes chlorures anioniques des ions présents en solution, à l'exception du  $\text{Ni}^{2+}$  qui est éliminé en premier lors de la purification par la résine. Un 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 8 :** Photographie d'une cible de  $^{64}\text{Ni}$  sur son support en or utilisée pour la production de  $^{64}\text{Cu}$ .

### 3. Problématiques inhérentes à la production de 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 molaire<sup>65</sup>. 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  $^{64}\text{Cu}$ , il s'agit de l'activité par mole de cuivre total ( $^{64}\text{Cu}$  et cuivre non radioactif) ou de l'activité par mole de métaux totaux présents dans la solution. Les principaux contaminants retrouvés lors d'analyse par ICP (spectrométrie à plasma à couplage inductif) sont des cations divalents comme le  $\text{Zn}^{2+}$ , le  $\text{Ni}^{2+}$  (produits par la désintégration du  $^{64}\text{Cu}$ ) et le  $\text{Co}^{2+}$  (produit lors de l'irradiation de la cible) ainsi que le fer sous forme  $\text{Fe}^{3+}$  (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  $^{64}\text{Cu}$ , 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  $^{64}\text{Cu}$ . La maîtrise de la contamination est particulièrement délicate dans le cas du  $^{64}\text{Cu}$ , 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  $\text{Fe}^{3+}$ . 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  $^{64}\text{Cu}$  utilisant des deutons, les principaux produits sont le  $^{65}\text{Ni}$  ainsi que trois isotopes du cobalt (57, 58 et 61). La pureté radionucléidique est déterminée après purification par spectrométrie gamma.

#### **4. Métabolisme du cuivre chez l'homme**

##### **4.1. Rôle physiologique**

Le cuivre fait partie des oligo-éléments essentiels à la vie et est parmi les plus abondants chez l'homme, avec le fer et le zinc. Un adulte de 70 kg contient en moyenne 110 mg de cuivre<sup>66</sup>, répartis principalement dans le foie (10 mg, organe majoritaire en termes de concentration), le cerveau (8,8 mg), le sang (6 mg), le squelette et la moelle osseuse (46 mg) ainsi que les muscles squelettiques (26 mg). Le cuivre est majoritairement présent sous forme fonctionnelle, c'est-à-dire sous forme complexée dans des métalloprotéines, où il sert de cofacteur à de nombreuses enzymes en permettant la catalyse de réactions d'oxydoréduction.

Ces enzymes dépendantes du cuivre sont appelées cuproprotéines et exploitent le potentiel de réduction du Cu(II) en Cu(I) pour permettre le transport d'électrons<sup>55,67</sup>. Les cuproprotéines sont présentes partout dans l'organisme et sont impliquées dans de nombreuses fonctions essentielles (**Tableau 2**).

Les dérégulations de l'homéostasie du cuivre peuvent avoir de graves conséquences, son excès comme sa carence entraînant des lésions cellulaires dans divers organes et en particulier dans le foie et le cerveau. Par exemple, la maladie de Menkès est une carence en cuivre héréditaire due à un déficit en ATP7A, une protéine de transport du cuivre, entraînant une malabsorption digestive. En l'absence de traitement, l'évolution est fatale dans les premières années de vie. De même, la maladie de Wilson est une surcharge héréditaire en cuivre, ayant pour conséquences des atteintes hépatiques et neurologiques sévères<sup>68</sup>.

Nom	Fonctions biologiques	Conséquences d'un déficit
<b>Cu/Zn SOD</b>	Élimination des radicaux libres	Dommages oxydatifs intracellulaires
<b>Cytochrome c oxydase</b>	Transport des électrons dans la mitochondrie	Symptômes liés à un défaut d'ATP : myopathie, ataxie...
<b>Lysyl oxydase</b>	Association entre le collagène et l'élastine	Atteintes des tissus conjonctifs : rupture vasculaire...
<b>Dopamine β-hydroxylase</b>	Productions des catécholamines	Troubles de l'hypothalamus : hypothermie, hypotension, déshydratation, somnolence
<b>Tyrosinase</b>	Production de mélanine	Dépigmentation cutanée
<b>Peptidylglycine monooxygénase</b>	Activation des hormones peptidiques	Troubles associés à un déficit en hormones peptidiques
<b>Céruлоplasmine</b>	Ferroxidase, transport du cuivre	Anémie
<b>Facteurs de la coagulation V et VIII</b>	Coagulation	Risque d'hémorragies
<b>Angiogénine</b>	Induction de l'angiogenèse	Défaut d'angiogenèse
<b>Métallothionéine</b>	Capture du cuivre	Toxicité cellulaire liée au cuivre

**Tableau 2** : Exemples de protéines dépendantes du cuivre, de leurs fonctions physiologiques et des troubles associés à un déficit en ces protéines<sup>67</sup>.

## 4.2. Homéostasie du cuivre

### *a. Apports*

Les apports journaliers en cuivre se situent entre 0,6 et 1,6 mg et sont fournis par le biais de l'alimentation<sup>67</sup>. Le cuivre est présent dans de nombreux aliments, notamment les légumes, la viande de bœuf et les fruits de mer : les carences alimentaires en cuivre sont donc rares dans les pays développés, du fait des nombreuses sources possibles d'apport.

### *b. Absorption et distribution sanguine*

L'absorption digestive du cuivre se fait principalement au niveau du duodénum (0,6 mg par jour). Le cuivre apporté par l'alimentation est sous forme Cu(II) et doit être réduit en Cu(I) par des réductases membranaires afin de pouvoir être pris en charge par les protéines de transports Ctr1 (copper transporter 1) vers le milieu intracellulaire<sup>69</sup>. L'expression de Ctr1 au niveau de la membrane cellulaire est régulée par les taux de cuivre intracellulaire : elle permet ainsi de contrôler les apports en cuivre<sup>70</sup>. Le cuivre est ensuite pris en charge par la protéine chaperonne Atox1 et amené à une ATPase chargée du transport du cuivre, l'ATP7A, qui exporte le cuivre au niveau sanguin<sup>71</sup>. Le transport du cuivre y est assuré par l'albumine ou des  $\alpha_2$ -macroglobuline comme la transcupréine ou la céruléoplasmine<sup>72</sup>.

### *c. Métabolisme hépatique*

A partir de la circulation sanguine portale, le cuivre est acheminé dans l'hépatocyte *via* un transporteur appelé Ctr1p. Le foie est l'organe majoritaire de stockage et de métabolisme du cuivre et ses cellules contiennent diverses protéines chaperonnes capables de lier ce métal.

#### - Atox1

La protéine Atox1 lie le Cu<sup>+</sup> présent à l'état libre dans la cellule et permet son transport vers l'appareil de Golgi où il est pris en charge par les ATPases et notamment l'ATP7B<sup>73</sup>. Elle favorise ainsi l'excrétion biliaire du cuivre en excès<sup>74</sup>. Il est également possible que son affinité pour le cuivre permette de protéger les cellules contre le stress oxydatif, notamment au niveau des neurones, où elle est présente en fortes concentrations<sup>75</sup>.

- CCS

La CCS (Copper Chaperon for Superoxyde dismutase) permet l'apport du cuivre à la SOD et est essentielle à son bon fonctionnement<sup>76</sup>. La SOD favorise l'élimination des ions superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ) en les transformant en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et en  $O_2$ , limitant ainsi le stress oxydatif. La synthèse de CCS s'adapte en fonction des besoins : sa concentration intracellulaire est étroitement corrélée à la concentration en cuivre.

- Cox17

La Cox17 apporte le cuivre à la protéine CCO (cytochrome c oxydase) et est nécessaire à son fonctionnement<sup>77</sup>. La CCO permet le transport d'électrons dans la chaîne mitochondriale et est donc nécessaire à la synthèse de l'ATP.

- ATPases

Deux ATPases de la famille P sont impliquées dans le transport du cuivre : l'ATP7A et l'ATP7B<sup>71</sup>. Elles sont exprimées dans de nombreux tissus (notamment le cerveau, l'intestin et le rein) et sont essentielles dans des fonctions physiologiques cruciales comme le développement du système nerveux et la fonction hépatique. Elles sont également présentes au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi et facilitent l'excrétion du cuivre et son élimination par la bile. L'expression des deux types d'ATP7 varient en fonction des tissus : par exemple, les hépatocytes présentent uniquement l'ATP7B, alors que les glandes surrénales n'expriment que l'ATP7A. Certains tissus, comme l'épithélium intestinal, expriment les deux ATPases<sup>68</sup>.

*d. Devenir post-hépatique : la céruléoplasmine*

La céruléoplasmine est une  $\alpha_2$ -glycoprotéine responsable de plus de 95 % du transport sanguin du cuivre<sup>78</sup>. Elle est capable d'incorporer jusqu'à six atomes de cuivre, formant ainsi l'holocéruléoplasmine, et quitte ensuite l'hépatocyte pour la circulation sanguine. L'holocéruléoplasmine remplit moins un rôle de transport véritable du cuivre (cette fonction pouvant être assurée entre autres par l'albumine) mais comme cofacteur essentiel de la transferrine. En effet, elle présente une activité ferroxidasique, en mobilisant et transférant

le fer stocké dans les tissus vers la transferrine. Ainsi, un déficit en céruléoplasmine n'a que peu d'impact sur le métabolisme du cuivre, mais entraîne en revanche une surcharge en fer<sup>79</sup>.

## 5. Complexation du cuivre-64

Comme évoqué précédemment, le cuivre n'existe que très rarement à l'état libre dans les organismes vivants, où il est quasiment toujours associé à des molécules sous la forme de complexes. Sous sa forme libre, le cuivre est extrêmement toxique et est donc rapidement pris en charge par les métalloprotéines pour éviter des dommages cellulaires dus au stress oxydatif. Pour concevoir un radiopharmaceutique à base de cuivre, il est donc nécessaire de modifier le vecteur avec un agent de complexation ou un ligand du cuivre suffisamment fort pour inhiber cette fixation aux métalloprotéines et ainsi garder le cuivre associé au vecteur d'intérêt.

### 5.1. 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 cas d'une liaison entre un ligand et un atome ou ion de type métal, le complexe formé est appelé chélate ; le ligand (ou chélateur) est alors toujours au moins bidenté.

Pour l'élaboration d'un radiopharmaceutique, plusieurs voies sont possibles. Le radiomarquage peut s'effectuer par le biais d'un isotope radioactif d'un des atomes de la molécule (comme le <sup>11</sup>C). Cela nécessite de synthétiser le vecteur dès le départ avec le traceur radioactif intégré, avec un processus entièrement sous les contraintes de radioprotection. On peut également radiomarquer la biomolécule finale par un isotope, soit directement si elle dispose d'un site permettant une liaison suffisamment stable entre le vecteur et le radionucléide, 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 covalente<sup>53</sup>. 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.

## 5.2. Caractéristiques recherchées d'un ligand du cuivre

La sélection d'un ligand pour l'élaboration d'un radiopharmaceutique à base de <sup>64</sup>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 <sup>64</sup>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  $\beta_n$  (souvent exprimée sous la forme  $\log \beta_n$ ) :

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

$\beta_n$  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  $\beta_n$  peut également être utilisé : il est appelé constante globale de dissociation du complexe ( $K_d$ ). En résumé, plus  $\beta_n$  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 complexe<sup>80</sup> : une même valeur de  $K_d$  peut correspondre à des vitesses d'échange différentes entre le complexe et les formes libres.

La constante thermodynamique globale est souvent représentée par le calcul du « pM », qui correspond au logarithme négatif de la concentration résiduelle en cation métallique<sup>81</sup> :

$$pM = -\log[M^{n+}]_{non\ complexé}$$

pM est calculé dans des conditions définies : avec un excès de 100 % de ligands, une concentration en cation métallique  $[M^{n+}]$  de  $10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup> et un pH de 7,4. Il prend en compte la basicité du ligand ainsi que toutes ses constantes thermodynamiques intermédiaires. C'est l'unique valeur permettant de comparer entre eux l'affinité de différents ligands pour un même métal, étant dépendante de la basicité du ligand.

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<sup>82</sup>. 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<sup>83</sup>. 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.

Plusieurs techniques permettent de déterminer les constantes thermodynamiques partielles d'un ligand, afin d'obtenir par calcul la constante thermodynamique globale ( $\log \beta_n$ ) : titration pH-métrique, spectroscopie (RMN, UV-visible), potentiométrie.

### *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 résistance du passage du cation métallique de sa forme liée à sa 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. En fonction de la nature du métal, la RMN peut également être utilisée.

### *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<sup>84</sup>. 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 radiopharmaceutique<sup>85</sup>. 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  $\text{Ga}^{3+}$ , 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.

### 5.3. Paramètres influençant la stabilité *in vivo* des complexes

Le cuivre jouant un rôle essentiel dans l'organisme (cf. II.4.), les cuproprotéines capables de le prendre en charge vont influencer la stabilité *in vivo* des complexes de cuivre-64. Plusieurs mécanismes peuvent alors intervenir.

#### *a. Résistance à la transchélation*

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  $^{64}\text{Cu}$ , il s'agit d'une des problématiques majeures de la stabilité des radiomarquages. Les cuproprotéines étant spécifiques du cuivre, elles sont particulièrement compétitrices et ce d'autant plus qu'elles sont généralement plus de 1000 fois plus abondantes que le radiopharmaceutique dans l'organisme, notamment au niveau du foie. A ce niveau, les principales protéines responsables de la transchélation sont la SOD, la céruloplasmine et les méthallothionines<sup>86,87</sup>. Une fois complexé par ces protéines, le cuivre-64 suit le cycle classique de l'homéostasie du cuivre, ce qui entraîne une accumulation de la radioactivité au niveau hépatique. Ce phénomène est donc particulièrement délétère pour une application en imagerie, car elle conduit à une diminution de la qualité de l'image ainsi qu'à une irradiation non désirée des tissus sains.

La résistance à la transchélation est déterminée par l'inertie cinétique du complexe et dans une moindre mesure par la stabilité thermodynamique<sup>88</sup>. La stabilité du complexe après incubation dans du sérum humain à 38°C est un bon indicateur de ce paramètre<sup>89</sup>, les produits de dégradation et de dissociation des complexes pouvant être suivis par des techniques chromatographiques.

### *b. Résistance à la réduction*

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  $\text{Cu(I)}$ <sup>90</sup>. Il existe beaucoup de couples enzymatiques capables d'effectuer cette réduction, car possédant un potentiel  $E^0$  inférieur à celui du couple  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$  (0,159 V/ESH). Cette propriété fait que le cuivre est physiologiquement impliqué dans de nombreux processus d'oxydoréduction dans l'organisme (cf. II.4.). Le complexe doit donc posséder un faible potentiel d'oxydoréduction afin de résister à l'action de ces enzymes.

La résistance des complexes de cuivre à la réduction peut être évaluée *in vitro* par voltamétrie cyclique<sup>91</sup>. Cette méthode consiste à faire varier le potentiel électrique jusqu'à obtenir la réduction complète du complexe, puis à inverser le balayage du système pour revenir à la valeur de départ. Il est ainsi possible de déterminer le potentiel  $E^0$  du complexe et d'observer si la réduction est réversible ou non.

### *c. Résistance à la transmétallation*

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  $\text{Zn}^{2+}$  et le  $\text{Fe}^{3+}$ , qui sont des oligoéléments les plus représentés 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.

## 5.4. Fonctions de couplage à un vecteur

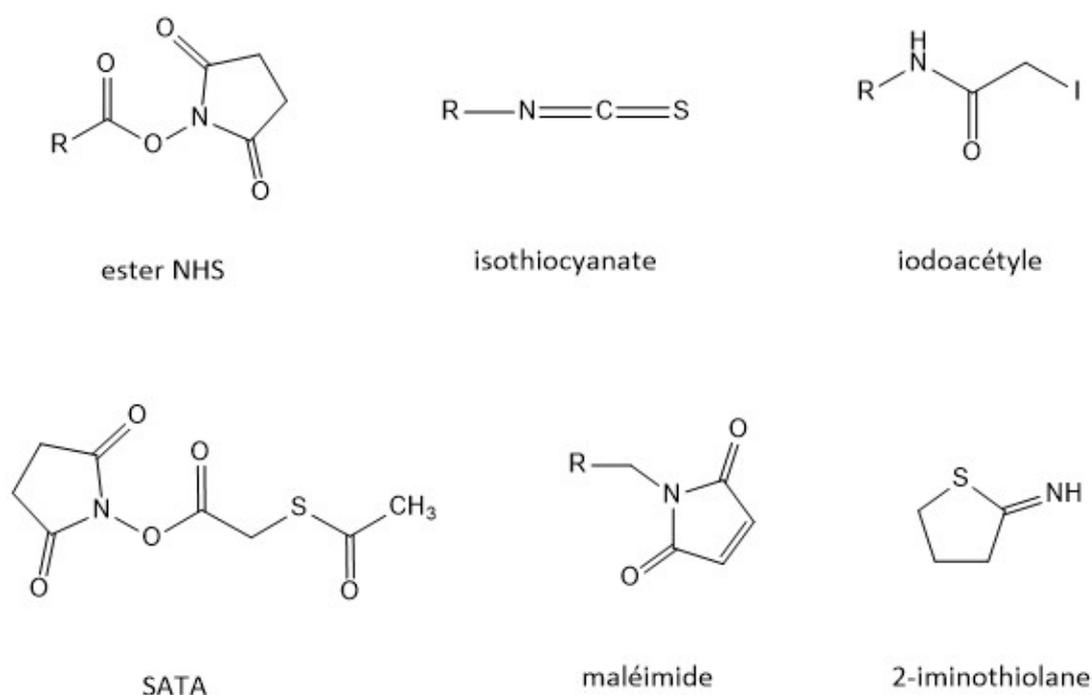
### *a. Généralités sur la fonctionnalisation des ligands*

Outre son rôle de complexation du  $^{64}\text{Cu}$ , le ligand « bifonctionnel » doit disposer d'une fonction chimique lui permettant de se lier de façon covalente au vecteur choisi<sup>92</sup>. Cette fonction doit posséder une bonne réactivité vis-à-vis le groupement d'intérêt, être si possible spécifique de ce groupement et la liaison obtenue après réaction doit être stable en conditions

physiologiques. 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*

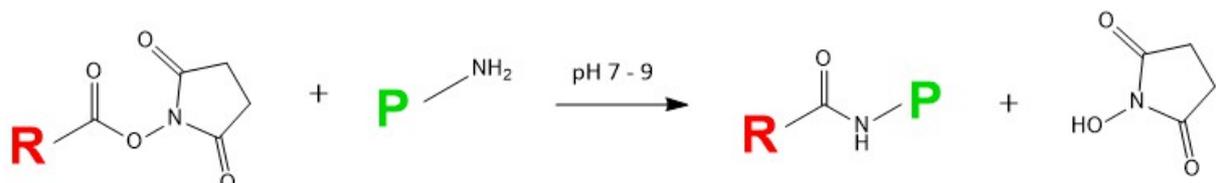
Les principales fonctions discutées ici sont présentées dans la **Figure 9**.



**Figure 9** : Représentation schématique de quelques fonctions de couplage conventionnelles ; R représentant le ligand portant la fonction.

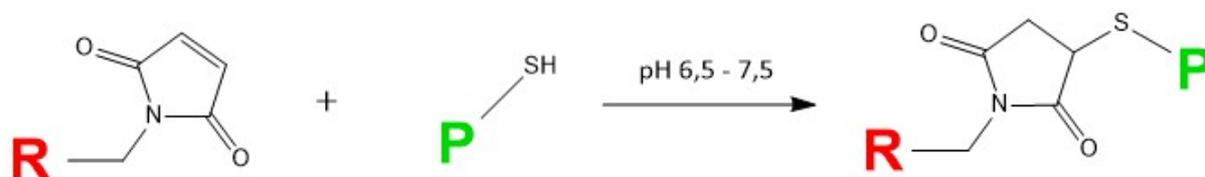
Actuellement, la voie la plus largement utilisée consiste à faire réagir la fonction de couplage au niveau des amines primaires (-NH<sub>2</sub>), majoritairement situées sur les lysines. Dans le cas d'un AcM, elles sont particulièrement intéressantes car abondantes, faciles d'accès du fait de leur position 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*-hydroxysuccinimide<sup>93</sup> (NHS, **Figure 10**) et les isothiocyanates<sup>94</sup> (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 10** : 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 sulfhydriles (-SH) ou thiols<sup>95</sup> (**Figure 11**). 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.



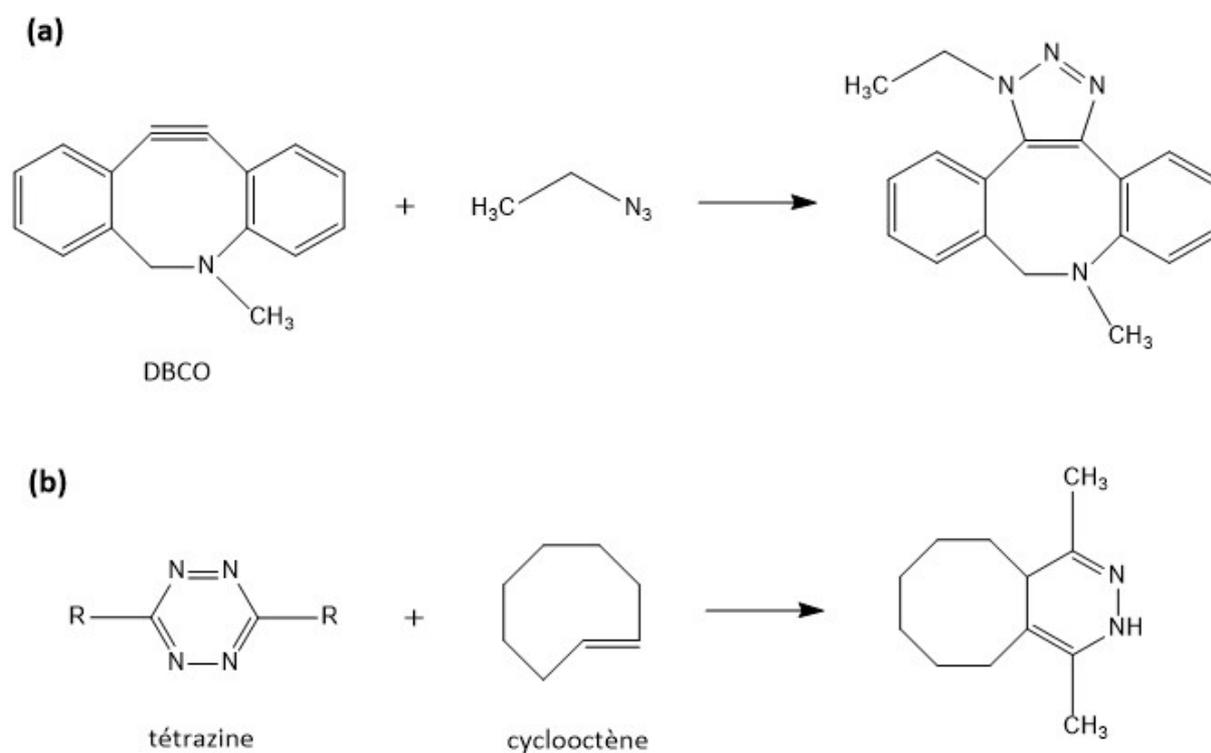
**Figure 11** : Schéma de la réaction de conjugaison entre une fonction maléimide et un sulfhydryle. R représente le ligand et P la protéine (AcM) portant la fonction réactive.

### c. Approches « 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 douces<sup>96</sup>. 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 produit *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 <sup>64</sup>Cu, on rencontre principalement deux voies de fonctionnalisation par chimie click (**Figure 12**). 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 une alcyne tendue type cyclooctyne ou dibenzocyclooctyne (DBCO) et un azoture<sup>97</sup>. 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 fait partie des réactions de cycloaddition Diels-Alder et met en jeu une réaction entre une tétrazine et un alcène tendu<sup>98</sup>. 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 contenant une tétrazine.

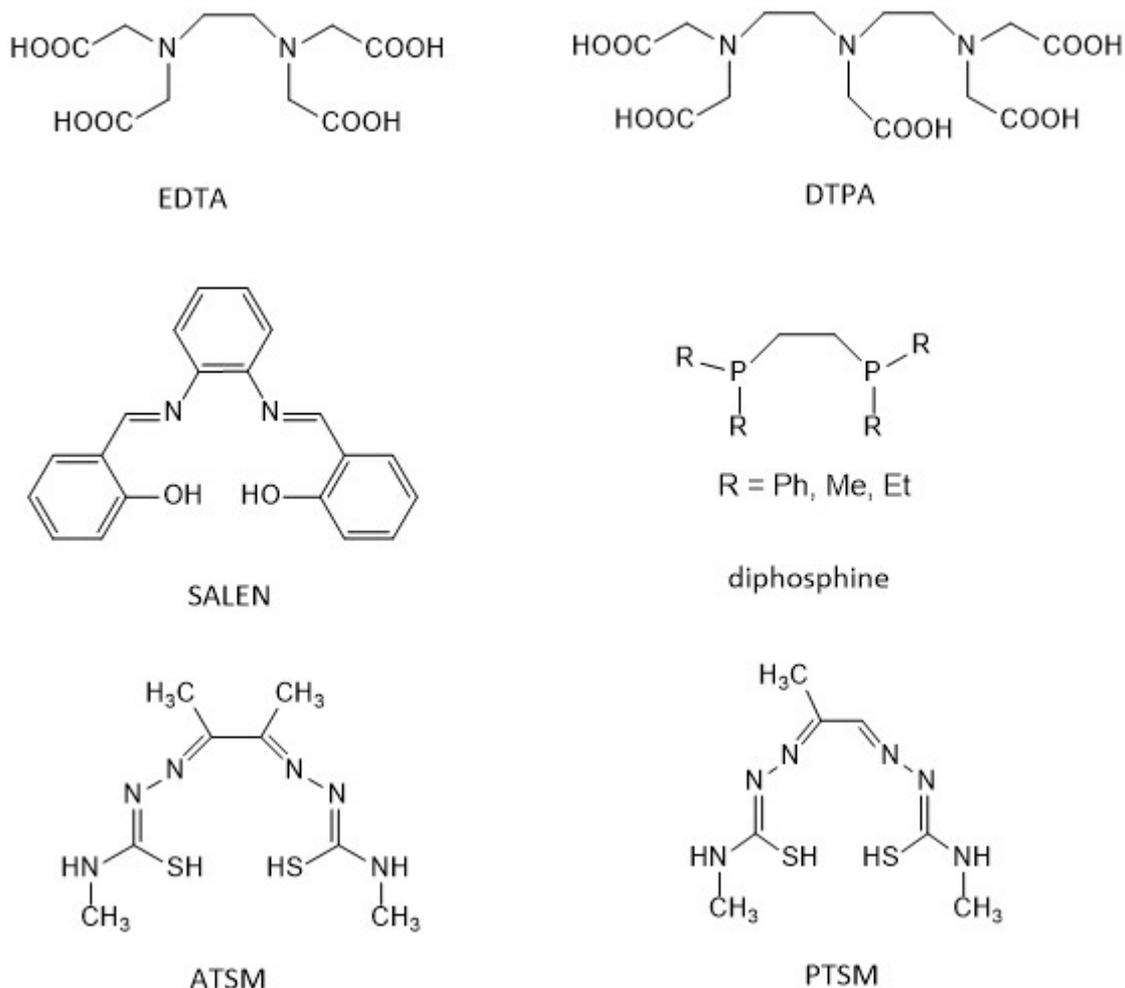


**Figure 12** : Représentation schématique de la réaction SPAAC avec l'exemple du DBCO **(a)** et de la cycloaddition Diels-Alder **(b)**.

## 5.5. Exemples de ligands du cuivre-64

### *a. Ligands acycliques*

Les premiers ligands à avoir été utilisés pour le cuivre sont des ligands acycliques polyaminocarboxylates<sup>99,100</sup> (**Figure 13**) 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<sup>89,93</sup>. D'autres ligands acycliques ont été développés pour essayer d'améliorer la stabilité des complexes de cuivre, comme les ligands à base de Schiff<sup>101</sup> (par exemple le ligand SALEN) et les ligands diphosphine<sup>102</sup>, sans toutefois parvenir à des résultats acceptables pour une application en imagerie.



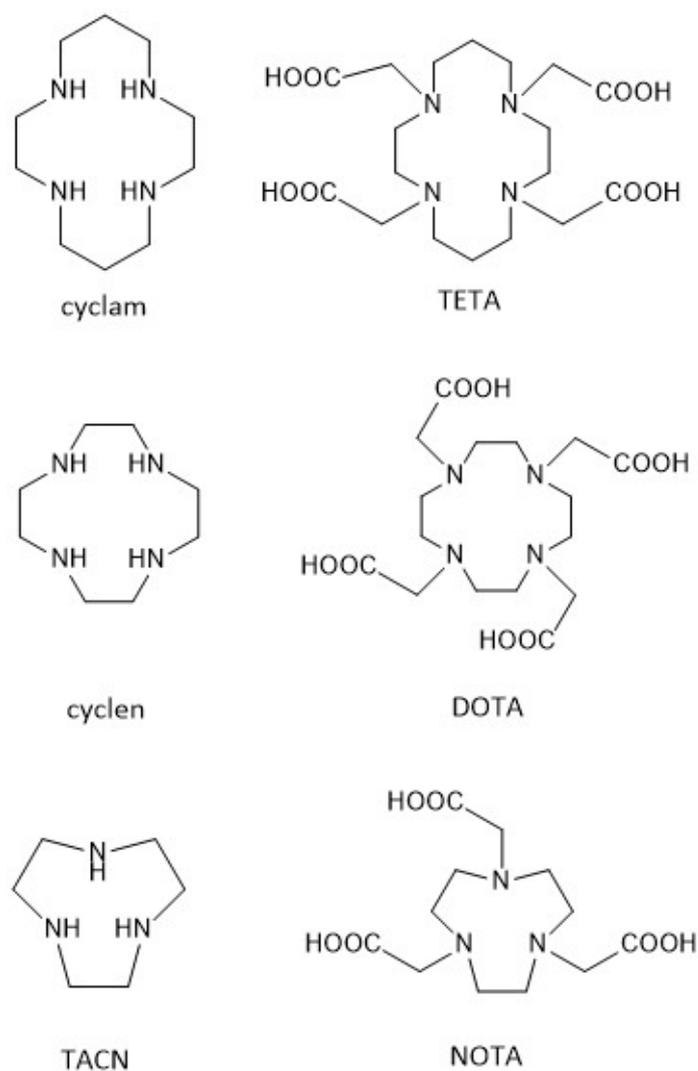
**Figure 13** : Représentation schématique des ligands acycliques EDTA, DTPA, SALEN, diphosphine, ATSM et PTSM.

Les thiosemicarbazones sont une classe de ligands acycliques comprenant l'ATSM<sup>103</sup> et le PTSM<sup>104</sup>, utilisés respectivement comme marqueurs de l'hypoxie cellulaire et du flux sanguin. 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<sup>105,106</sup>. L'ATSM complexe le cuivre sous sa forme  $\text{Cu}^{2+}$  : la molécule obtenue est lipophile et traverse facilement les membranes cellulaires. Une fois internalisée, se produit une réduction du  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  conduisant à un complexe  $\text{Cu(I)-ATSM}$  instable. Dans une cellule normoxique, le  $\text{Cu(I)-ATSM}$  est à nouveau oxydé en  $\text{Cu(II)-ATSM}$  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 cellule<sup>107</sup>.

### *b. Ligands azamacrocycliques*

Les cyclam et les cyclen sont des tétraazamacrocycles, soit des macrocycles comportant quatre atomes d'azote. Le triazacyclononane (TACN) quant à lui est un azamacrocycle ne comportant que trois azotes. Les cycles de base peuvent être modifiés par une ou plusieurs fonctions chimiques participant à la coordination du cuivre, comme par exemple des fonctions acétates (**Figure 14**). 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 acycliques, notamment grâce à « l'effet macrocyclique »<sup>87</sup>.

Les trois ligands présentés précédemment sont les « chefs de file » de cette classe : le DOTA, le TETA et le NOTA (**Tableau 3**). Les fonctions acétates présentes sur les cycles ne participent pas toutes à la coordination du cuivre, et présentent donc un intérêt lors de la synthèse de ligand bifonctionnel. L'introduction d'une fonction permettant la liaison au vecteur sur une de ces fonctions ne nuit théoriquement pas à la stabilité des complexes. Le DOTA a été largement utilisé pour le développement d'anticorps radiomarqués au <sup>64</sup>Cu en imagerie<sup>108-110</sup> et est pour le moment le seul ligand du <sup>64</sup>Cu ayant été testé en clinique humaine<sup>111-114</sup>. 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 ou trivalents. 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 hépatiques<sup>87</sup>. Enfin, le NOTA s'est avéré, lors d'études *in vivo*, plus stable cinétiquement que ses deux homologues<sup>115,116</sup>.



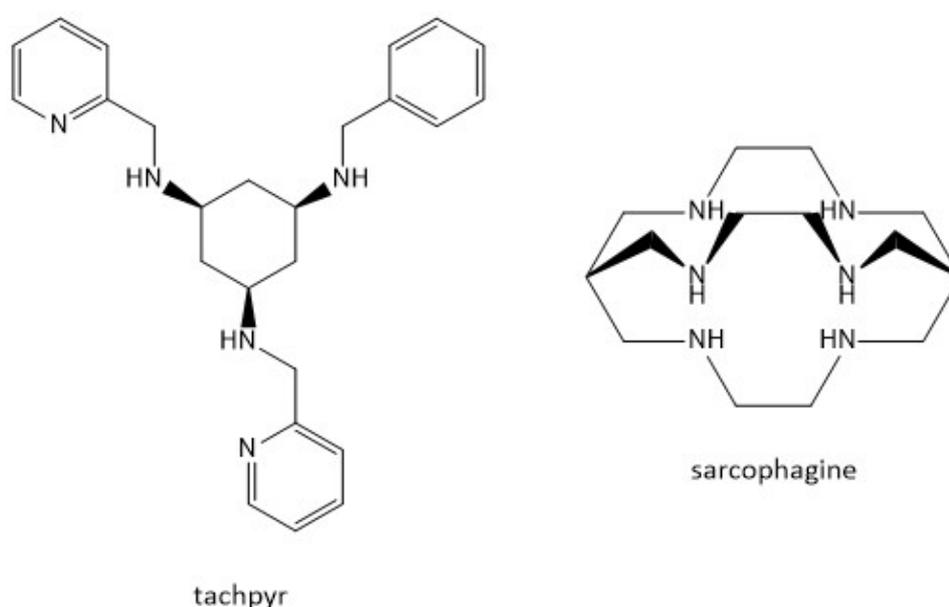
**Figure 14** : Représentation schématique des bases cyclam, cyclen et TACN, ainsi que des ligands DOTA, NOTA et TETA.

Ligand	Géométrie du complexe	Log $\beta_n$	Inertie cinétique en milieu acide : $T_{1/2}$	Potentiel de réduction (réversibilité Cu(II)/Cu(I))
<b>DOTA</b>	Octaédrique	22,2	< 3 min (HCl 5 M ; 90°C)	-0,74 V (irréversible)
<b>TETA</b>	Octaédrique	21,9	< 3 min (HCl 5 M ; 90°C)	-0,98 V (irréversible)
<b>NOTA</b>	Prisme trigonal	21,6	< 3 min (HCl 5 M ; 30°C)	-0,70 V (irréversible)

**Tableau 3** : Quelques propriétés chimiques des complexes Cu-DOTA, Cu-TETA et Cu-NOTA<sup>117</sup>.

### c. Ligands dérivés du triaminocyclohexane

Les ligands dérivés du triaminocyclohexane sont des ligands dits tripodaux (**Figure 15**) : ils comportent trois amines qui elles-mêmes sont fonctionnalisées avec des dérivés capables d'engager des liaisons de coordinance avec le métal, comme fonctions anilines (dans le cas du ligand tachpyr)<sup>118</sup>. 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 <sup>64</sup>Cu reste pour l'instant limitée<sup>119</sup>.



**Figure 15** : Représentation schématique des ligands tachpyr et sarcophagine.

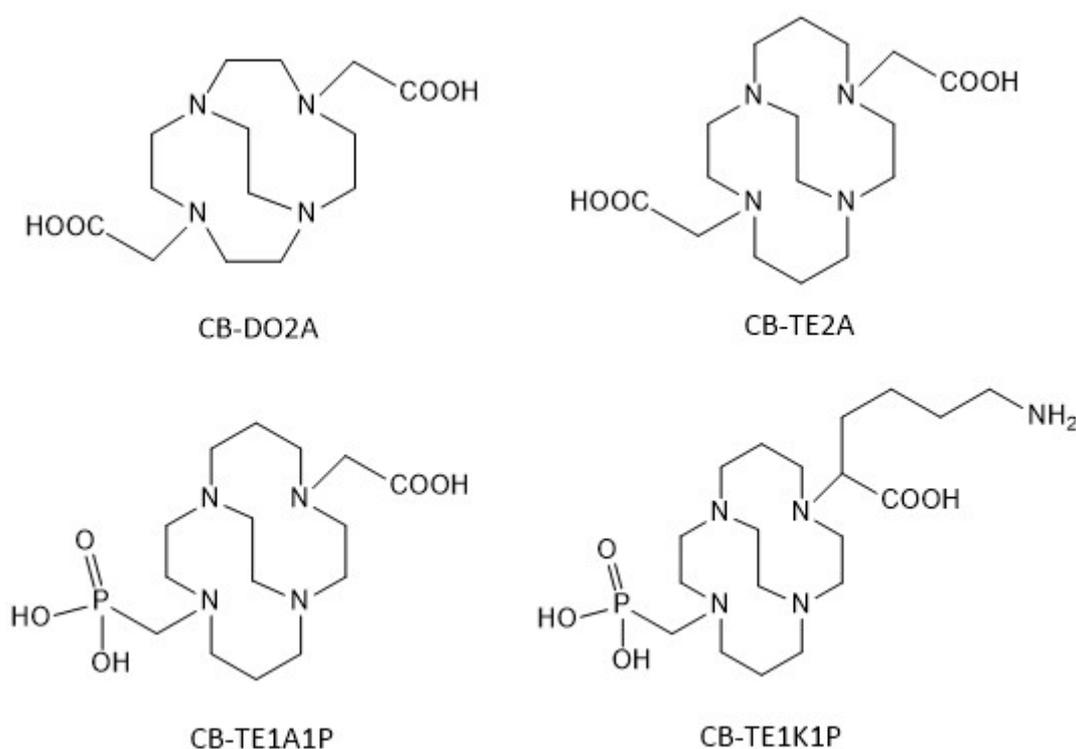
### d. Ligands type sarcophagine

Les sarcophagines sont des ligands macrocycliques type hexaamine dérivés du TETA, ayant une structure en forme de « cage pontée » qui leur octroie une plus grande stabilité thermodynamique que les ligands tétraamine<sup>120</sup>. Ils possèdent une bonne sélectivité pour le cuivre et mais leur cinétique de complexation est lente à température ambiante. Cependant,

peu d'études sur ces ligands ont été réalisées, principalement du fait de la difficulté de leur synthèse organique<sup>121</sup>.

*e. Ligands pontés du cyclam et du cyclen*

Appelés macrobicycliques, les ligands dits *cross-bridged* (CB) présentent une fonction éthyle qui relie les amines N<sub>1</sub> et N<sub>4</sub> (**Figure 16**). Les deux principaux ligands de ce groupe sont le CB-DO2A (version pontée du DOTA) et le CB-TE2A (version pontée du TETA). Leur stabilité thermodynamique mesurée *in vitro* est supérieure à celle de leurs équivalents non pontés ( $\log \beta_n = 27,1$  pour le Cu-CB-TE2A contre 21,9 pour le Cu-TETA) et leur inertie cinétique est excellente, notamment en milieu aqueux<sup>90,122,123</sup>. La résistance à la réduction Cu(II)/Cu(I) du Cu-CB-TE2A a également été démontrée<sup>124</sup>.



**Figure 16** : 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 rapide<sup>122</sup>.

De façon générale, les ligands CB s'avèrent être plus stables *in vivo* que leurs versions non pontées et résistent mieux à la transchélation<sup>125</sup>. 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 thermolabiles<sup>85</sup>.

Des études ont été menées pour contourner ce problème, notamment en remplaçant une des fonctions acides carboxyliques du macrocyclique par un acide phosphorique (CB-TE1A1P), permettant le radiomarquage à température ambiante<sup>126</sup>. Le CB-TE1K1P est une version fonctionnalisée du CB-TE1A1P<sup>127</sup>. Ce ligand a été couplé au cétuximab (un antagoniste du récepteur du facteur de croissance épidermique).

## 6. Exemples d'applications en clinique et pré-clinique

A l'heure actuelle, aucun radiopharmaceutique à base de <sup>64</sup>Cu n'a obtenu d'AMM. Le <sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub> (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 <sup>64</sup>Cu dans le développement de la théranostique.

### 6.1. Anticorps monoclonaux et peptides

Trois AcM principaux de type IgG<sub>1</sub> marqués au <sup>64</sup>Cu sont en cours de développement pour des applications en oncologie.

#### *a. Trastuzumab*

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 <sup>64</sup>Cu-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-injection<sup>128-130</sup>. De plus, une étude clinique a montré que le <sup>64</sup>Cu-DOTA-trastuzumab s'accumulait également au niveau des métastases cérébrales du cancer HER2 positif<sup>33</sup>, suggérant un passage du radiopharmaceutique à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE). Les AcM étant trop hydrophiles et trop volumineux pour traverser la BHE<sup>131</sup>, il est admis que ce passage est 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 utilisés<sup>132</sup>, comme par exemple le <sup>64</sup>Cu-DOTA-ZHER2:S1. Avec leur petite taille couplée à une haute affinité pour leur cible, 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.

#### *b. Cétuximab*

Le cétuximab est dirigé contre le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR). L'EGFR fait partie de la famille des récepteurs transmembranaires à tyrosine kinase et sa dérégulation est impliquée dans plusieurs mécanismes d'oncogénèse, comme la croissance cellulaire tumorale, l'angiogénèse et le développement de métastases<sup>133,134</sup>. Il est surexprimé dans de nombreuses tumeurs chez l'homme<sup>135,136</sup> 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 <sup>64</sup>Cu-DOTA-cétuximab pour les tumeurs EGFR positives<sup>134-136</sup>.

Tout comme l'HER2, l'EGFR peut également être ciblé avec des fragments d'AcM<sup>137</sup> ou des peptides radiomarqués au <sup>64</sup>Cu. 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 GE11<sup>138</sup> (prouvé non adapté car formant des agrégats) ainsi que le rEgA, un repebody (un peptide comportant des domaines répétés riches en leucine), qui a démontré un ciblage rapide et spécifique des tumeurs<sup>139</sup>.

### *c. Daratumumab*

Le daratumumab<sup>140-142</sup> 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<sup>143,144</sup> et qui est une cible de choix pour l'imagerie de cette pathologie. Le <sup>64</sup>Cu-DOTA-daratumumab a été comparé dans un modèle murin au <sup>18</sup>F-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'image<sup>111</sup>. Ces résultats découlent de l'hétérogénéité tumorale forte du myélome multiple (cf. III.1.5.).

## 6.2. Analogues des récepteurs à la somatostatine

La somatostatine est une hormone peptidique impliquée dans l'inhibition et la régulation de nombreuses autres hormones, notamment l'hormone de croissance<sup>145</sup>. 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 somatostatine, ce qui font de ces derniers une cible intéressante pour l'imagerie ainsi que pour la thérapie. En effet, la somatostatine et ses analogues agonistes sont rapidement internalisés après leur liaison au récepteur actif, supprimant le signal de transcription et inhibant la croissance cellulaire<sup>146,147</sup>. 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). L'octéotide possède une plus longue demi-vie biologique que la somatostatine et inhibe le développement tumoral de façon plus prononcé<sup>148</sup>. L'Octreoscan est de moins en moins utilisé à l'heure actuelle, remplacé par la TEP au <sup>68</sup>Ga-DOTA-TOC, qui permet une meilleure détection des tumeurs<sup>149</sup>. 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 <sup>64</sup>Cu permettraient de s'affranchir de cet inconvénient.

Une première étude sur un modèle de rats a démontré la faisabilité du <sup>64</sup>Cu-TETA-D-Phe<sup>1</sup>-octréotide<sup>146,150</sup>. Le <sup>64</sup>Cu-TETA-D-Phe<sup>1</sup>-octréotide y a présenté une meilleure qualité

d'image que son homologue radiomarqué à l'indium-111, partiellement due à la plus grande sensibilité de la TEP par rapport à la TEMP. D'autres analogues avec des profils de reconnaissance différents de l'octréotide et/ou des pharmacocinétiques différentes ont ensuite été développés pour pallier la faible clairance sanguine de ce dernier ainsi que sa dissociation rapide de la tumeur. On retrouve ainsi notamment le Tyr<sup>3</sup>-octréotide (Y3-OC) et le Tyr<sup>3</sup>-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<sup>151,152</sup>.

Au niveau clinique, le <sup>64</sup>Cu-DOTA-TATE a été évalué par rapport à l'Octreoscan pour la détection des tumeurs neuroendocrines<sup>153</sup>. Une étude menée sur 59 patients atteints de tumeurs endocrines a également montré que le <sup>64</sup>Cu-DOTA-TATE permettait de détecter un plus grand nombre de lésions par rapport au <sup>68</sup>Ga-DOTA-TOC<sup>113</sup>.

### 6.3. 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 tumoral<sup>154</sup>. 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* la néoangiogenèse<sup>155,156</sup>. 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 mélanome<sup>157-160</sup>. 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 aspartique<sup>161</sup> (RGD). Des dérivés de cette séquence ont donc été développés pour le radiomarquage au <sup>64</sup>Cu<sup>107,162,163</sup>.

### 6.4. 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 métastatiques<sup>164</sup>. 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. Si le plus utilisé à l'heure actuelle est le  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11<sup>165,166</sup>, il souffre des mêmes inconvénients inhérents à la faible demi-vie du gallium-68. En conséquence, d'autres analogues radiomarqués au  $^{64}\text{Cu}$  ont été étudiés. Parmi eux, le PSMA-617, qui a été radiomarqué au  $^{64}\text{Cu}$  mais également au  $^{68}\text{Ga}$  et à l' $^{111}\text{In}$ <sup>167-169</sup>. Un essai clinique du  $^{64}\text{Cu}$ -PSMA-617 a montré une excellente détection des tumeurs prostatiques<sup>170</sup>, avec une spécificité proche de 100 %. Outre cette application, le  $^{64}\text{Cu}$ -PSMA-617 peut être utilisé dans l'imagerie d'autres tumeurs solides, comme le cancer de l'estomac et le cancer du côlon<sup>171</sup>.

#### 6.5. Chlorure de cuivre-64

Le  $^{64}\text{Cu}$  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 prostate<sup>172-174</sup>. En effet, ces tumeurs présentent une surexpression de la protéine de transport du cuivre 1 (Ctr1), sur laquelle va se fixer le  $^{64}\text{Cu}$ <sup>175</sup>. Il s'agit ainsi non pas d'imagerie phénotypique, mais d'imagerie métabolique. Il a été montré une meilleure détection des tumeurs du cancer de la prostate sur une étude clinique comparative entre le  $^{64}\text{CuCl}_2$  et le  $^{18}\text{F}$ -FDG<sup>176</sup>. 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 cérébrale<sup>173</sup>.

### III. UN MODÈLE POUR L'ÉTUDE DU MYÉLOME 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 osseuse<sup>177</sup>. Toutes les cellules du clone 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, qui est de plus 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 MM<sup>178</sup>. 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 CRAB<sup>179</sup> :

C : hyper**Calcémie**

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'imagerie<sup>180</sup>. Au niveau sanguin, le dosage total des protéines met en évidence une hyperprotidémie. Une électrophorèse des protéines plasmatiques (EPP) est réalisée, 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. Un myélogramme sur biopsie médullaire est également pratiqué afin de quantifier l'infiltration plasmocytaire.

L'examen de référence en imagerie est la radiographie standard<sup>181</sup>, qui permet d'évaluer l'étendue des lésions osseuses. Elles se présentent le plus souvent sous forme

lacunaire dite à « l'emporte-pièce », 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...).

L'IRM conventionnelle est utilisée pour évaluer l'infiltration médullaire tumorale<sup>182</sup>. 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.

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 malignité<sup>183</sup>. 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 débuter 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 bortezomib<sup>183</sup>. A noter que la réalisation d'une autogreffe de cellules souches permet d'augmenter les doses de cytotoxiques administrées<sup>184</sup>.

D'autres approches classiques peuvent être utilisées. La radiothérapie externe permet de cibler les tumeurs osseuses, notamment en cas de risque de complications (type 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 positif<sup>181</sup>.

L'imagerie fonctionnelle obtenue grâce à la TEP offre ainsi une approche intéressante. Le <sup>18</sup>F-FDG permet d'évaluer l'activité métabolique des lésions en se fixant au niveau des plasmocytes<sup>185</sup> : en conséquence, seuls les MM actifs seront détectés par cette méthode. La TEP/CT au <sup>18</sup>F-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<sup>186-188</sup>. 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 <sup>18</sup>F-FDG ainsi que les lésions quiescentes<sup>189,190</sup>. 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 visualiser<sup>191</sup>. 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 <sup>18</sup>F-FDG dans les cellules myélomateuses<sup>192</sup>. 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 osseuse<sup>193</sup>. 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  $^{68}\text{Ga}$ . 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 tumeur<sup>194</sup>.

D'autres marqueurs ont été étudiés dans le cadre d'essais cliniques et pré-cliniques : le CD38<sup>111,141</sup> 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 MM<sup>195</sup>. Ces dernières présentent une surexpression quasi-constante du CD138, qui semble impliqué dans divers mécanismes de l'oncogenèse telles la prolifération cellulaire et l'angiogenèse<sup>196</sup>. En conséquence, 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<sup>197,198</sup>.

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  $^{18}\text{F}$ -FDG. Des essais sur des modèles pré-cliniques ont montré son potentiel d'utilisation pour le diagnostic du MM<sup>35,199,200</sup>.

## 2.2. Production et propriétés

Le 9E7.4 est un anticorps monoclonal de type IgG<sub>2aκ</sub> produit au sein de l'équipe 13 du CRCINA<sup>200</sup>. 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<sup>200</sup>. 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 radiomarqué 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

Comme vu en II.5., le <sup>64</sup>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 dit « 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 est l'association entre la molécule d'intérêt et le radionucléide : ici, il s'agit de la réaction de complexation du <sup>64</sup>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 radiomarqué 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.

#### IV. CONCLUSION

L'imagerie phénotypique-TEP est ainsi un outil prometteur pour le diagnostic et la prise en charge des patients en oncologie. Son approche de ciblage de marqueurs exprimés par la tumeur est très utile pour l'imagerie de certains types de cancers, tel le myélome multiple, pour lesquels les informations fournies par l'imagerie métabolique ou morphologique sont limitées. L'immuno-TEP est aussi adaptée en tant qu'outil diagnostique pour les approches innovantes dites « théranostiques ». Elle permet alors l'optimisation de la thérapie ciblée, qu'elle soit par le biais d'AcM seuls ou bien radiomarqués par des émetteurs  $\beta^-/\alpha$  dans le cadre de la radioimmunothérapie.

Bien que les AcM soient les vecteurs les plus utilisés à l'heure actuelle, de nombreuses autres molécules biologiques ont été développées dans l'optique d'une utilisation par immuno-TEP. Ces vecteurs présentent une grande variété de tailles et de propriétés, permettant de construire le radiopharmaceutique le plus adapté en fonction de la cellule tumorale à cibler. De même, il existe plusieurs radionucléides émetteurs de positons pouvant être utilisés en immuno-TEP, leurs propriétés physiques et chimiques variées leur permettant de s'adapter au mieux au vecteur choisi. Parmi eux, le cuivre-64 se montre particulièrement intéressant, étant de plus facilement disponible de par sa production en cyclotron.

Le cuivre-64 nécessite un ligand bifonctionnel pour permettre son radiomarquage à un vecteur biologique. Celui-ci doit remplir un certain nombre de conditions pour pouvoir envisager son utilisation en routine clinique pour l'immuno-TEP. Les ligands du cuivre-64 disponibles à l'heure actuelle ne satisfont pas complètement ces exigences, et tout particulièrement en ce qui concerne la résistance à la transchéliation, un des paramètres clés de la stabilité *in vivo* des complexes de cuivre. Il est donc d'un intérêt certain de développer des ligands du cuivre plus performant pour une application en immuno-TEP. C'est dans cet optique que s'inscrit le travail expérimental suivant, par le biais d'un modèle d'AcM d'intérêt en imagerie du myélome, le 9E7.4.



---

**DEUXIÈME PARTIE :**  
**EXPÉRImentation *IN VITRO***

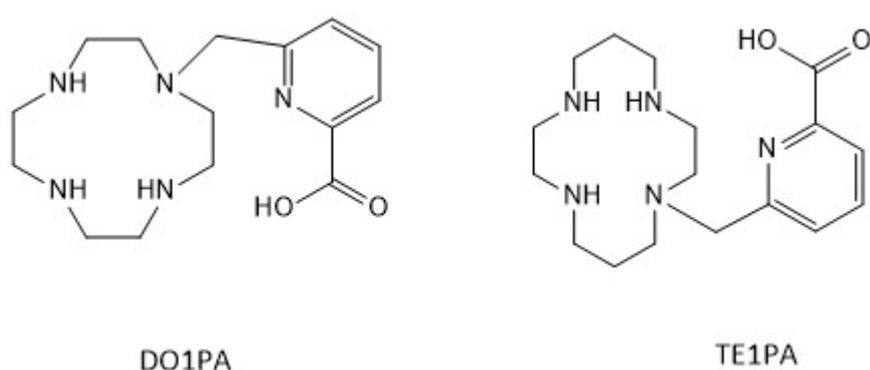
---

## I. INTRODUCTION

### 1. Présentation des ligands picolinates

L'acide picolinique, aussi appelé acide picolique ou acide pyridine-2-carboxylique, est un dérivé aromatique composé d'un noyau pyridine substitué par un groupement carboxyle en position 2, dont la base conjuguée est le picolinate. Il possède au niveau physiologique un rôle de chélateur bidentate de certains ions divalents, comme le chrome, le zinc, le manganèse, le cuivre, le fer ou encore le molybdène<sup>201</sup>. Des azamacrocycles fonctionnalisés par l'acide picolinique avaient initialement été synthétisés pour chélater les lanthanides sous forme +III, mais également des cations divalents comme le cadmium, le zinc et le plomb<sup>202,203</sup>. L'acide picolinique étant capable de chélater les cations, sa présence au niveau du cycle aide à la formation des complexes et permet d'améliorer leur stabilité ainsi que la cinétique de complexation, particulièrement à pH acide<sup>204</sup>. De plus, ces complexes sont presque tous solubles dans l'eau, ce qui est un prérequis essentiel pour envisager ensuite une application comme élément d'un radiopharmaceutique.

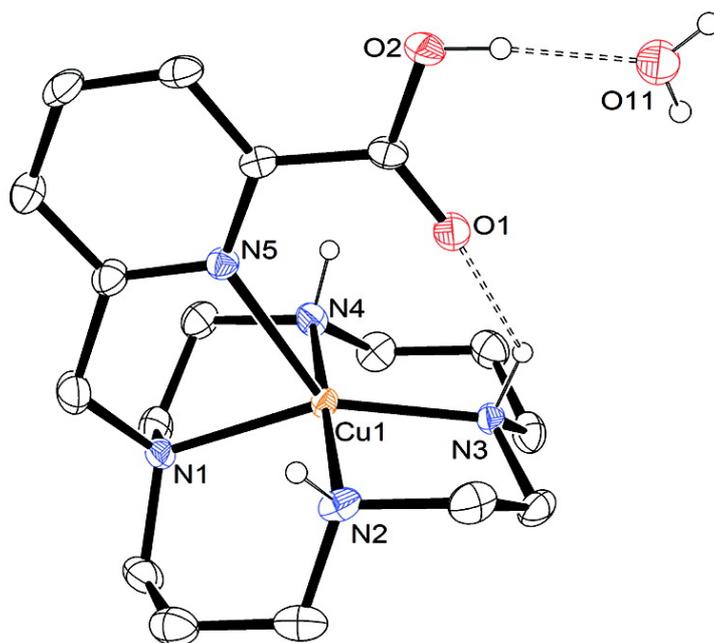
Connaissant ces propriétés, l'équipe COSM de l'Université de Brest (UMR CNRS 6521) a synthétisé deux ligands azamacrocycliques avec un dérivé acide picolinique : le DO1PA (dérivé cyclen) et le TE1PA (dérivé cyclam), afin d'en étudier les propriétés de chélation du  $\text{Cu}^{2+}$  (**Figure 17**)<sup>91</sup>.



**Figure 17** : Représentation simplifiée des ligands DO1PA et TE1PA.

Le TE1PA en particulier s'est avéré un excellent ligand pour le  $\text{Cu}^{2+}$ , avec d'intéressantes propriétés. Il possède tout d'abord une cinétique de complexation rapide et

quantitative à pH > 2. La constante de stabilité thermodynamique ( $\log \beta_n$ ) pour les complexes  $[\text{Cu-TE1PA}]^+$  est de 25,5, contre 18,86 pour les complexes  $[\text{Zn-TE1PA}]^+$  : cela démontre une excellente sélectivité du TE1PA pour le  $\text{Cu}^{2+}$  par rapport au  $\text{Zn}^{2+}$ , qui est le cation le plus susceptible de provoquer des transmétalements *in vivo* (cf. première partie II.5.3.). La demi-vie du complexe de  $[\text{Cu-TE1PA}]^+$  dans l'HCl 1 M à 25°C est de 32 min, impliquant une inertie en milieu acide bien meilleure que les complexes analogues formées avec DOTA, le TETA ou le NOTA (**Tableau 3**). Le processus de réduction du Cu(II) complexé en Cu(I) est quasi-réversible et il a aussi été démontré que les complexes du TE1PA avec le  $\text{Cu}^+$  ne se dissociait que faiblement à pH physiologique (7,3). Enfin, les études cristallographiques ont montré que le complexe  $[\text{Cu-TE1PA}]^+$  possédait une géométrie pyramidale à base carrée distordue, avec les 4 azotes du macrocycle définissant la base de la pyramide, et l'azote du groupement picolinate la pointe (**Figure 18**).



**Figure 18** : Schéma de la structure tridimensionnelle du complexe  $[\text{Cu-TE1PA}]^+$ .

Tous ces résultats ont prouvé que le TE1PA possède un excellent potentiel comme chélateur du cuivre-64. Afin de savoir s'il conservait ses propriétés en milieu biologique, une

collaboration est née entre l'équipe COSM de l'UMR 6521 CRNS et le CRCINA de l'UMR Inserm 1232. L'étude a été menée en comparaison avec le DOTA comme ligand de référence ainsi que l'acétate de cuivre. La stabilité sérique des complexes a été évaluée, puis une étude de biodistribution et de métabolisme hépatique a été réalisée dans chez la souris<sup>205</sup>. Les résultats ont démontré la stabilité des complexes  $[^{64}\text{Cu-TE1PA}]^+$  *in vivo* et particulièrement sa résistance à la transchélation, en comparaison avec les complexes de DOTA.

Ces tests préliminaires reposaient uniquement sur le complexe 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-embryonnaire<sup>206</sup> (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  $^{64}\text{Cu-F6-TE1PA}$  ne semble pas supplanter celle du  $^{64}\text{Cu-F6-DOTA}$ , alors que le  $^{64}\text{Cu-TE1PA}$  seul s'était avéré plus stable que le  $^{64}\text{Cu-DOTA}$ .

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 COSM 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 vecteur<sup>207</sup> (**Figure 19**).

## 2. Objectifs de l'étude *in vitro*

Ce travail intervient ainsi à la suite de l'étude des ligands picolinates et se concentre sur la version C-fonctionnalisée du TE1PA, le NCS-TE1PA. Il s'articule autour de deux axes principaux de recherche :

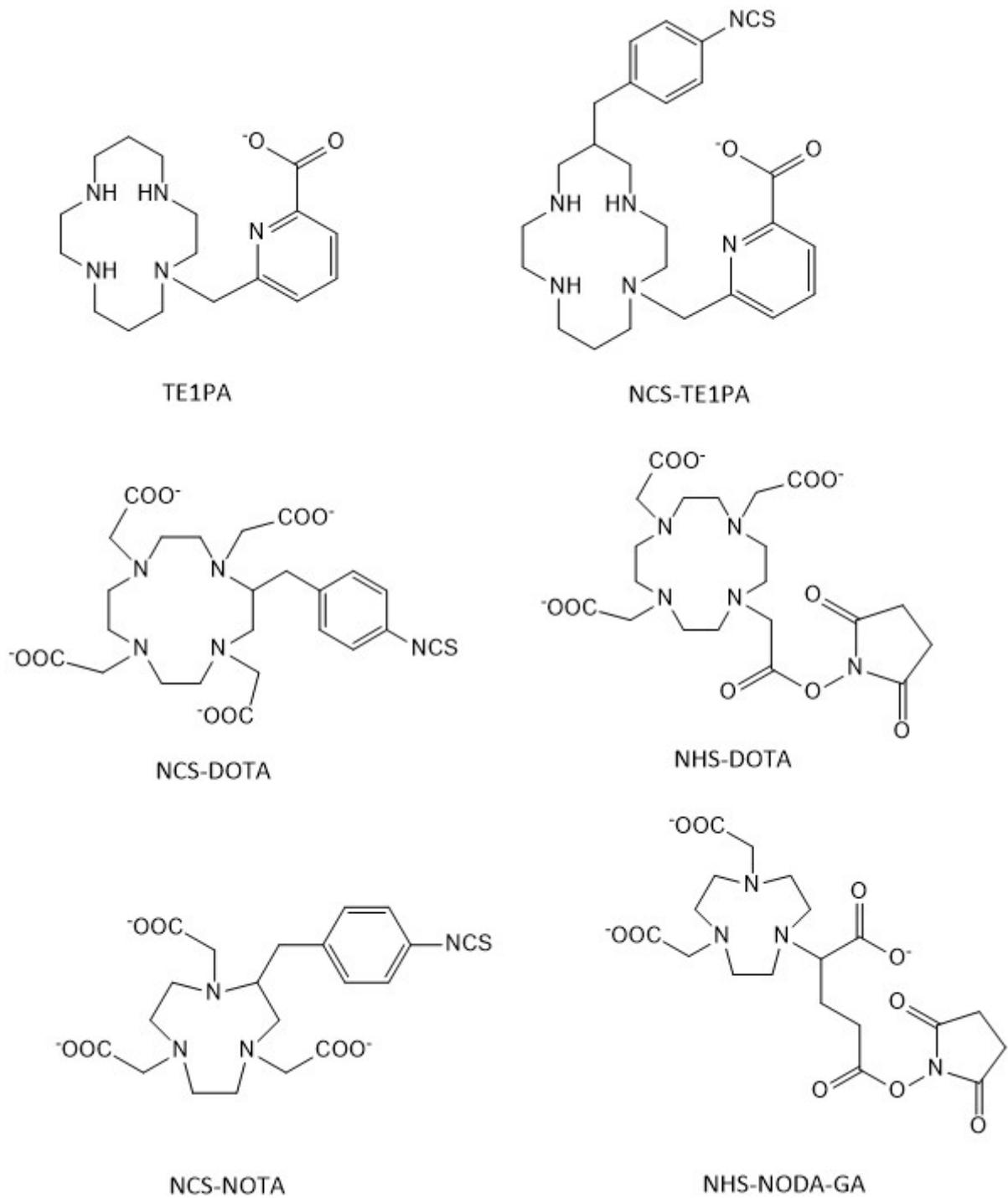
- Mettre au point le couplage du NCS-TE1PA à un AcM et caractériser l'immunoconjugué obtenu par des radiomarquages tests, afin de valider le NCS-TE1PA comme un ligand du cuivre-64 utilisable pour une application en imagerie. Deux principaux critères seront évalués, le nombre de ligands couplés par AcM (qui conditionne l'activité molaire spécifique du radiopharmaceutique final) et l'immunoréactivité (soit la proportion de l'AcM ayant conservé ses propriétés de reconnaissance de la cible après couplage et radiomarquage).

- Etudier les ligands commerciaux disponibles afin d'élaborer un modèle proche de celui obtenu avec le 9E7.4-NCS-TE1PA, dans le but de conduire ensuite une étude comparative *in vivo*.

L'AcM choisi pour cette étude est le 9E7.4 (cf. première partie III.3.) ; outre ses applications potentielles en imagerie, les propriétés de cet anticorps sont bien connues et il est facilement disponible au sein de l'équipe 13 du CRCINA où ces études ont été réalisées<sup>200</sup>. Il dispose en plus d'un modèle murin de greffe syngénique de myélome multiple, utile pour l'étape *in vivo* qui suivra. En outre, un second AcM a été utilisé pour la mise au point du couplage du NCS-TE1PA, afin de valider la méthode sur deux types d'anticorps. Il s'agit de l'Epratuzumab, un anti-CD22 de type IgG<sub>1</sub>.

S'il n'existe pas de consensus sur le ligand azamacrocycle de référence du cuivre, le DOTA a été choisi de par sa très large utilisation pour la recherche préclinique en imagerie phénotypique au <sup>64</sup>Cu, mais également car étant pour l'instant le seul à avoir été utilisé en clinique humaine<sup>108-114</sup>. Le deuxième ligand choisi, le NOTA, est également beaucoup utilisé et censé présenter une stabilité *in vivo* supérieure à celle du DOTA<sup>115,116</sup>. Pour chaque ligand, nous avons choisi un dérivé NHS et un dérivé NCS, les deux fonctions réagissant avec les amines primaires de l'AcM. Un dérivé maléimide du DOTA, qui réagit avec les fonctions thiols, a également été inclus. Les ligands utilisés lors de cette étude sont schématisés dans la **Figure 19**.

A noter que par soucis de simplification, les nomenclatures des immunoconjugués et radioimmunoconjugués ne précisent pas la charge globale des complexes.



**Figure 19** : Les ligands utilisés lors de l'étude *in vitro*.

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Matériel

#### 1.1. Produits chimiques

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 SNHS (*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).

#### 1.2. Anticorps 9E7.4 et ligands

L'anticorps 9E7.4 a été produit au sein du laboratoire<sup>200</sup> (cf. première partie 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 6521<sup>207</sup>.

#### 1.3. Système chromatographique

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.

#### 1.4. Isotopes radioactifs

Le <sup>64</sup>Cu a été obtenu sous forme de chlorure de <sup>64</sup>Cu en solution dans du HCl 0,1 M. Il a été produit par le cyclotron ARRONAX localisé à Saint-Herblain<sup>63</sup>. 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).

L'iode-125 a été obtenu après de Perkin Elmer dans une solution d'hydroxyde de sodium à  $10^{-5}$  M ( $\text{Na}^{[125\text{I}]}$ ) avec une activité volumique de 1,85 MBq/ $\mu\text{L}$  à la date de calibration.

## 2. Couplage

### 2.1. Préparation de l'AcM

L'AcM 9E7.4 est conservé à 4°C dans du PBS (phosphate buffer saline) 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, seuil de filtration 30 kD) par 3 cycles de centrifugation à 2000 g (centrifuge 2-16KP, Sigma) d'une durée 6 minutes chacun. Entre chaque cycle, la cuve est complétée à 5 mL avec un tampon carbonate 0,3 M (pH 8,6). La concentration de la solution est ensuite ajustée entre 2 et 4 mg/mL par deux nouveaux cycles de centrifugation. 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. Cette technique de mise en forme de l'anticorps ne provoque pas d'altération, puisque chaque fois que cette manipulation a été réalisée, les chromatogrammes UPLC ne montraient qu'un seul pic au temps de rétention  $t_r = 2,94$  min, soit le même pic obtenu sur l'AcM avant conditionnement. Une alternative à cette technique a parfois été utilisée, avec un conditionnement de l'anticorps basé sur une chromatographie d'exclusion-diffusion dans la solution tamponnée désirée suivie d'une seule ultrafiltration dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Les deux techniques ont donné les mêmes résultats ; toutefois, la seconde permet un gain de temps lorsque l'on utilise de grandes quantités d'AcM.

## 2.2. 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 (sauf mention contraire dans les résultats). La solution est ensuite incubée pendant 12 h à 25°C sous agitation.

Cette technique a été préférée à une dilution des ligands dans un solvant organique soluble dans l'eau comme le DMF ou le DMSO. En effet, les ligands utilisés sont solubles dans l'acide chlorhydrique dilué, un milieu où les fonctions de couplage ne sont pas dégradées de façon significative durant le temps de leur préparation. Les solvants organiques peuvent également provoquer la précipitation des protéines en fonction de volumes ajoutés.

## 2.3. TE1PA non fonctionnalisé

Le TE1PA nécessite une étape préalable d'activation au niveau du groupement carboxylate de la fonction picolinate<sup>206</sup>. Pour cela, le TE1PA, l'EDC et le SNHS sont dissous dans un tampon MES 50 mM (pH 5). Cette solution est tamponnée en raison du pKa du MES (6,5) et le pH a été ajusté à 5 afin de limiter la dégradation trop rapide de l'ester picolinique formé. L'ester n'étant pas facilement isolable des produits de réaction, il a été choisi d'utiliser la solution réactionnelle brute pour le couplage sur l'anticorps. 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 conditionné en tampon carbonate 0,1 M (pH 8,6) en suivant un ratio de 500 équivalents molaires de ligands pour 1 équivalent molaire d'AcM (sauf mention contraire dans les résultats). La solution est alors incubée pendant 12 h à 4°C.

## 3. Purification des immunoconjugués

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, seuil d'exclusion à 10 kD). 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'éluion (phosphate de sodium 0,1 M, pH 7). Après dépôt de la solution à purifier, la colonne est éluée avec 10 fractions de 500 µL 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. En cas de présence d'agrégats à des taux supérieurs à 10 %, une chromatographie préparative par HPLC sur colonne Superdex G200 a été réalisée afin de les éliminer.

#### **4. Radiomarquages**

##### **4.1. Radiomarquage au cuivre-64**

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 une solution d'acétate de sodium 2,5 M. Le  $^{64}\text{Cu}$ -acétate ainsi formé 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  $^{64}\text{Cu}$ -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 :

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

#### 4.2. Radiomarquage à l'iode-125

Le protocole est le même pour les AcM non modifiés et les immunoconjugués, le radiomarquage s'effectuant directement sur le vecteur et non par le biais du ligand. Dans un tube à hémolyse préalablement coâté avec de l'iodogène (10 µg/100 mL), on introduit 3,7 MBq de la solution d'iode-125 et 0,5 nmol d'AcM. Le volume est ensuite ajusté à 400 µL avec du PBS. La solution est mise à incuber 30 min à température ambiante sous agitation. A la fin de l'incubation, la solution est transférée dans un tube à hémolyse non coâté afin de stopper la réaction de marquage.

Le rendement de radiomarquage est évalué par CCM avec un support iTLC-SG avec comme phase mobile de l'acide trichloroacétique 10 %. Dans ces conditions, l'AcM radiomarqué reste au niveau du point de dépôt (Rf. 0), alors que l'<sup>125</sup>I migre au niveau du front de solvant (Rf. 1) Les radiochromatogrammes sont obtenus à l'aide de l'appareil Cyclone comme décrit pour les marquages au <sup>64</sup>Cu.

#### 4.3. Purification des radioimmunoconjugués

La purification permet d'éliminer le <sup>64</sup>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. II.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 <sup>64</sup>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.

#### 4.4. Évaluation 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. Pour cela, 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<sup>208</sup>. La concentration finale des billes couplées en suspension était de 10 mg/mL dans du PBS.

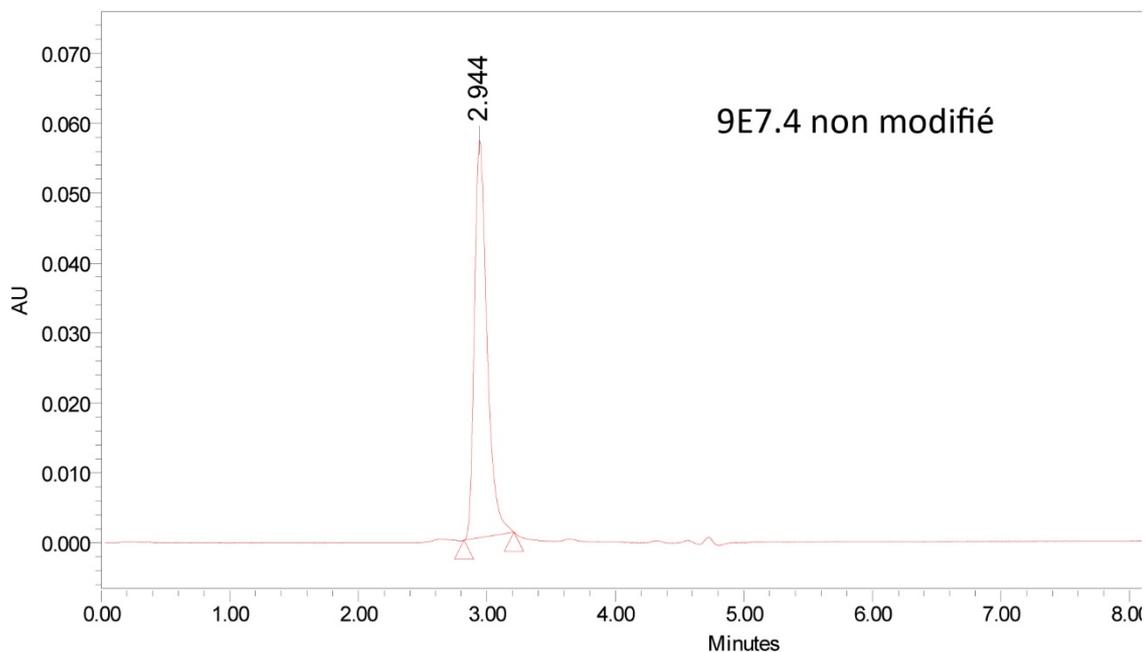
10  $\mu$ L de la suspension de billes (soit 0,2 mg) ont été ajoutés à 1 pmol de la solution de radioimmunoconjugués. Dans ces conditions, l'AcM est en large défaut par rapport à son antigène spécifique greffé sur les billes magnétiques, sur lesquelles il va se fixer de façon quantitative. La solution a été complétée à 150  $\mu$ L 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).

### III. RÉSULTATS

#### 1. Mise au point du couplage et du marquage du NCS-TE1PA

##### 1.1. Caractérisation de l'AcM 9E7.4 non modifié

Plusieurs tests ont été effectués sur l'AcM seul. Ces résultats servent de référence pour les immunoconjugés obtenus par la suite, afin de savoir si ces paramètres sont modifiés par l'introduction d'un ligand sur l'AcM. Tout d'abord, la solution d'AcM a été analysée avec le système UPLC décrit précédemment. Le chromatographe est présenté dans la **Figure 20** et présente un unique pic au temps de rétention  $t_r = 2,94$  min.



**Figure 20** : Chromatogramme UPLC de l'AcM 9E7.4 non modifié.

Le 9E7.4 a été radiomarké au cuivre-64 dans les conditions standards utilisées pour les radioimmunoconjugés. Cette expérience a démontré l'absence de fixation non spécifique du cuivre-64 sur l'AcM.

Enfin, l'immunoréactivité a été déterminée par radiomarkage du 9E7.4 à l'iode-125. Trois radiomarquages différents ont permis d'évaluer l'immunoréactivité par cette technique à  $86,1 \pm 1,0$  %.

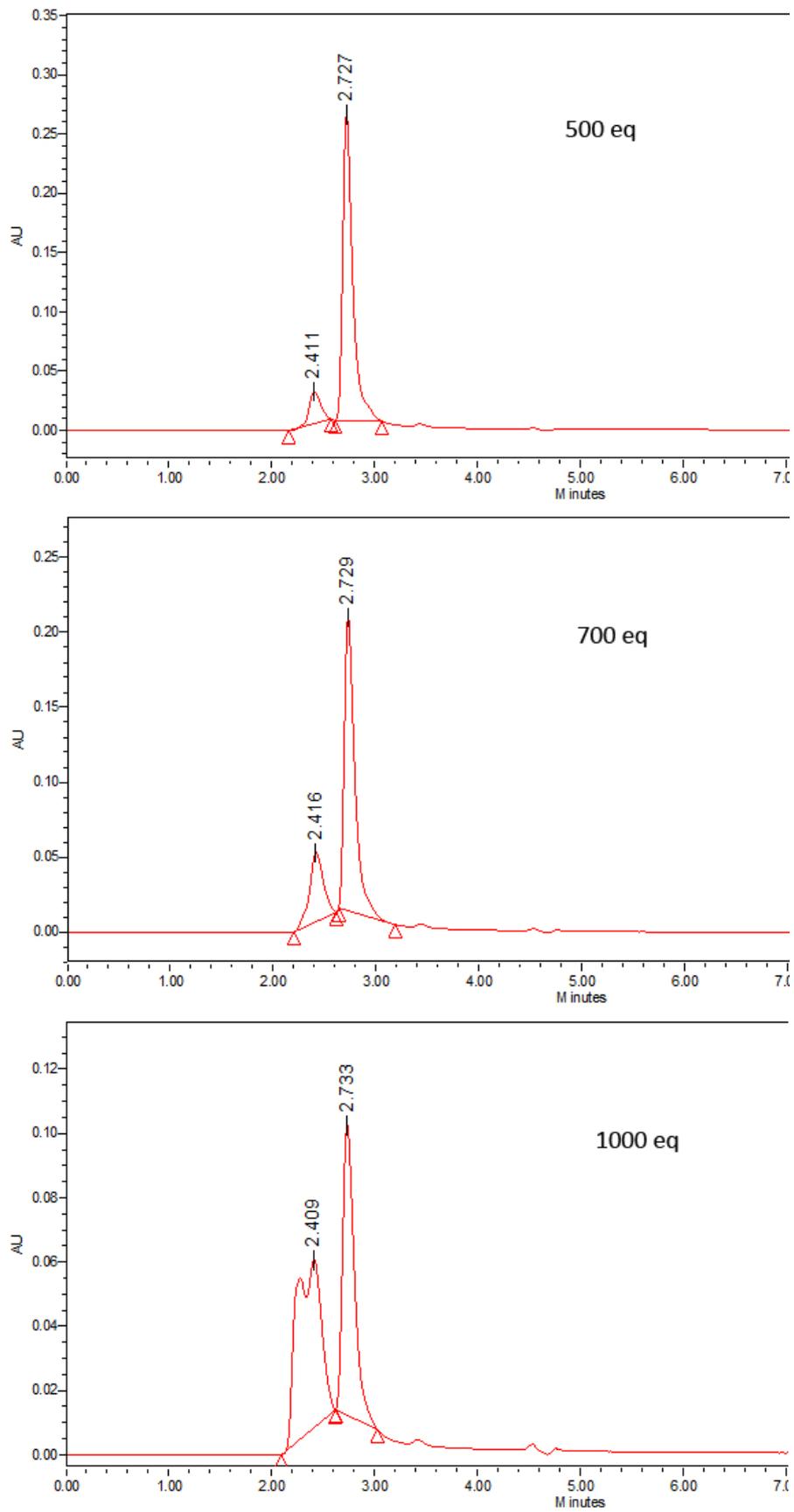
## 1.2. Résultats obtenus avec le TE1PA non fonctionnalisé

Le TE1PA non fonctionnalisé a été couplé sur le 9E7.4 et l'Epratuzumab afin d'être comparé au NCS-TE1PA sur ces mêmes AcM. Les résultats obtenus pour l'Epratuzumab-TE1PA sont détaillés dans le **Tableau 4**. Le rendement de radiomarquage indiqué correspond au test effectué avec 1 éq. de  $^{64}\text{Cu}$  pour 1 éq. d'immunoconjugué.

	Rendement de radiomarquage (%)	Nombre de ligands/AcM	Pourcentage d'agrégats d'AcM après couplage
<b>Epratuzumab-TE1PA (500 éq.)</b>	83,3 ± 3,5	0,8 ± 0,4	14,3 ± 2,3
<b>Epratuzumab-TE1PA (700 éq.)</b>	98,0 ± 1,9	2,5 ± 0,2	18,7 ± 7
<b>Epratuzumab-TE1PA (1000 éq.)</b>	92,8 ± 2,1	4 ± 0,1	49,3 ± 12,6

**Tableau 4** : Résultats obtenus pour les radiomarquages de l'Epratuzumab-TE1PA pour les couplages ayant utilisé 500 éq. (n = 4), 700 éq. (n = 2) et 1000 éq. (n = 2) de ligands pour 1 éq. d'AcM.

L'ajout de 500 éq. de TE1PA pour 1 éq. d'AcM n'ayant pas permis d'obtenir un minimum de 1 ligand/AcM, d'autres tests ont été effectués en augmentant la quantité de TE1PA. On obtient un nombre plus important de ligands greffés, et ce d'autant plus que la quantité de TE1PA ajouté était importante. Cependant, cela entraîne en parallèle une formation beaucoup plus importante d'agrégats d'AcM, qui a été contrôlé après couplage avec le système UPLC (**Figure 21**). A noter que l'immunoréactivité de l'Epratuzumab n'a pas pu être évaluée car contrairement au 9E7.4, aucune méthode fiable n'était disponible.



**Figure 21** : Chromatogrammes obtenus par UPLC pour l'épratuzumab-TE1PA couplé avec 500, 700 et 1000 éq.

Le TE1PA non fonctionnalisé a également été couplé avec le 9E7.4. Le ratio choisi lors du couplage a été de 500 éq. pour 1 éq. d'AcM. Deux couplages ont été effectués, permettant d'obtenir  $0,75 \pm 0,1$  ligand par AcM, un résultat comparable avec celui de l'épratuzumab-TE1PA. Un test d'immunoréactivité effectué sur le 9E7.4-TE1PA a permis de l'évaluer à 60 %.

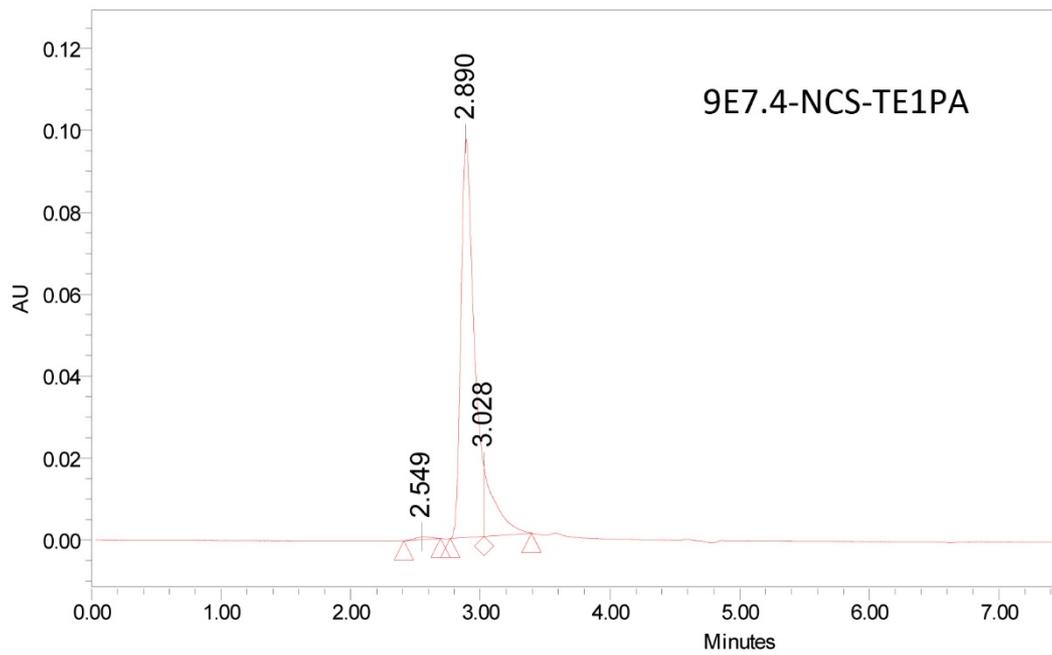
### 1.3. Mise au point du couplage du NCS-TE1PA

Le NCS-TE1PA a été couplé à l'Epratuzumab et au 9E7.4 lors de l'étape initiale de mise au point. Chacun des deux AcM a été couplé avec un ratio de 10 eq., 20 eq. et 50 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 5**.

	Epratuzumab-NCS-TE1PA	9E7.4-NCS-TE1PA
<b>10 eq.</b>	2,5	2
<b>20 eq.</b>	4	5
<b>50 eq.</b>	> 5	> 5

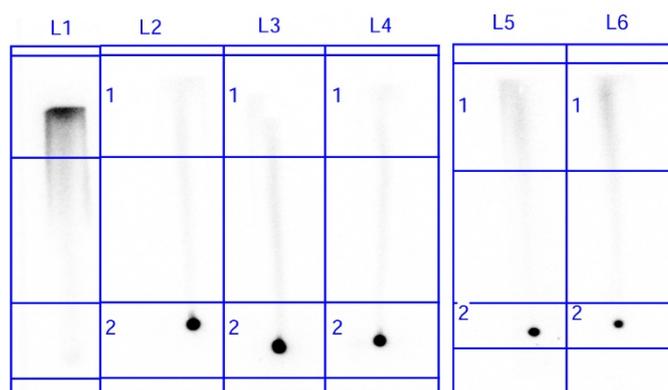
**Tableau 5** : Nombre de ligands couplés par AcM pour l'épratuzumab-NCS-TE1PA et le 9E7.4-NCS-TE1PA, lors de couplages réalisés avec 10, 20 et 50 eq. molaires de ligands.

Les résultats obtenus pour les deux AcM sont similaires, et supérieurs à ceux du TE1PA non fonctionnalisés. La méthode de couplage utilisant 20 éq. a été sélectionnée, car étant celle la plus utilisée dans la littérature<sup>93,209-211</sup> et permettant d'obtenir un excellent ratio ligand/AcM. Une ULPLC a été réalisée sur la solution d'immunoconjugués afin de s'assurer de l'absence d'agrégats (**Figure 22**).



**Figure 22** : Chromatogramme obtenu par UPLC pour le 9E7.4-NCS-TE1PA.

En moyenne, le nombre de ligands greffés par AcM a été de  $5 \pm 1$ . L'immunoréactivité du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA a été évaluée à  $84,0 \pm 0,8 \%$  ; ce résultat n'est pas significativement différent de celui obtenu pour le 9E7.4 non modifié, indiquant que le couplage au NCS-TE1PA n'a pas d'effet sur la capacité de l'AcM à reconnaître sa cible.



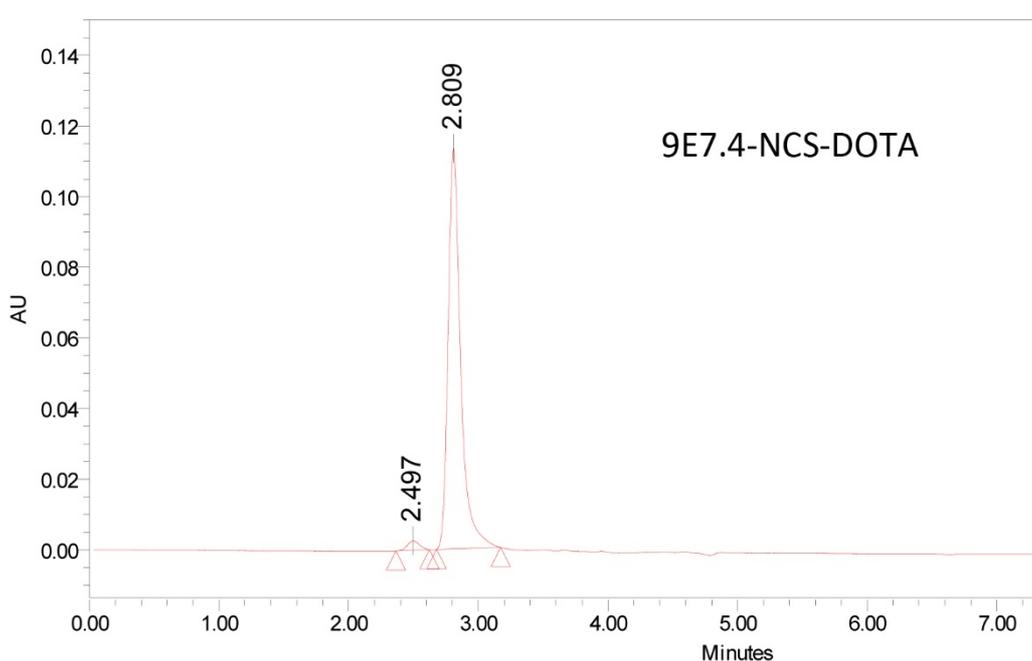
Lane #1			Lane #4		
ID	Gross DLU	% Sum	ID	Gross DLU	% Sum
1 - Prof	1,799,647.9	96.3	1 - Prof	86,629.5	6.0
2 - Prof	69,415.8	3.7	2 - Prof	1,360,334.5	94.0
<b>Lane</b>	<b>2,361,310.5</b>		<b>Lane</b>	<b>1,576,126.2</b>	
Lane #2			Lane #5		
ID	Gross DLU	% Sum	ID	Gross DLU	% Sum
1 - Prof	124,419.5	6.4	1 - Prof	374,210.0	26.3
2 - Prof	1,834,505.8	93.6	2 - Prof	1,048,487.1	73.7
<b>Lane</b>	<b>2,079,965.5</b>		<b>Lane</b>	<b>1,523,031.1</b>	
Lane #3			Lane #6		
ID	Gross DLU	% Sum	ID	Gross DLU	% Sum
1 - Prof	108,832.7	3.3	1 - Prof	811,113.1	52.4
2 - Prof	3,155,645.9	96.7	2 - Prof	737,607.7	47.6
<b>Lane</b>	<b>3,481,241.4</b>		<b>Lane</b>	<b>1,844,779.7</b>	

**Figure 23** : Radiochromatogrammes obtenus pour les radiomarquages du 9E7.4-NCS-TE1PA avec 1 éq. de  $^{64}\text{Cu}$  (lane #2), 2 éq. de  $^{64}\text{Cu}$  (lane #3), 5 éq. de  $^{64}\text{Cu}$  (lane #4), 10 éq. de  $^{64}\text{Cu}$  (lane #5) et 20 éq. de  $^{64}\text{Cu}$  (lane #6). La lane #1 représente le témoin  $^{64}\text{CuCl}_2$  libre (non radiomarké).

## 2. Sélection d'un ligand commercial pour l'étude comparative

### 2.1. Le NCS-DOTA

Les premiers résultats obtenus après un couplage et un radiomarquage dans les mêmes conditions que le NCS-TE1PA ont donné environ 2,5 ligands couplés par AcM et une immunoréactivité de 46,0 %. Devant ces résultats décevants, plusieurs investigations ont été menées afin de trouver la raison d'une telle diminution de l'immunoréactivité. Elles sont résumées dans la **Figure 24** et le **Tableau 6**.



**Figure 24** : Chromatogrammes UPLC obtenus pour le 9E7.4-NCS-DOTA.

- Un couplage a été réalisé avec 50 éq. de NCS-DOTA pour 1 éq. d'AcM. Le ratio ligand/AcM obtenu a été de 2,5, avec une immunoréactivité de 39,3 %.

- Avant d'être ajouté à la solution d'AcM, le NCS-DOTA était initialement. Deux couplages ont ainsi été menés en parallèle : l'un avec la méthode classique (dissolution dans du DMF), l'autre avec dissolution du NCS-DOTA dans du HCl 0,1 M. Les résultats obtenus ont été sensiblement les mêmes, avec 1 ligand / AcM couplé, et une immunoréactivité de

respectivement 56,1 % et 56,3 %. Cependant, par mesure de précaution, le protocole de couplage a été modifié, les ligands étant à présent dilués dans de l'HCl 0,1 M (cf. II. 2.2.).

- La méthode a été répétée avec un nouveau lot de NCS-DOTA, neuf. Le ratio ligand / AcM a été de 2,5, avec une immunoréactivité de 53,2 %.

NCS-DOTA	Nombre de ligands/AcM	Immunoréactivité (%)
20 éq. lot 1	2,5	42,3
50 éq. lot 1	2,5	39,3
20 éq. lot 1		
- DMF	> 1	56,1
- HCl 0,1 M	> 1	56,3
20 éq. lot 2	2,5	53,2

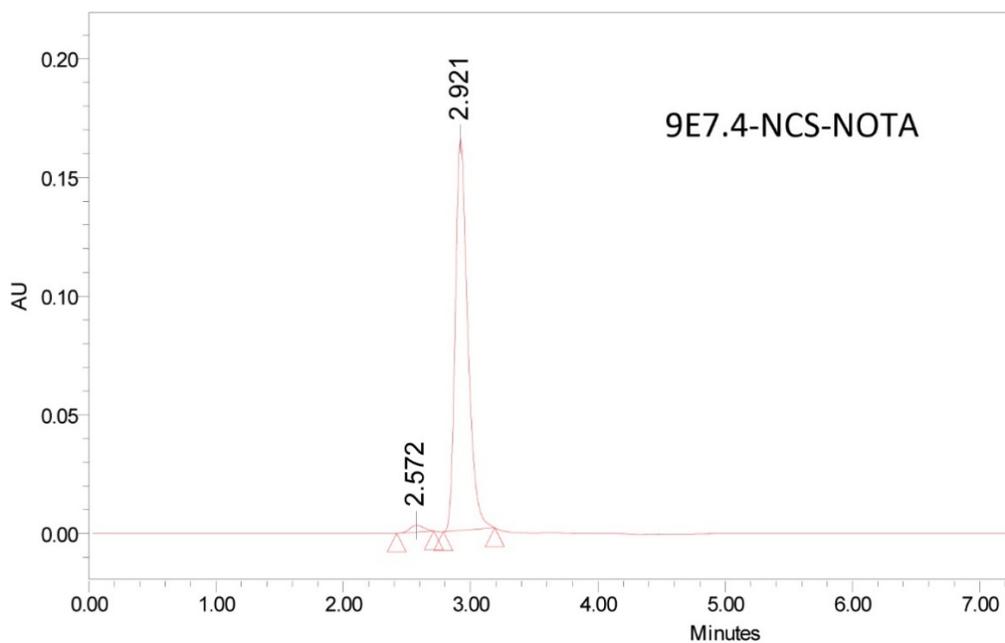
**Tableau 6** : Récapitulatif des résultats obtenus pour les différents couplages entre le NCS-DOTA et l'AcM 9E7.4.

## 2.2. NCS-NOTA

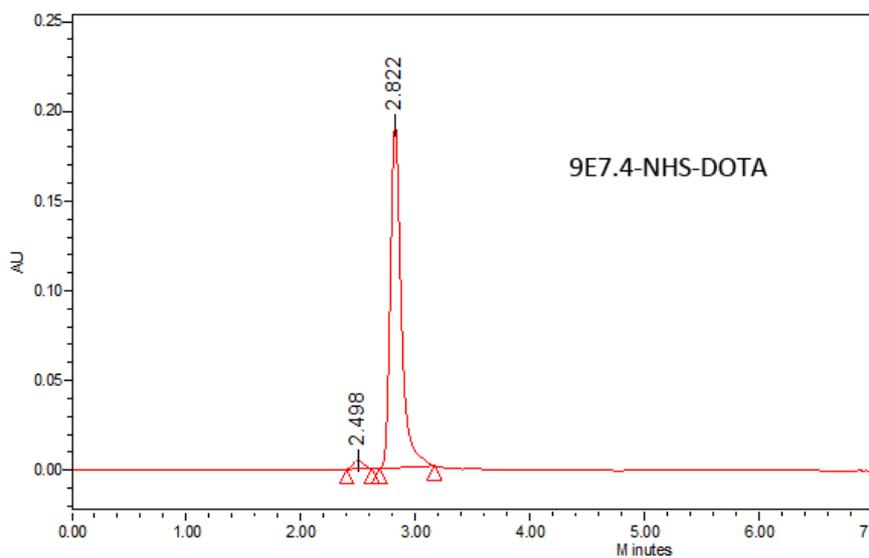
Un autre ligand azamacrocyclique C-fonctionnalisé avec le NCS a alors été étudié, le NCS-NOTA. Sur 4 couplages différents, on obtient en moyenne 1 ligand couplé par AcM et une immunoréactivité de  $55,7 \pm 1,2$  %. Le contrôle par UPLC de l'immunoconjugué est présenté dans la **Figure 25**.

## 2.3. NHS-DOTA

Le ligand NHS-DOTA a ensuite été envisagé comme modèle pour l'étude *in vivo*. Les couplages effectués avec le 9E7.4 ont donné un nombre de ligands par AcM d'environ 4 et une immunoréactivité de  $75,3 \pm 1,8$  (n = 3). Le contrôle par UPLC de l'immunoconjugué est présenté dans la **Figure 26**.



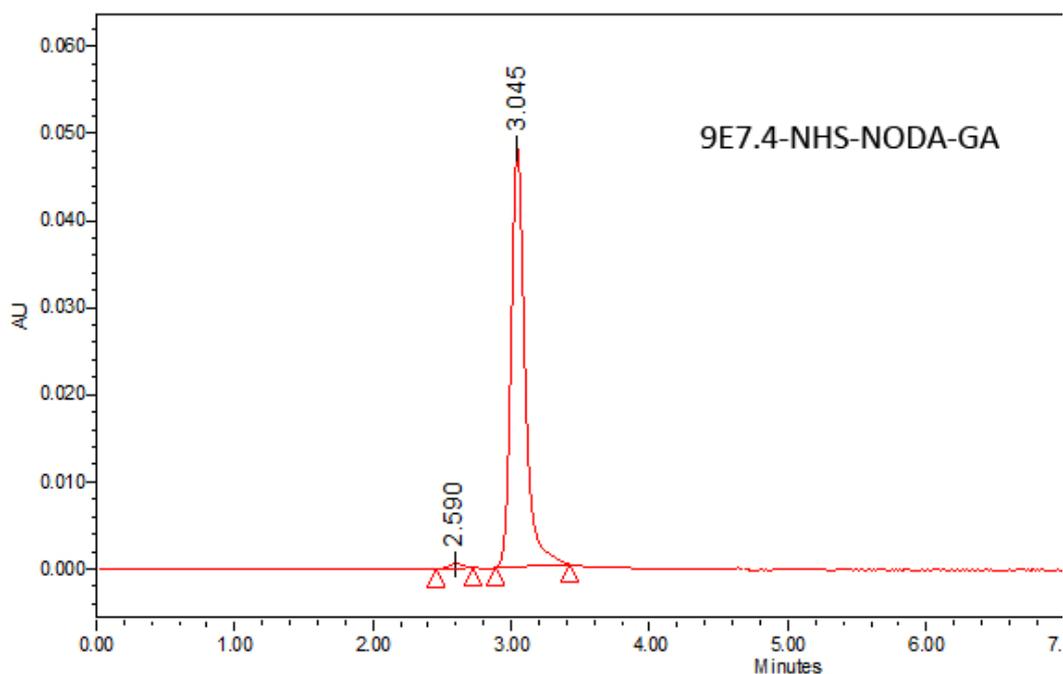
**Figure 25** : Chromatogramme UPLC obtenu pour le 9E7.4-NCS-NOTA.



**Figure 26** : Chromatogramme UPLC obtenu pour le 9E7.4-NHS-DOTA.

## 2.4. NHS-NODA-GA

Un dérivé TACN fonctionnalisé avec le NHS a été testé. Les essais ont été réalisés avec 20 éq. et 50 éq. de ligands lors du couplage pour 1 éq. d'AcM. Les résultats obtenus sont similaires pour les deux proportions, avec en moyenne 0,5 ligand couplé par AcM. Le contrôle par UPLC de l'immunoconjugué est présenté dans la **Figure 27**.



**Figure 27** : Chrommatogramme UPLC obtenu pour le 9E7.4-NHS-NODA-GA.

## 3. Récapitulatif des résultats obtenus pour les couplages des ligands azamacrocycliques au 9E7.4

Le **Tableau 7** regroupe tous les résultats détaillés ci-dessus pour tous les radioimmunoconjugés étudiés. 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 charge des complexes de  $^{64}\text{Cu}$  ayant très probablement un impact sur les couplages, elle a été précisée également.

$X = {}^{64}\text{Cu-9E7.4}$	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
Immunoréactivité (%)	60	84,0 ± 0,8	75,3 ± 1,8	52,0 ± 6,6	55,7 ± 1,2	/
Charge globale des complexes	+1	+1	-1	-2	-1	-1

**Tableau 7** : Nombre de ligands couplés par AcM 9E7.4, rendement de radiomarquage au  ${}^{64}\text{Cu}$  et immunoréactivité pour les immunoconjugués à base de TE1PA, NCS-TE1PA, NHS-DOTA, NCS-DOTA, NCS-NOTA et NHS-NODA-GA, ainsi que la charge globale des complexes radiomarqués.

#### 4. 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 :

- pour le  ${}^{64}\text{Cu-9E7.4-p-NCS-Bn-TE1PA}$  : 40 MBq/nmol
- pour le  ${}^{64}\text{Cu-9E7.4-p-NCS-Bn-NOTA}$  : 13 MBq/nmol
- pour le  ${}^{64}\text{Cu-9E7.4-NHS-DOTA}$  : 34 MBq/nmol

#### IV. DISCUSSION

Les qualités du TE1PA comme chélateur du cuivre sont à présents indéniables<sup>91,205</sup>. Pour pouvoir les exploiter dans l'optique d'une application en imagerie phénotypique, un nouveau défi est survenu : l'introduction d'une fonction permettant la liaison avec un vecteur biologique. L'objectif est à la fois de faciliter la réaction de couplage et de conserver les propriétés de chélation du TE1PA, partiellement perdues lors d'une fonctionnalisation par le biais de l'acide picolinique<sup>206</sup>. Le changement de l'acide carboxylique en fonction amine entraîne en effet des modifications de la structure des complexes et une diminution de leur stabilité, un phénomène déjà observé pour d'autres ligands<sup>83,212,213</sup>. Ce problème peut être résolu par l'introduction d'une fonction permettant la liaison au vecteur au niveau d'un des carbones du cycle. Cette C-fonctionnalisation intervenant sur un atome non coordonnant, elle n'a que peu d'impact sur les propriétés de chélation de la molécule<sup>209,214</sup>.

La synthèse et la caractérisation du NCS-TE1PA ont été préalablement réalisées au sein de l'équipe COSM, à Brest<sup>207</sup>. Notre équipe a ensuite pris le relai afin de mettre au point une méthode de couplage avec un AcM. Deux anticorps ont été utilisés : le 9E7.4 et l'Epratuzumab. Les conditions choisies sont des conditions standards couramment retrouvées : la concentration en AcM ne doit pas être trop importante pour ne pas induire de précipitation de la protéine, tout en étant suffisante pour faciliter la réaction avec le ligand. Le milieu est tamponné à un pH légèrement basique, afin de permettre la réactivité des amines primaires de l'AcM sur lesquelles va interagir la fonction NCS du ligand. Ce dernier doit être ajouté en excès par rapport à l'AcM, car la réaction de couplage intervenant en milieu aqueux, elle entre en compétition avec l'hydrolyse de la fonction NCS, ce qui la rend incapable de réagir avec les amines primaires. Cet excès va conditionner le nombre de ligands couplés par AcM, qui lui-même influe l'activité molaire du radiopharmaceutique final. Mais l'introduction d'un trop grand nombre de ligands peut altérer la capacité de l'AcM à reconnaître sa cible : la méthode choisie doit donc respecter cet équilibre. Pour les ligands azamacrocycliques fonctionnalisés avec un NCS ou un NHS, on retrouve le plus souvent une valeur de 20 équivalents (éq.) de ligands pour 1 éq. d'AcM<sup>93,209-211</sup>. Le couplage NCS-TE1PA aux deux AcM a donc été testé avec 20 éq., ainsi que 2 valeurs proches (10 éq. et 50 éq.). La méthode classique utilisant 20 éq. a permis d'obtenir 4 ligands par AcM pour l'épratuzumab et 5 ligands par AcM pour le 9E7.4, et a donc été retenue pour les tests suivants. De plus, l'immunoréactivité du 9E7.4-NCS-TE1PA a

été évaluée, et ne montre pas de différence significative avec celle de l'AcM non modifié. Malgré un ratio ligand / AcM important, le NCS-TE1PA n'a donc pas d'influence sur les propriétés biologiques du 9E7.4.

Le NCS-TE1PA présente également un certain nombre d'avantages par rapport à son prédécesseur non fonctionnalisé, à commencer par un couplage simplifié, en une étape au lieu de deux. Pour pouvoir permettre le couplage du TE1PA, il était nécessaire d'ajouter un très large excès de ligands, conduisant à une forte consommation du produit. Même ainsi, dans le cas du 9E7.4, les conditions ne permettaient d'obtenir qu'en moyenne 0,8 ligands par AcM. Il est possible d'augmenter le nombre d'équivalents de ligands ajoutés, mais cela entraîne alors une importante formation d'agrégats lors du couplage. Ces derniers sont principalement dus à la présence en large excès de produits additionnels nécessaires à la fonctionnalisation (EDC et SNHS) ; il s'agit en effet d'une technique « *one-pot* » sans purification entre l'activation et le couplage. Les agrégats d'AcM ne pouvant réagir avec la cible, ils doivent être éliminés par purification avant le marquage, ce qui impose l'ajout d'une étape supplémentaire, ajoutée à une perte d'AcM, une molécule souvent onéreuse. De plus, des résultats précédents avaient démontrés une immunoréactivité de 60 % pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-TE1PA<sup>206</sup>. Il est fort probable qu'une augmentation du ratio ligand/AcM entraînerait une diminution concomitante de l'immunoréactivité.

Le NCS-TE1PA présente donc une amélioration nette sur tous ces points et son couplage simple et dans des conditions standards le confirme comme un ligand potentiel pour une application biomédicale. De même, son radiomarquage se réalise dans les conditions usuelles des autres azamacrocycles, à une température et un pH convenable pour un AcM, et permet d'obtenir une cinétique rapide et quantitative.

Une fois le couplage et le radiomarquage du NCS-TE1PA mis au point, il a fallu sélectionner un ligand qui permettrait de servir de référence pour l'étude comparative *in vivo* prévue par la suite. Comme mentionné précédemment, le DOTA est le ligand azamacrocyclique le plus utilisé dans la littérature et pour l'instant, le seul à avoir été utilisé chez l'homme dans le cadre de l'imagerie phénotypique au  $^{64}\text{Cu}$ <sup>108-114</sup>. De plus, les études menées précédemment

sur le TE1PA avaient été réalisées en comparaison avec le DOTA<sup>205,206</sup>. Nous avons donc choisi une version C-fonctionnalisé du DOTA avec un NCS, tout comme le NCS-TE1PA. Le NCS-DOTA a été testé sur le 9E7.4 dans les mêmes conditions que le NCS-TE1PA.

De façon assez surprenante, les résultats obtenus sont inférieurs en termes de ligands greffés par 9E7.4 par rapport aux résultats obtenus sur d'autres AcM<sup>215,216</sup>. S'y ajoute une diminution de l'immunoréactivité de l'AcM modifié, passant de 86,1 % à 46 %. Plusieurs investigations ont alors été menées pour essayer de comprendre l'origine de ces résultats. Dans un premier temps, le couplage a été réalisé en augmentant la quantité de ligands ajoutée (50 éq. au lieu de 20 éq.): cela a entraîné une baisse encore plus importante de l'immunoréactivité. Il a alors été envisagé que le DMF, utilisé à l'origine pour dissoudre le NCS-DOTA avant l'ajout à la solution d'AcM, pouvait être responsable de cette diminution de l'immunoréactivité. Bien que le volume de DMF utilisé soit toujours le plus faible possible (moins de 5 % du volume de la solution de couplage finale), on a pu supposer que le DMF était responsable d'une altération de l'AcM. Deux couplages ont alors été menés en parallèle, l'un utilisant le DMF, l'autre le remplaçant par du HCl 0,1 M. Les résultats obtenus ont été quasiment identiques dans les deux cas, et également similaires à ceux obtenus précédemment. Enfin, un autre essai a été réalisé avec un nouveau lot de NCS-DOTA, dans l'hypothèse où celui utilisé ait été altéré ; les résultats obtenus ont une nouvelle fois été les mêmes. A noter que le contrôle par UPLC n'a pas relevé de présence significative d'agrégats d'AcM, qui ne sont pas à l'origine de la diminution de l'immunoréactivité. Suite à ces résultats, le NCS-DOTA n'a pas été retenu pour l'étude *in vivo*.

Notre choix s'est alors porté sur un autre ligand azamacrocyclique comportant une C-fonctionnalisation avec le NCS : le NOTA<sup>115,116</sup>. Les résultats obtenus sont légèrement inférieurs à ceux du NCS-DOTA, avec une immunoréactivité d'environ 57,5 % et seulement 1 ligand couplé par AcM.

La C-fonctionnalisation par le NCS a alors été abandonnée au profit d'un DOTA fonctionnalisé par un NHS au niveau d'un de ses acides carboxyliques. Le NHS réagit tout comme le NCS au niveau des amines primaires de l'AcM. De plus, tous les « bras » acides carboxyliques du macrocycle du DOTA n'interviennent pas dans la coordination du cuivre, la fonctionnalisation *via* l'un d'eux n'a théoriquement pas d'incidence sur la complexation. Le

NHS-DOTA a permis d'obtenir des résultats assez proches de ceux du NCS-TE1PA, bien que légèrement inférieurs.

L'hypothèse la plus probable pour expliquer les résultats obtenus est qu'il existe une interaction entre le site de reconnaissance de l'antigène (CDR, pour *Complementary Determining Region*) et les fonctions acides carboxyliques présentes sur les cycles des ligands. En effet, des lysines se trouvent à proximité des CDR, portant les amines primaires sur lesquelles réagit la fonction de couplage du ligand. En se fixant sur ces lysines, les fonctions des ligands proches des CDR entraîneraient une perturbation de la liaison antigène-anticorps. La charge globale ainsi que la conformation spatiale du NCS-TE1PA serait ainsi moins susceptible d'altérer les fonctions de l'AcM, dans le cas du 9E7.4. Cela expliquerait pourquoi il n'y a pas de différence significative entre l'immunoréactivité du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA et celle de l'AcM non modifié. Le NHS-NODA-GA, sans doute également pour des raisons de charge et de conformation, n'a pas permis d'obtenir de résultats satisfaisants lors du couplage avec le 9E7.4. Des 4 ligands commerciaux, seul le NHS-DOTA a permis d'avoir des résultats proches de ceux du NCS-TE1PA, bien que légèrement inférieurs.

Le NCS-TE1PA s'est donc montré plus performant que les 4 ligands commerciaux. Il permet d'obtenir le meilleur ratio ligand/AcM, sans altérer l'immunoréactivité. Additionné à ses propriétés de chélation déjà démontrées sur sa version non fonctionnalisée (notamment une bonne sélectivité pour le cuivre par rapport aux autres cations divalents), il permet ainsi d'obtenir la meilleure activité molaire spécifique du radiopharmaceutique final. Les résultats de cette étude *in vitro* ainsi que la synthèse du NCS-TE1PA réalisée à Brest ont fait l'objet d'une publication (cf. **Annexe 1**) et a permis de passer à la deuxième étape de ce travail, l'étude *in vivo* dans un modèle murin.



---

**TROISIÈME PARTIE :**  
**EXPÉRIMENTATION *IN VIVO***

---

## I. INTRODUCTION

Le NCS-TE1PA a rempli les conditions attendues d'un ligand du cuivre pour le radiomarquage *in vitro*, démontrant même une supériorité par rapport aux ligands commerciaux étudiés. L'étape suivante a donc été d'évaluer sa stabilité en milieu biologique.

Le 9E7.4, l'AcM sur lequel ont été effectués les évaluations *in vitro*, a pu être validé dans un modèle murin de myélome multiple dont dispose notre équipe. Les cellules tumorales greffées expriment le CD-138 murin reconnu par le 9E7.4. Les propriétés *in vivo* de cet AcM sont de plus bien connues<sup>200</sup>. Trois études menées en parallèle ont été élaborées sur ce modèle :

- Une étude de biodistribution du radiopharmaceutique à différents temps après injection.
- Une étude de métabolisme hépatique.
- Une étude d'imagerie.

L'étude précédente sur les ligands azamacrocycliques commerciaux a également permis de choisir le ligand utilisé pour l'étude comparative avec le NCS-TE1PA. Pour des raisons éthiques autant qu'économiques, il est impossible de réaliser une étude complète sur tous les ligands ; une décision a donc été prise concernant le plus adapté pour cette étude. Dans l'idéal, il aurait été convenu d'utiliser un azamacrocycle fonctionnalisé par une fonction NCS, la même que celle présente sur le TE1PA. Cependant, les résultats obtenus précédemment sur le 9E7.4 pour le NCS-DOTA et le NCS-NOTA n'ont pas été satisfaisants, ce qui a justifié leur abandon pour la suite de l'étude. En revanche, le <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA s'est montré similaire au <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NCS-TE1PA en termes de ratio ligand/AcM et d'immunoréactivité. C'est donc le NHS-DOTA qui a été choisi pour l'étude complète. Le NCS-NOTA a quant à lui été réservé pour l'étude d'imagerie, comme complément d'informations.

## **II. MATÉRIEL ET MÉTHODE**

### **1. Produits utilisés**

Le chlorure de sodium 0,9 % pour préparation injectable a été obtenu auprès d'Aguettan. L'éthanol absolu anhydre et l'acétate de sodium ont été achetés chez VMR. Le mélange d'inhibiteur de protéases, le chlorure de sodium ainsi que l'HEPES sous forme base et sous forme de sel de potassium ont été obtenus auprès de Merck.

Le système HPLC utilisé était composé d'un modèle de contrôle Waters 600, d'une pompe quaternaire Waters 600, d'un collecteur de fractions Waters III, d'une colonne Superose 12 10/300 GL et d'un détecteur UV Waters 487. Les chromatogrammes ont été analysés à l'aide du logiciel Empower Pro 1154.

### **2. Radioimmunoconjugués**

Les radioimmunoconjugués utilisés pour l'étude comparative *in vivo*, soit le 9E7.4-NCS-TE1PA, le 9E7.4-NHS-DOTA et le 9E7.4-NCS-NOTA, ont été obtenus selon le protocole décrit précédemment (cf. partie expérimentale *in vitro*). Les quantités molaires de cuivre ajoutées lors des radiomarquages ont été calculées de façon à ce que le cuivre soit toujours en défaut par rapport aux ligands utilisés. Ainsi, aucune étape de purification n'a été nécessaire après radiomarquage. Le nombre de ligands par AcM ainsi que l'immunoréactivité des radioimmunoconjugués ont également été évalués comme décrit précédemment.

### **3. Modèle animal**

Les souris utilisées sont issues de la lignée C57BL/KaLwRij et ont été obtenues auprès du fournisseur Envigo. Elles ont été hébergées au sein de l'Unité Thérapeutique Expérimentale de l'IRS-UN (SFR François Bonamy, Université de Nantes, numéro de licence : C44278). Les expérimentations ont été approuvées par le comité d'éthique locale (référence pour l'imagerie : 00143.01) et par le Département de la Recherche (référence pour les biodistributions : 2016072014351657). Toutes les souris étaient de sexe femelle et âgées de 18 semaines (pour le 9E7.4-NHS-DOTA), de 11 semaines (pour le 9E7.4-NCS-NOTA) et d'entre 10 et 23 semaines (pour le 9E7.4-NCS-TE1PA).

Dix jours avant l'expérimentation, les souris ont reçu une greffe sous-cutanée d'1 million de cellules 5T33 dans chaque patte arrière. Ces cellules proviennent de la lignée transplantable de myélome multiple murin qui exprime l'antigène CD138 reconnu par l'anticorps 9E7.4<sup>217</sup>. Ces greffes permettent le développement de tumeurs sous-cutanées (sur une patte ou sur les deux), d'un diamètre moyen de 5 à 10 mm.

#### **4. Étude de biodistribution**

Les souris ont été injectées au niveau de la veine de la queue avec 130 µL de <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NCS-TE1PA (12 animaux) ou 100 µL de <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA (11 animaux) ou 100 µL de <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NCS-NOTA (3 animaux). Cela correspond à une quantité de radioimmunoconjugués de respectivement  $86 \pm 3$  µg,  $104 \pm 2$  µg et 100 µg. L'activité injectée à chaque souris a été de  $8,3 \pm 0,6$  MBq pour le <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NCS-TE1PA, de  $12,5 \pm 0,3$  MBq pour le <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA et de 9,2 MBq pour le <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NCS-NOTA.

Pour chaque groupe, 4 souris ont été sacrifiées à chacun des temps étudiés (2 h, 24 h et 48 h post-injection). Le sang ainsi que les organes ont été collectés et pesés, puis la radioactivité a été mesurée à l'aide du compteur gamma. Pour chaque tissu et organe, l'activité a été ainsi exprimée en pourcentage de la dose injectée par gramme (%DI/g).

#### **5. Étude de métabolisme**

A chaque temps de biodistribution (2 h, 24 h et 48 h), pour les groupes <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NCS-TE1PA et <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA, deux lobes hépatiques ont été prélevés sur deux des souris sacrifiées. Les lobes ont été traités de façon à isoler les radioimmunoconjugués et leurs métabolites. La méthode utilisée est basée sur un protocole décrit par Bass et al.<sup>86</sup> et adapté par Frindel et al.<sup>206</sup> Les lobes hépatiques ont été lavés avec du NaCl 0,9 % à 4°C puis rassemblés dans un tube Falcon de 15 mL contenant 2 mL d'un mélange éthanol/acétate d'ammonium 0,1 M (dans les proportions 65:35) et 100 µL d'un mélange d'inhibiteurs de protéases. Les foies ont été homogénéisés sur glace en utilisant un broyeur de tissus adapté en PTFE (Kimble).

Le mélange a été centrifugé à 8 000 g pendant 30 minutes à 4°C avec une centrifugeuse 2-16PK (Sigma). Le surnageant a été séparé du culot protéique et filtré sur un filtre UptiDisc

de 0,45  $\mu\text{m}$  (Interchim). L'activité du surnageant ainsi que celle du culot a été mesurée à l'aide du compteur gamma. 200  $\mu\text{L}$  de surnageant ont ensuite été prélevés puis analysés par le système HPLC décrit précédemment. Le solvant utilisé était un mélange d'HEPES 0,2 M et de NaCl 0,15 M, selon un mode isocratique, pendant un run de 60 min avec un débit de 0,5 mL/min. Le collecteur d'échantillons a permis le recueil d'une fraction par minute. La radioactivité contenue dans ces fractions a été ensuite mesurée par le compteur gamma.

## 6. Étude d'imagerie

Les souris utilisées pour l'imagerie faisaient toutes partie des groupes de biodistribution 48 h PI pour les 3 radioimmunoconjugués. Chaque souris a été imagée à 2 h, 24 h et 48 h avant d'être sacrifiée pour l'étude de biodistribution. Pour permettre l'acquisition des images, les souris ont été placées sous anesthésie générale et sur un lit chauffé de façon à maintenir leur température corporelle à 37°C. L'induction a été réalisée par un mélange d'isofluorane (3 %) et d'oxygène, puis le taux d'isofluorane a été abaissé à 2 % pendant la durée de l'acquisition. Cette dernière a été réalisée sur une micro-TEP scan (Inveon PET-CT, Siemens Medical Solutions, Knoxville, USA) après un scanner corps entier, sur une durée de 20 min (souris imagées à 2 h et 24 h) ou de 30 min (souris imagées à 48 h).

Les images ont été reconstituées par un algorithme OSEM-MAP constitué de 16 sous-ensembles, suivis par 6 OSEM (pour *Ordered Subset Expectation Maximisation*) et 6 MAP (pour *Maximum A Posteriori*). Le traitement des images a été réalisé par le logiciel Inveon Research Workplace software (Siemens Healthcare).

## 7. Analyse statistique

Afin de déterminer si les résultats présentaient des différences significatives, ils ont été soumis à un test *t* de Student bilatéral non apparié, au risque de 5 %.

### III. RÉSULTATS

#### 1. Caractérisation des radioimmunoconjugués

Les caractéristiques principales des 3 radioimmunoconjugués utilisés pour l'étude *in vivo* sont résumées dans le **Tableau 8**.

<sup>64</sup> Cu-9E7.4-ligand	Ligand		
	NCS-TE1PA	NHS-DOTA	NCS-NOTA
Nombre de ligands / AcM	5 ± 1	4,5 ± 1	1,2 ± 0,2
Immunoréactivité (%)	84,0 ± 0,8	75,3 ± 1,8	55,7 ± 1,2
Rendement de radiomarquage (%)	99,3 ± 0,4	99,7 ± 0,6	95,7 ± 3,6
Activité spécifique (MBq/mg)	168 ± 84	159 ± 60	92

**Tableau 8** : Caractéristiques des radioimmunoconjugués après radiomarquage au <sup>64</sup>Cu (n = 4, excepté pour l'activité spécifique).

A noter que l'activité spécifique est dépendante de la source de cuivre-64, qui varie d'une production à l'autre en termes de contaminants présents tant en quantité qu'en qualité. Les radiomarquages du 9E7.4-NCS-TE1PA et du 9E7.4-NHS-DOTA ont donc été réalisés de façon à obtenir les activités spécifiques du produit final les plus proches possibles, bien qu'utilisant deux productions de cuivre-64 différentes. Le 9E7.4-NCS-NOTA possédant 5 fois moins de ligands couplés par AcM que les deux autres immunoconjugués, l'activité spécifique obtenue est donc sensiblement inférieure.

#### 2. Étude de biodistribution

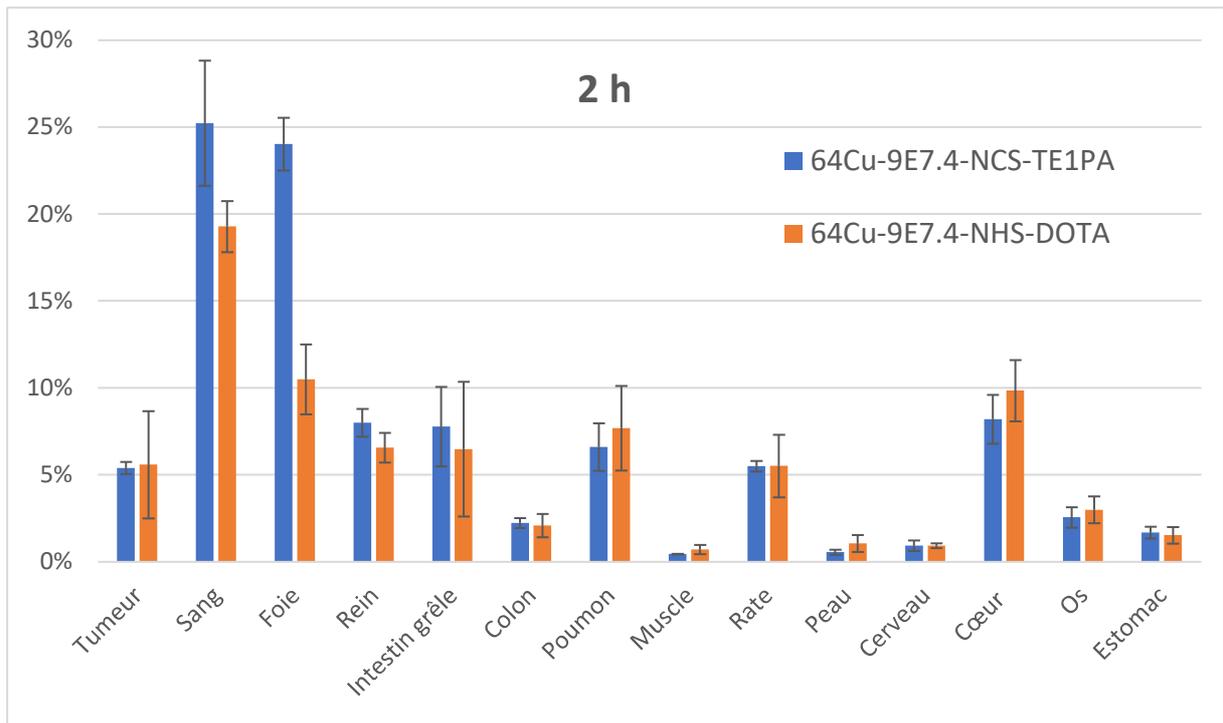
Les résultats obtenus pour les études de biodistribution sont regroupés dans les **Tableaux 9 et 10** et dans la **Figure 28**.

<sup>64</sup> Cu-9E7.4-NCS-TE1PA			
	2 h	24 h	48 h
<b>Tumeur</b>	5,40 ± 0,4	13,6 ± 5,4	12,58 ± 2,4
<b>Sang</b>	25,22 ± 2,0	8,05 ± 2,3	2,68 ± 0,6
<b>Foie</b>	24,02 ± 1,5	12,66 ± 0,9	12,00 ± 1,0
<b>Rein</b>	8,00 ± 0,8	5,34 ± 0,7	3,25 ± 0,4
<b>Intestin grêle</b>	7,78 ± 2,3	7,90 ± 2,6	6,36 ± 0,6
<b>Colon</b>	2,23 ± 0,3	4,04 ± 0,8	3,87 ± 0,8
<b>Poumon</b>	6,6 ± 1,4	6,04 ± 1,3	3,58 ± 0,4
<b>Muscle</b>	0,45 ± 0,2	0,66 ± 0,2	0,49 ± 0,1
<b>Rate</b>	5,50 ± 0,3	4,85 ± 0,7	5,53 ± 1,6
<b>Peau</b>	0,56 ± 0,2	3,04 ± 0,6	1,86 ± 0,5
<b>Cerveau</b>	0,93 ± 0,3	0,30 ± 0,1	0,28 ± 0,3
<b>Cœur</b>	8,2 ± 1,4	2,86 ± 1,3	1,34 ± 0,3
<b>Os</b>	2,56 ± 0,6	1,62 ± 0,5	1,15 ± 0,2
<b>Estomac</b>	1,68 ± 0,4	4,23 ± 0,8	3,10 ± 0,2

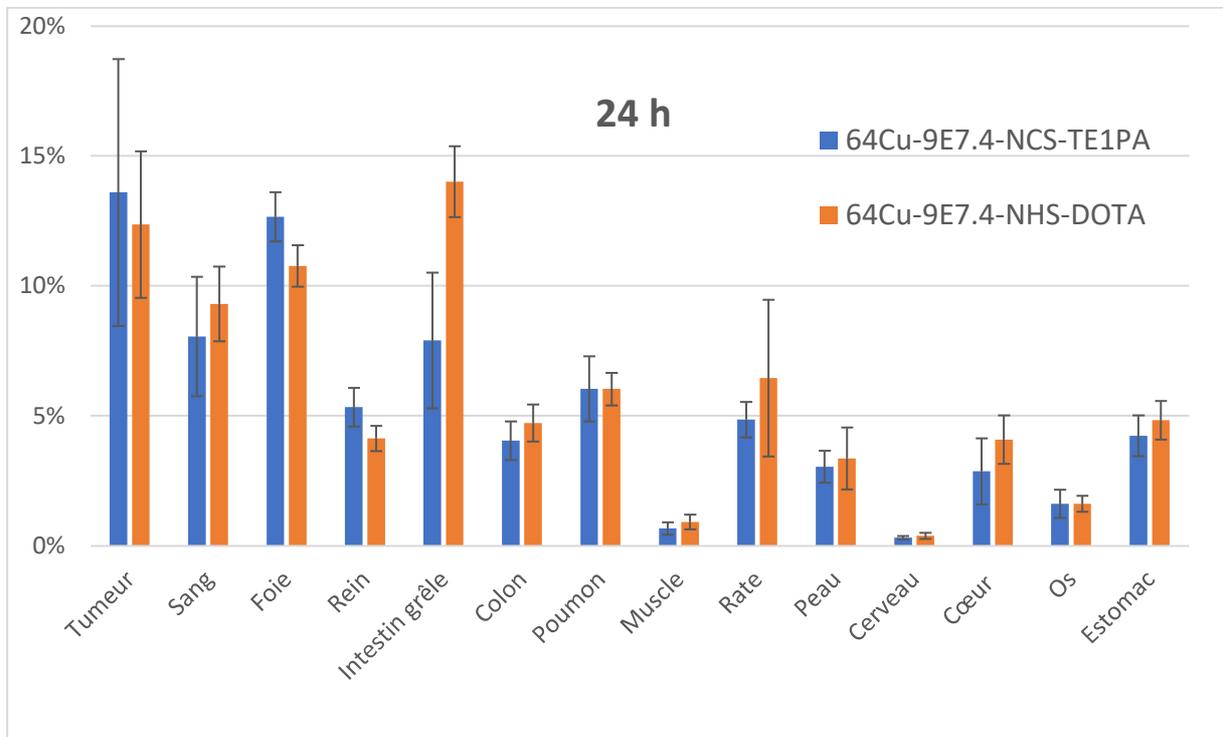
**Tableau 9** : %DI/g pour le <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NCS-TE1PA à 2 h, 24 h et 48 h post-injection.

	<sup>64</sup> Cu-9E7.4-NHS-DOTA			<sup>64</sup> Cu-9E7.4-NCS-NOTA
	2 h	24 h	48 h	48 h
<b>Tumeur</b>	5,59 ± 3,1	12,36 ± 2,8	11,83 ± 1,7	14,33 ± 4,4
<b>Sang</b>	19,28 ± 1,5	9,31 ± 1,4	5,77 ± 2,0	8,06 ± 0,7
<b>Foie</b>	10,50 ± 2,0	10,77 ± 0,8	7,90 ± 1,8	6,94 ± 2,3
<b>Rein</b>	6,57 ± 0,9	4,13 ± 0,5	3,76 ± 0,3	3,31 ± 0,1
<b>Intestin grêle</b>	6,48 ± 3,9	14,01 ± 1,4	9,76 ± 2,0	6,07 ± 0,4
<b>Colon</b>	2,09 ± 0,7	4,72 ± 0,7	4,72 ± 0,3	3,23 ± 0,4
<b>Poumon</b>	7,69 ± 2,4	6,03 ± 0,6	5,22 ± 0,3	5,91 ± 0,5
<b>Muscle</b>	0,71 ± 0,3	0,91 ± 0,3	0,58 ± 0,03	0,80 ± 0,2
<b>Rate</b>	5,52 ± 1,8	6,45 ± 3,0	6,64 ± 3,7	3,42 ± 0,5
<b>Peau</b>	1,06 ± 0,5	3,36 ± 1,2	4,62 ± 3,2	2,60 ± 0,4
<b>Cerveau</b>	0,94 ± 0,1	0,38 ± 0,1	0,32 ± 0,03	0,29 ± 0,1
<b>Cœur</b>	9,84 ± 1,8	4,08 ± 0,9	2,85 ± 0,6	2,63 ± 0,1
<b>Os</b>	3,00 ± 0,8	1,62 ± 0,3	0,98 ± 0,2	1,78 ± 0,5
<b>Estomac</b>	1,54 ± 0,5	4,83 ± 0,74	4,84 ± 1,1	3,89 ± 0,2

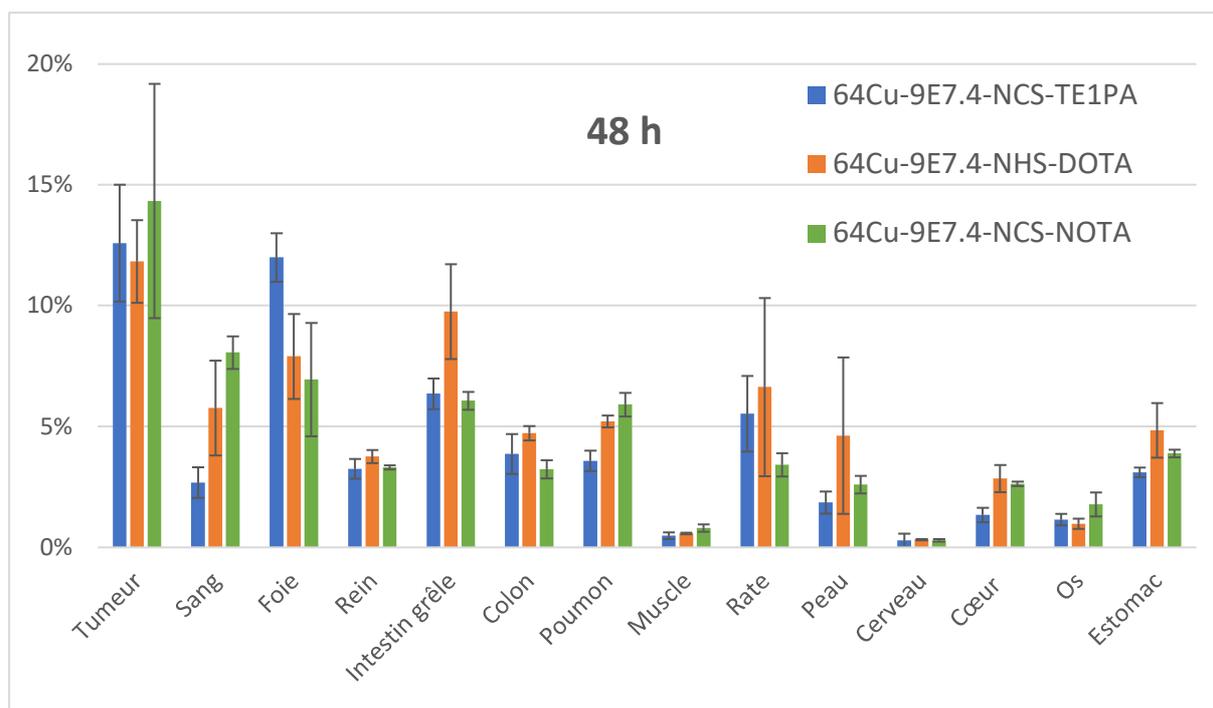
**Tableau 10** : %ID/g pour le <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS DOTA à 2 h, 24 h et 48 h post-injection et pour le <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NCS-DOTA à 48 h post-injection.



**Figure 28a :** Biodistribution du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA et du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA exprimée en %DI/g d'organe à 2 h post-injection.



**Figure 28b :** Biodistribution du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA et du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA exprimée en %DI/g d'organe à 24 h post-injection.



**Figure 28c** : Biodistribution du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA, du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA et du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-NOTA exprimée en %DI/g d'organe à 48 h post-injection.

Au temps précoce, soit 2 h après l'injection, la majorité de la radioactivité se retrouve dans le sang ( $19,28 \pm 1,5$  % DI/g pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA et  $25,22 \pm 3,6$  % pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA) et dans les organes hautement vascularisés, comme le cœur, les poumons et le foie. Le vecteur utilisé étant un AcM entier, sa distribution est relativement lente, ce qui explique le faible ciblage à la tumeur. Une forte proportion du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA se retrouve dans le foie ( $24,02 \pm 1,5$  % DI/g) et est significativement plus importante (valeur de  $t = 11,1$ ) que la quantité de  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA présente dans ce même organe ( $10,50 \pm 2,0$  % DI/g). La proportion de  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA au niveau rénal est également légèrement supérieure ( $t = 2,57$ ) à celle du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA (respectivement  $8,00 \pm 0,8$  et  $6,57 \pm 0,8$  % DI/g).

La radioactivité reste significativement supérieure ( $t = 3,27$ ) dans le foie pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA à 24 h après injection ( $12,66 \pm 0,9$  % DI/g, contre  $10,77 \pm 0,8$  % DI/g pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA). En revanche, les deux radioimmunconjugués présentent des différences notables en termes de clairance hépatique. Entre les temps 2 h et 24 h, la proportion de  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA au niveau du foie est sensiblement la même, alors que

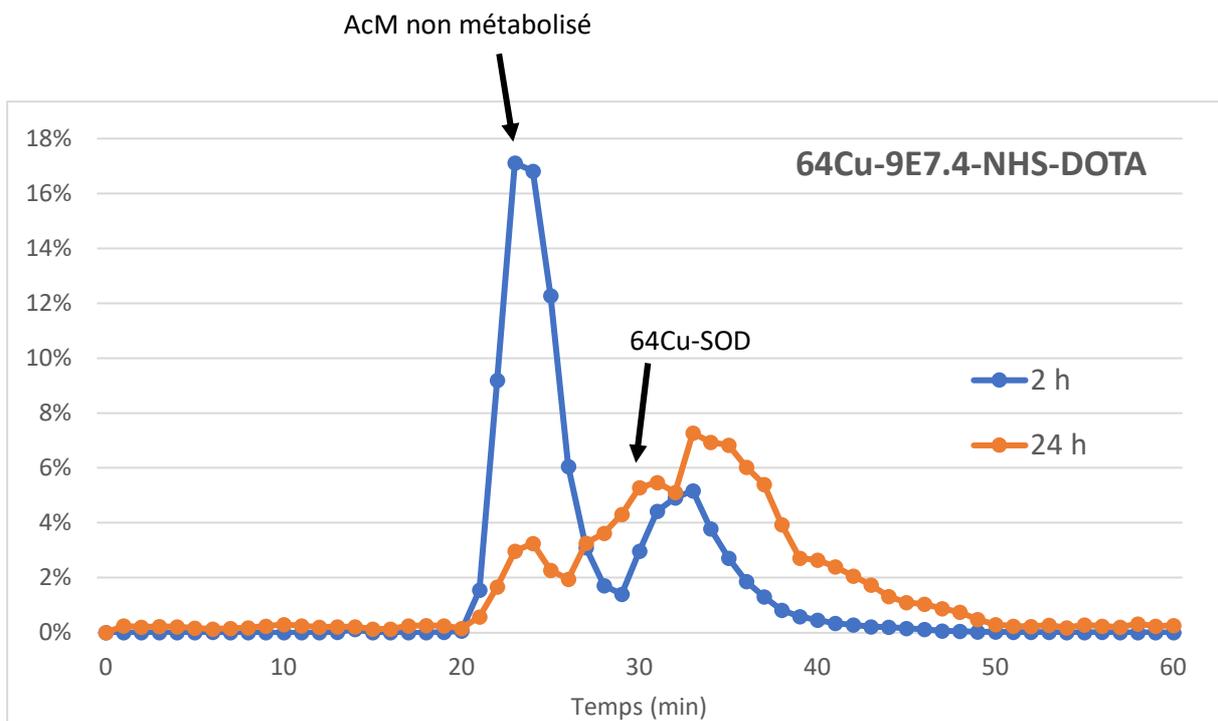
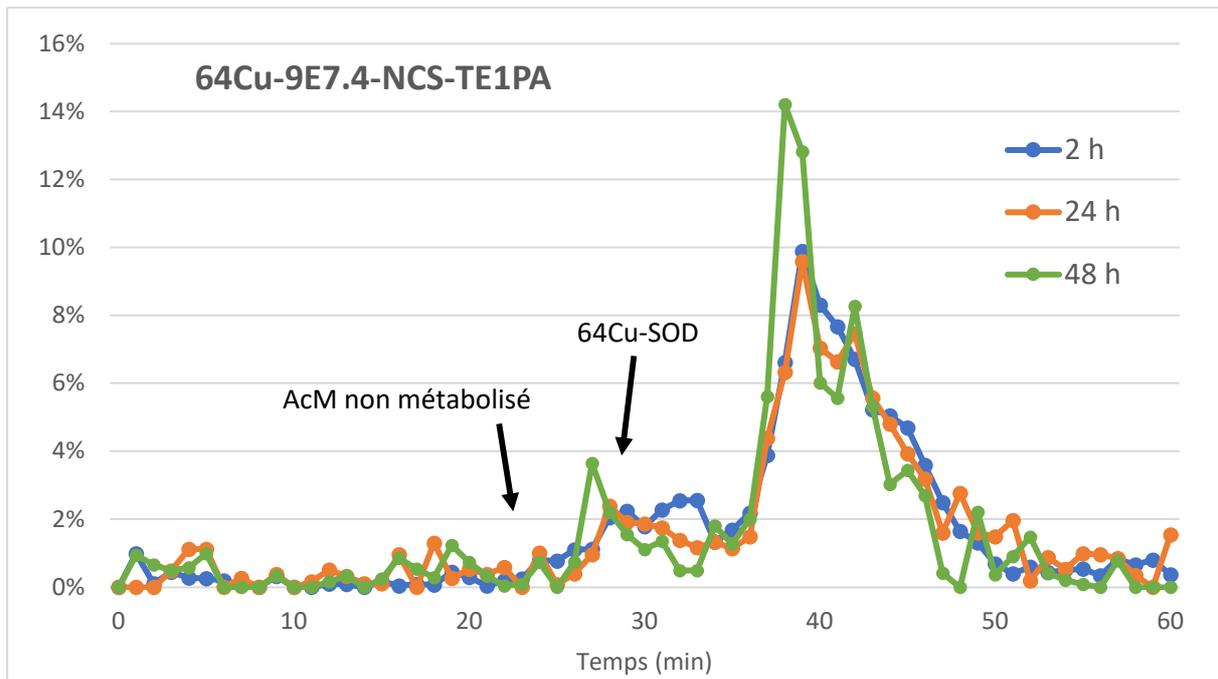
la proportion hépatique de  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA a décru d'un facteur 1,9 dans ce même laps de temps. Autre organe présentant des différences, la radioactivité retrouvée dans l'intestin grêle est significativement supérieure ( $t = 4,56$ ) pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA ( $14,01 \pm 1,4$  % DI/g) que pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA ( $7,90 \pm 2,6$  % DI/g). La proportion de  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA au niveau de cet organe augmente d'un facteur 2,2 entre 2 h et 24 h, alors qu'elle reste stable pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA.

A 48 h, la proportion de  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA était significativement plus élevée au niveau du sang ( $t = 3$ ) ainsi que dans les organes richement vascularisés, comme les poumons ( $t = 3,52$ ) et le cœur ( $t = 4,36$ ). Elle était également plus élevée ( $t = 2,81$ ) au niveau de l'intestin grêle ( $9,76 \pm 2,0$  %DI/g pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA contre  $6,36 \pm 0,6$  % DI/g pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA). Il n'y avait en revanche aucune différence significative ( $t = 1,82$ ) entre la proportion des deux radioimmunoconjugués au niveau du foie.

La biodistribution du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-NOTA 48 h après injection vient apporter quelques informations complémentaires à l'étude comparative. On retrouve une distribution sanguine importante ( $8,06 \pm 0,7$  % DI/g) ainsi que dans le cœur ( $2,63 \pm 0,1$  % DI/g) et les poumons ( $5,91 \pm 0,5$  % DI/g). La proportion retrouvée au niveau du foie était cependant moindre que pour les deux autres radioimmunconjugués ( $6,94 \pm 2,3$  % DI/g).

### 3. Étude métabolique au niveau hépatique

Les chromatogrammes obtenus lors de l'étude métabolique sont présentés dans la **Figure 29**. Deux références y ont été ajoutées, mesurées dans les mêmes conditions chromatographiques : la SOD radiomarquée au cuivre-64 ( $t_r = 29$  min) et le radioimmunoconjugué non métabolisé ( $t_r = 23$  min pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA et le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA).



**Figure 29** : Chromatogramme des extraits hépatiques des souris sacrifiées à 2 h, 24 h et 48 h après injection pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA et le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité totale.

Les profils obtenus pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA sont relativement similaires aux 3 temps observés. On ne retrouve pas de pic correspondant à l'AcM non métabolisé ou à la SOD.

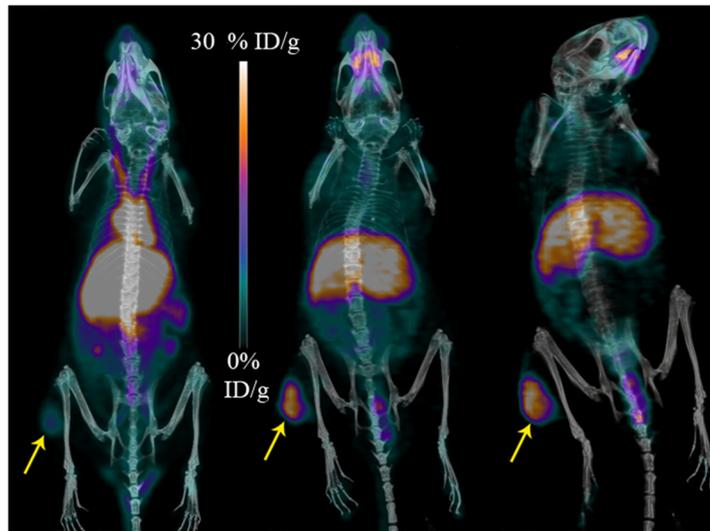
Concernant le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA, on observe un pic principal à 2 h au même temps de rétention que le radioimmunoconjugué non métabolisé ( $t_r = 23$  min). Un pic secondaire à 32 min reflète le début du métabolisme de l'AcM, ses produits de métabolisme étant de plus petite taille que l'AcM entier et possédant donc un temps de rétention plus long. A 24 h, le pic correspondant  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA non métabolisé a fortement diminué (de 17,2 % de la radioactivité totale à 3 %). Aucune donnée n'est disponible pour le temps 48 h : la radioactivité dans le surnageant était indétectable après centrifugation, toute l'activité étant concentré dans le précipité hépatique.

#### 4. Étude d'imagerie

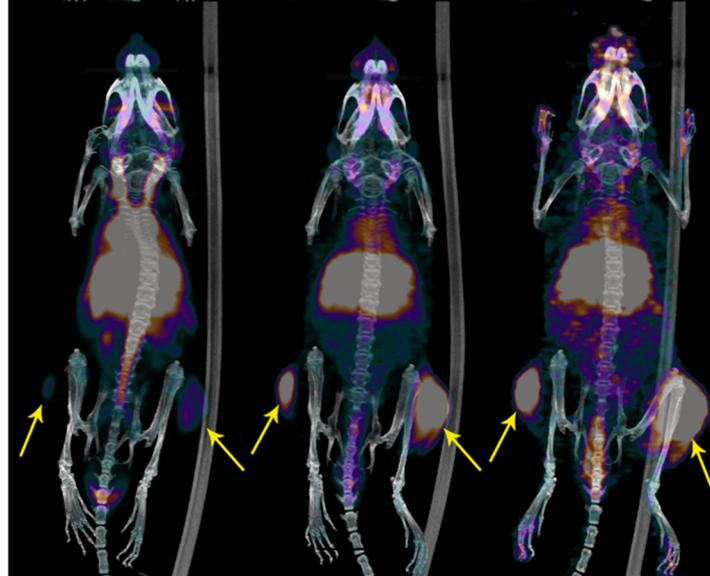
A chaque temps étudié, plusieurs souris ont été imagées (4 pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA, 3 pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA et le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-NOTA). La **Figure 30** montre les images TEP-scan obtenue pour 3 souris (une par radioimmunoconjugué). La souris injectée avec le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA présentée ici n'a développé qu'une seule tumeur après la greffe, dans la patte gauche. Les souris injectées avec le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA et le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-NOTA ont présentées une tumeur visible sur chacune des pattes arrière.

A 2 h, on observe la distribution sanguine des radioimmunoconjugués, au niveau du cœur et des artères carotides notamment. Si le ciblage tumoral commence aux temps précoces, les tumeurs deviennent clairement visibles à 24 h et 48 h. Dans le cas du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA, la clairance hépatique du radioimmunoconjugué est observable à 24 h et 48 h après injection, conduisant à une augmentation du ratio tumeur-sur-foie au cours du temps. Pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA et le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-NOTA, on remarque une distribution sanguine de la radioactivité à 48 h, confirmant ainsi les résultats obtenus lors de l'étude de biodistribution.

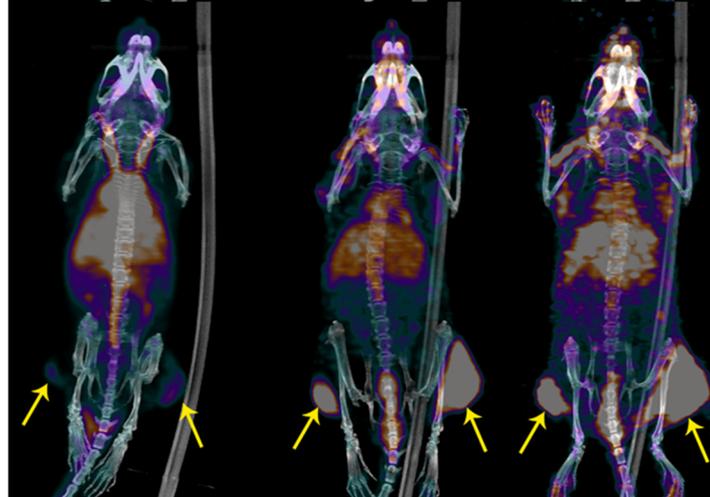
NCS-TE1PA



NHS-DOTA



NCS-NOTA



**Figure 30** : Images TEP-scan des souris greffées en sous-cutané avec les cellules 5T33, à 2 h, 24 h et 48 h après injection du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA (rang du haut), du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA (rang du milieu) et du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-NOTA (rang du bas). Les flèches jaunes pointent les tumeurs.

#### IV. DISCUSSION

Cette étude comparative a été élaborée de façon à pouvoir comparer au mieux le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA et le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA, en se concentrant tout particulièrement sur leur stabilité en milieu biologique, notamment leur résistance à la transchélation. Ce phénomène ayant majoritairement lieu dans le foie<sup>86,87</sup>, il a été décidé d'injecter aux souris une quantité importante de vecteur, de façon à saturer le métabolisme hépatique et de disposer d'une radioactivité suffisante pour mener l'étude chromatographique sur cet organe. C'est la même quantité que celle utilisée précédemment dans l'étude du TE1PA non fonctionnalisé couplé à l'AcM F6<sup>206</sup>. Une différence notable entre le 9E7.4 et le F6 est que le syndecan-1, l'antigène reconnu par le 9E7.4, est exprimé par les microvillosités des membranes basales des hépatocytes, ce qui accroît son accumulation au niveau du foie<sup>218</sup>. Compte-tenu de la période du  $^{64}\text{Cu}$ , l'AcM a été radiomarqué avec une activité suffisante pour assurer les études *in vivo* aux temps tardifs (48 h, soit 4 demi-vies environ). La biodistribution à 48 h est particulièrement intéressante pour évaluer la stabilité des radioimmunoconjugués : comparée aux temps plus précoces, elle permet de visualiser leur clairance dans les organes d'intérêt.

Les résultats de la biodistribution 2 h après injection ont montré une proportion importante de la radioactivité au niveau du foie pour les deux radioimmunoconjugués, mais cependant significativement plus importante pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA. Cette différence est également clairement visible sur les images TEP-scan. Ce phénomène a déjà été décrit pour cet anticorps<sup>200</sup> et peut s'expliquer entre autre par le fait que le foie est un organe richement vascularisé ; il s'agit donc d'un reflet de la distribution sanguine du radioimmunoconjugué. La différence d'accumulation hépatique entre le TE1PA et le DOTA avait déjà été observée lors des études précédentes avec les ligands seuls<sup>205</sup>. A 2 h après injection chez la souris saine, la quantité  $^{64}\text{Cu}$ -TE1PA était presque 5 fois plus importante que celle du  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA au niveau du foie ainsi qu'au niveau des reins. Cet écart pouvait s'expliquer par une plus grande lipophilie des complexes de TE1PA ainsi que les différences de charge globale des complexes (+1 pour le  $^{64}\text{Cu}$ -TE1PA et -2 pour le  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA), entraînant une plus grande rétention au niveau hépatique et rénal<sup>83</sup>. Les ligands pouvant influencer la biodistribution des vecteurs sur

lesquels ils sont couplés<sup>213</sup>, il n'est pas surprenant de retrouver ces mêmes propriétés pour les immunoconjugués correspondants.

L'étude de métabolisme à 2 h confirme ces résultats. Le pic principal retrouvé pour le <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA se trouve au même temps de rétention que la référence non métabolisée ; on ne retrouve en revanche pas ce pic pour le <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NCS-TE1PA. Cela suggère que seule une petite proportion du <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA a été métabolisé 2 h après injection, ce qui peut être attribuable au plus faible % DI/g de foie comparé au <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NCS-TE1PA. La proportion non métabolisée du <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA (tr = 23 min) reflète sa distribution extracellulaire, le second pic à 33 min traduisant le début de la métabolisation intracellulaire du radioimmunoconjugué. Les propriétés chimiques du TE1PA, notamment les différences au niveau de la charge globale des complexes, peuvent avoir conduit à une internalisation plus rapide du <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NCS-TE1PA au niveau des hépatocytes, et ainsi à une augmentation précoce du métabolisme du radioimmunoconjugué. Ce phénomène avait été constaté pour les affibodies<sup>219</sup>, où l'augmentation de la charge négative des complexes avaient entraîné une diminution de la proportion retrouvée au niveau hépatique. Ces différences de charges peuvent aussi expliquer la légère accumulation du <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NCS-TE1PA (chargé positivement) au niveau rénal, comparé au <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA (chargé négativement).

L'accumulation hépatique du <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NCS-TE1PA retrouvée 24 h après injection est significativement supérieure à celle du <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA au même temps. On constate cependant une forte clairance hépatique du <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NCS-TE1PA, dont la proportion a diminué d'un facteur 1,9 entre 2 h et 24 h. En revanche, la proportion de <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA est restée sensiblement la même. Ces résultats confirment une fois de plus ceux observés précédemment avec les complexes non vectorisés<sup>206</sup>. L'étude de métabolisme hépatique à 24 h montre une disparition du pic correspondant au <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA non métabolisé. Il est possible que la <sup>64</sup>Cu-SOD soit incluse dans le profil des métabolites, étant donné que la plus faible résistance du <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA à la transchélation par rapport au <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NCS-TE1PA a déjà été démontrée<sup>206,207</sup>. Les profils chromatographiques du <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NCS-TE1PA ne montrent pas de pic correspondant au temps de rétention de la SOD, et ce aux 3 temps étudiés. La présence d'une transchélation, et ainsi d'un relargage du

$^{64}\text{Cu}$  libre dans l'organisme par le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA, est appuyée par la plus grande proportion de radioactivité retrouvée à 24 h dans l'intestin grêle pour ce radioimmunoconjugué. Le cuivre en excès au niveau hépatique est éliminé par excrétion biliaire, principalement par le biais de la protéine de transport Atox1<sup>74</sup>. Il est donc possible que la radioactivité retrouvée dans l'intestin grêle corresponde au  $^{64}\text{Cu}$  transchélaté du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA vers les protéines de transport intracellulaires du foie, puis excrété ensuite au niveau de la bile.

La biodistribution aux temps tardifs vient renforcer l'hypothèse d'une dissociation des complexes de  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA. La proportion de  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA au niveau de l'intestin grêle reste significativement plus élevée que pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA, suggérant toujours l'élimination biliaire du  $^{64}\text{Cu}$  libre. De plus, la radioactivité a été retrouvée à des niveaux significativement plus importants pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA dans le sang ainsi que les organes richement vascularisés comme le cœur et les poumons. Cette distribution sanguine est par ailleurs clairement observable sur les images TEP-scan à 48 h. Il est donc possible qu'après dissociation du DOTA et prise en charge au sein des hépatocytes, le  $^{64}\text{Cu}$  libre se soit ensuite fixé sur la céruléoplasmine, la principale protéine transportant le cuivre dans le sang<sup>78</sup>. Cette observation peut être reliée à l'étude de métabolisme : la radioactivité était indétectable dans le surnageant après centrifugation, toute l'activité étant concentrée dans le culot du broyat hépatique. On peut supposer que la radioactivité restante correspond au  $^{64}\text{Cu}$  fixé au niveau de protéines n'ayant pas pu être séparées *via* la méthode utilisée. Le profil retrouvé pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA suggérerait plutôt la présence du  $^{64}\text{Cu}$  sur des métabolites de l'AcM, et donc la résistance des complexes  $^{64}\text{Cu}$ -TE1PA à la transchélation. Le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA présente également une forte clairance hépatique entre les temps 2 h et 48 h : la radioactivité y décroît d'un facteur 9,4, alors qu'elle ne décroît que d'un facteur 1,3 pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA.

Les éléments complémentaires apportés par la biodistribution du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-NOTA à 48 h semblent également montrer une transchélation du  $^{64}\text{Cu}$  pour ce ligand. On retrouve en effet une plus forte proportion de la radioactivité dans le sang, le cœur et les poumons, tout comme le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA. Les images TEP-scan montrent par ailleurs

une distribution comparable à celle du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA, avec cependant une accumulation hépatique moindre.

Ces résultats tendent donc à démontrer une supériorité des complexes de  $^{64}\text{Cu}$ -TE1PA en termes de stabilité *in vivo* par rapport aux complexes  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA et  $^{64}\text{Cu}$ -NOTA, dans le modèle utilisé. Bien qu'il existe une rétention du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA au niveau hépatique aux temps précoces, entraînant une augmentation du métabolisme de l'AcM, les complexes ont bien mieux résisté à la transchélation par les cuproprotéines du foie. Le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA a également présenté une bonne clairance hépatique au cours du temps, alors que la radioactivité a décru lentement pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA. Cela peut s'expliquer par la transchélation du  $^{64}\text{Cu}$  vers les protéines hépatiques, conduisant à une accumulation de la radioactivité dans le foie. Les résultats obtenus à 48 h démontrent également une meilleure stabilité du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA par rapport au  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-NOTA.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---

Ce travail prend place au sein de l'élaboration et de l'étude de ligands azamacrocycliques dérivés de l'acide picolinique. Le but était de mettre au point le radiomarquage de vecteurs biologiques au cuivre-64 afin de permettre une application en imagerie phénotypique-TEP et/ou en thérapie. Ces ligands ont été élaborés et synthétisés par l'équipe COSM et présentent un potentiel important afin d'améliorer la stabilité *in vivo* des radiomarquages. En effet, l'un des inconvénients majeurs des ligands disponibles actuellement est leur manque de résistance à la transchélation, par déplacement du cuivre-64 depuis le complexe vers les protéines et enzymes des milieux biologiques. L'un de ces ligands, le TE1PA, dispose de propriétés particulièrement intéressantes. Sa cinétique de complexation est rapide dans des conditions assez douces, permettant de ne pas altérer un vecteur biologique. Il possède une grande résistance à la réduction ainsi qu'une bonne sélectivité vis-à-vis du cuivre. *In vivo*, il a démontré une résistance à la transchélation supérieure au ligand azamacrocycles utilisé comme référence, le DOTA.

Le TE1PA doit cependant être préalablement modifié pour introduire une fonction permettant le couplage à un vecteur biologique. Outre les contraintes techniques qu'impose cette méthode, la fonctionnalisation du TE1PA *via* l'acide picolinique entraîne une diminution de ses propriétés de chélation. Si cela ne constitue pas un réel obstacle à l'utilisation du TE1PA, la synthèse d'une version directement fonctionnalisée a été identifiée comme un outil qui doit permettre de simplifier le couplage et de restaurer les excellentes propriétés démontrées par le ligand non couplé. C'est dans cet objectif que l'équipe COSM a synthétisé le NCS-TE1PA.

La première étape de ce travail a donc été d'étudier le NCS-TE1PA *in vitro*, afin de déterminer la faisabilité du couplage à un AcM et du radiomarquage au cuivre-64. Elle a été démontrée sur deux types d'AcM, un humanisé et un de rat. Le NCS-TE1PA a été couplé avec un ratio de 5 ligands par AcM en moyenne, en utilisant les conditions standards le plus souvent retrouvées dans la littérature. Le NCS-TE1PA a également démontré sa supériorité par rapport à sa version non fonctionnalisée. Le couplage est plus rapide, simplifié, consomme moins de

ligands et n'entraîne pas la formation d'agrégats d'AcM. La cinétique de complexation du  $^{64}\text{Cu}$  par le 9E7.4-NCS-TE1PA est également rapide et quantitative dans des conditions standards.

Une fois les paramètres de couplage et de marquage du NCS-TE1PA définis, l'étape suivante a été de comparer les résultats obtenus avec des ligands commerciaux servant de référence. Deux paramètres principaux ont été particulièrement étudiés, ayant un impact sur les propriétés du radiopharmaceutique final. Le ratio ligand/AcM d'une part, conditionne l'activité spécifique molaire : plus il y a de ligands couplés par AcM, plus l'activité spécifique va être élevée. L'immunoréactivité d'autre part, permet de vérifier que le vecteur a conservé ses propriétés de reconnaissance à la cible. Ces deux paramètres sont liés : plus le ratio ligand/AcM est important, plus le risque d'altérer le CDR de l'AcM est grand, et donc de diminuer l'immunoréactivité. Il est essentiel de maîtriser le processus de modification de l'AcM pour respecter cet équilibre. Les résultats obtenus ont confirmé la supériorité du NCS-TE1PA par rapport aux ligands commerciaux étudiés.

La deuxième étape de ce travail a été d'évaluer la stabilité *in vivo* des complexes de cuivre du NCS-TE1PA. L'étude *in vitro* a montré que le NHS-DOTA permettait d'obtenir des résultats similaires au NCS-TE1PA, bien que légèrement inférieurs : c'est donc ce ligand qui a été choisi pour une étude comparative complète. Celle-ci portait sur trois aspects : une biodistribution, le métabolisme hépatique et l'imagerie TEP-scan. Le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA et le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA ont été injectés dans les conditions les plus proches possibles afin de faciliter la comparaison entre les deux ligands. Afin d'apporter des renseignements complémentaires, le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-NOTA a été intégré à l'étude sur les temps tardifs (48 h après injection).

Les résultats fournis par les trois études *in vivo* tendent tous à démontrer une supériorité du ligand TE1PA par rapport au DOTA et au NOTA en termes de stabilité *in vivo*. Le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA présente une accumulation hépatique initiale plus importante, du fait de la charge globale des complexes qui est positive, mais sans que cela soit corrélé à une transchéliation du cuivre vers les cuproprotéines du foie. De plus, le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA présente une importante clairance hépatique au cours du temps, avec une augmentation constante du ratio tumeur-sur-foie. A 48 h, on ne retrouve pas de radioactivité au niveau

sanguin, ce qui le cas du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA et du  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-NOTA et traduit une transchélation suivie d'une prise en charge du cuivre-64 libre par la céruléoplasmine. En conséquence, les images TEP-scan obtenues à 48 h pour le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-TE1PA sont de meilleure qualité, avec un ratio tumeur-sur-sang plus élevé permettant une meilleure interprétation.

Cette étude a donc permis de démontrer l'intérêt du NCS-TE1PA pour l'imagerie phénotypique-TEP au cuivre-64, tout particulièrement aux temps tardifs. La facilité du couplage du TE1PA avec un haut ratio ligand/AcM sans altérer les propriétés du vecteur permet d'obtenir des radiopharmaceutiques dotés d'une excellente activité spécifique molaire. Etant de plus sélectif pour le cuivre par rapport aux autres ions divalents pouvant être présents dans la solution, les contaminants issus du processus de production du  $^{64}\text{Cu}$  n'ont pas d'influence sur le radiomarquage. Le TE1PA peut donc être utilisé à la place d'autres ligands macrocycliques fonctionnalisés et trouve parfaitement sa place en recherche pré-clinique pour l'imagerie au cuivre-64. Un projet avec la SATT (Société d'Accélération de Transfert de Technologies) Ouest Valorisation est en cours afin de mesurer la possibilité de commercialisation du NCS-TE1PA pour ces applications, pour des entreprises privées ou publiques.

Nous avons pu constater lors de nos études qu'il y avait une influence de la charge globale des anticorps radiomarqués sur la distribution *in vivo* de la radioactivité, expliquant notamment les bons index de fixation du cuivre avec le NOTA aux temps précoces dans l'étude d'imagerie. En effet, l'AcM avait été modifié avec un faible nombre de ligand (proche de 1) et le  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NCS-NOTA était globalement neutre, alors que dans le cas du NCS-TE1PA, la charge globale de l'AcM était fortement modifiée par le grand nombre de ligands couplés et chargée positivement. Un axe de recherche futur qui sera explorer va concentrer entre autres cette problématique.

Le NCS-TE1PA peut également être couplé à d'autres AcM ou vecteurs biologiques. Un des axes actuellement explorés serait le développement de sondes théranostiques associant un agent d'imagerie (le  $^{64}\text{Cu}$  dans le cas du TE1PA) à une molécule photosensibilisante permettant la thérapie photodynamique à 2 photons. Cette technique innovante permet de

détruire les cellules cibles à l'aide d'agents devenant toxique une fois exposés à la lumière. Le TE1PA sert ainsi de chélate pour l'agent d'imagerie et permet de fixer la sonde à un vecteur. Ces molécules seraient principalement destinées à cibler les cellules hypoxiques, un axe de thérapie et d'imagerie majeur en cancérologie. Le NCS-TE1PA sera également intégré dans un projet de recherche en partenariat avec Rennes, pour permettre le radiomarquage de peptides pour le diagnostic et/ou la thérapie du carcinome hépatocellulaire. Il démontre ainsi une fois de plus son intérêt pour faciliter l'élaboration de radiopharmaceutiques contenant du cuivre-64 dans les approches théranostiques en cancérologie.

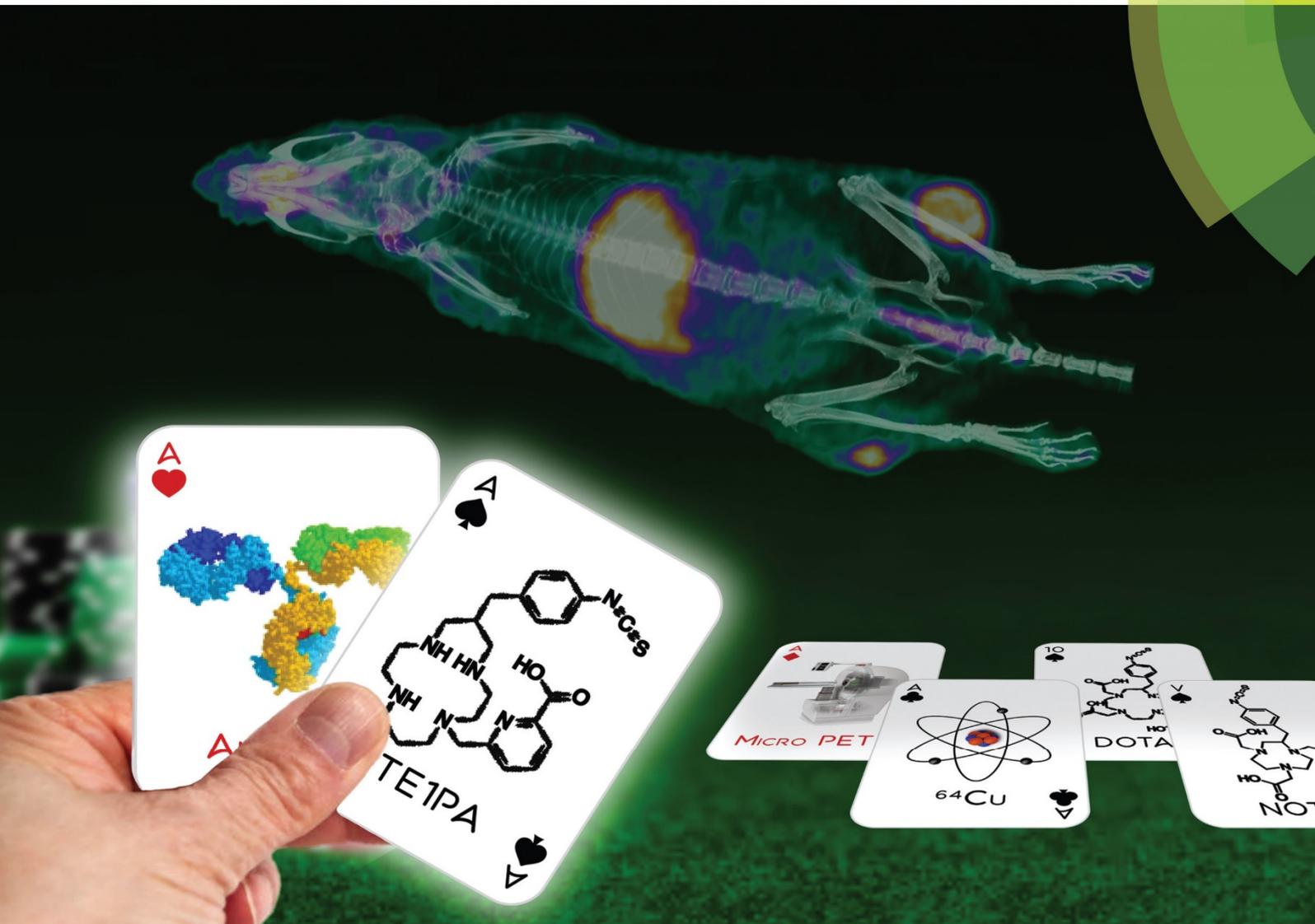
---

## **ANNEXES**

---

# Organic & Biomolecular Chemistry

rsc.li/obc



ISSN 1477-0520

**PAPER**Alain Faivre-Chauvet, Raphaël Tripier *et al.*

Synthesis of C-functionalized TE1PA and comparison with its analogues.

An example of bioconjugation on 9E7.4 mAb for multiple myeloma

 $^{64}\text{Cu}$ -PET imaging



Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2018, **16**, 4261

## Synthesis of C-functionalized TE1PA and comparison with its analogues. An example of bioconjugation on 9E7.4 mAb for multiple myeloma $^{64}\text{Cu}$ -PET imaging†

Thomas Le Bihan,<sup>a</sup> Anne-Sophie Navarro,<sup>b</sup> Nathalie Le Bris,<sup>a</sup> Patricia Le Saëc,<sup>b</sup> Sébastien Gouard,<sup>b</sup> Ferid Haddad,<sup>c</sup> Jean-François Gestin,<sup>b</sup> Michel Chérel,<sup>b,d</sup> Alain Faivre-Chauvet\*<sup>b</sup> and Raphaël Tripier<sup>†</sup><sup>\*,a</sup>

In view of the excellent copper(II) and  $^{64}\text{Cu}$ -copper(II) complexation of a TE1PA ligand, a monopicolinate cyclam, in both aqueous medium and *in vivo*, we looked for a way to make it bifunctional, while maintaining its chelating properties. Overcoming the already known drawback of grafting *via* its carboxyl group, which is essential to the overall properties of the ligand, a TE1PA bifunctional derivative bearing an additional isothiocyanate coupling function on a carbon atom of the macrocyclic ring was synthesized. This led to an architecture that is comparable to that of other commercially available bifunctional copper(II) chelators such as *p*-SCN-Bn-DOTA already used in clinical trials for  $^{64}\text{Cu}$ -immuno-PET imaging. The C-functionalization of TE1PA on one carbon atom in the  $\beta$ -N position of the cyclam backbone was successfully achieved by adapting our patented methodology to the huge challenge, allowing the regio-specific mono-N-functionalization of the unsymmetrical ligand. The obtained ligand *p*-SCN-Bn-TE1PA was coupled to a 9E7.4 murine antibody (mAb), an IgG<sub>2a</sub> anti CD-138 for multiple myeloma (MM) targeting. The conjugation efficiency was assessed by looking at the  $^{64}\text{Cu}$  radiolabeling and the radiopharmaceutical  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA immunoreactivity, and in particular by comparing with 9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA and 9E7.4-*p*-SCN-Bn-DOTA obtained from commercial and presumably highly efficient chelators NOTA and DOTA, respectively. The results are quite clear, showing that *p*-SCN-Bn-TE1PA has a coupling rate 5 times higher and an immunoreactivity 1.5 to 2 times greater than those of its two competitors. *p*-SCN-Bn-TE1PA also outperforms TE1PA conjugated *via* its carboxylic function on the same antibody. The first  $^{64}\text{Cu}$ -immuno-PET preclinical study in a syngeneic model of MM was performed, confirming the good *in vivo* properties of  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA for PET imaging, considering the high clearance even after 24 h and the particularly important tumor-to-liver ratio that was increasing at 48 h.

Received 27th February 2018,  
Accepted 5th April 2018

DOI: 10.1039/c8ob00499d

rsc.li/obc

## Introduction

It is clear that positron emission tomography (PET) is of central interest in medicine, not only for cancer imaging,<sup>1</sup> but also for the diagnosis of other diseases (Alzheimer, hypoxia

*etc.*)<sup>2</sup> and prevention of various health issues (thrombosis, atherosclerosis *etc.*).<sup>3</sup> This imaging modality is indeed now presented as complementary to other techniques, such as magnetic resonance imaging (MRI) or optical imaging (luminescence). In the area of nuclear medicine and in particular PET imaging,  $^{18}\text{F}$  is currently the most used radionuclide, particularly employed in  $^{18}\text{F}$ -FDG, (2-deoxy-2-( $^{18}\text{F}$ ) fluoro-D-glucose), a radiolabeled glucose analogue. If this radiolabeled sugar is now the standard radiotracer used for the PET prognosis imaging of numerous tumors,<sup>4</sup> it is acknowledged that it presents several limitations in terms of targeting imaging and half-life ( $t_{1/2} = 110$  min). Radiolabeling *via* radiometals, as currently clinically performed using  $^{68}\text{Ga}$  (PET emitter; half-life: 68 min;  $\beta^+$  max: 1899 keV), appears to be the strategy of choice (rapid, simple and powerful) for using targeted nuclear medicines with both low and high molecular

<sup>a</sup>Université de Brest, UMR-CNRS 6521/IBSAM, UFR Sciences et Techniques, 6 Avenue Victor le Gorgeu, C.S. 93837, 29238 Brest, France.

E-mail: raphael.tripier@univ-brest.fr

<sup>b</sup>Université de Nantes, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes Angers (CRCINA), Unité INSERM 1232 – CNRS 6299, 8 quai Moncoussu, BP 70721, 44007 Nantes Cedex, France

<sup>c</sup>Groupement d'Intérêt Public ARRONAX, 44800 Saint-Herblain, France

<sup>d</sup>Institut de Cancérologie de l'Ouest, 44800 Saint-Herblain, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Compound characterization:  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, HRMS spectra, bioconjugation and immunoreactivity tables, and UPLC profiles. See DOI: 10.1039/c8ob00499d

weight vectors. Among all the radiometals of interest currently under investigation for PET imaging,  $^{64}\text{Cu}$  appears to be one of the most promising since it presents an interesting half-life compared to others ( $^{89}\text{Zr}$ : 78 h;  $^{124}\text{I}$ : 100.3 h). According to its radiophysical properties,  $^{64}\text{Cu}$  seems to be the radionuclide of choice for investigating PET-phenotypic imaging ( $t_{1/2} = 12.7$  h,  $\beta^+$  17.4%,  $E_{\text{max}} = 0.656$  MeV,  $\beta^-$  39.6%,  $E_{\text{max}} = 0.573$  MeV). In particular, it also possesses a useful radioisotope,  $^{67}\text{Cu}$  ( $t_{1/2} = 62.0$  h,  $\beta^-$  100%,  $E_{\text{max}} = 0.577$  MeV,  $\gamma$  16%,  $E_{\text{max}} = 0.093$  MeV,  $\gamma$  48%,  $E_{\text{max}} = 0.185$  MeV), which is only just beginning to become available and allows targeted radiotherapies. The perfect theranostic pairing of  $^{64}\text{Cu}$  and  $^{67}\text{Cu}$  is ideally suited for use in molecular imaging, as it holds many advantages over its competitors. Additionally, these isotopes are both GMP (Good Manufacturing Practice) suitable and it is possible to have a centralized supply of GMP products.

In line with our objective of developing copper chelators for immuno-PET imaging that are able to replace DOTA, which is the only macrocyclic chelator ever used for immuno-PET clinic trials<sup>5</sup> (mainly in its bifunctional *p*-SCN-Bn-DOTA form or as a close derivative, see Fig. 1),<sup>6</sup> we recently synthesized cyclam-based ligands bearing an additional picolinate function that are able to form astonishingly thermodynamically stable and kinetically inert copper complexes.<sup>7</sup> Among them, a mono-picolate cyclam, TE1PA (see Fig. 1), presents interesting properties for both natural copper and copper-64 chelation, in both *in vitro* and *in vivo* media, especially when compared to other chelators such as CB-TE2A or NOTA and in particular, DOTA.<sup>8</sup>

This led us to explore the conjugation of this ligand on an antibody vector to validate its use for radiopharmaceutical development. TE1PA was then coupled to an F6 antibody, an IgG<sub>1</sub> that recognized CEA (carcinoembryonic antigen) through the carboxyl function of the picolinate, and was studied *versus* F6-*p*-SCN-Bn-DOTA.<sup>9</sup> The usefulness of TE1PA in phenotypic imaging has been demonstrated, showing good uptake of  $^{64}\text{Cu}$ -F6-TE1PA by the tumor with excellent contrast between the tumor and healthy tissue in the phenotypic images (mAb-TE1PA, see Fig. 1). However, our results showed a decrease of its chelating properties due to “structure changes” (overall charge, modification of the carboxylic acid into an amide function *etc.*) during *in vivo*  $^{64}\text{Cu}$  immuno-PET experiments. This outcome, already described in numerous papers,<sup>10</sup> can be overcome through the introduction of an additional function *via* a carbon atom of the macrocyclic structure.<sup>11</sup> This allows preservation the chelating properties of the ligand as proven by numerous complexation studies conducted with various metals.<sup>12</sup> No efficient synthetic methodology able to give easy access to such cyclam-based bifunctional chelators was available in literature until we patented, then published in 2014, a general procedure that leads to “conjugable” analogues of cyclams, such as TETA, TE2A, CB-TE2A and others.<sup>13</sup> This technique led to *C*-functionalized BCAs (bifunctional chelating agents) that have been proven to maintain the overall chelating structure of the chelator.<sup>9,14</sup> The isothiocyanate-TE2A-derivative, *p*-SCN-Bn-TE2A (Fig. 1), for instance, was employed with success after conjugation with a 9E7.4 antibody (a rat IgG<sub>2a</sub> against CD-138 antigen, also known as syndecan-1, produced in the lab) in an immuno-PET  $^{64}\text{Cu}$  preclinical study in a syngeneic model of multiple myeloma (MM).<sup>15</sup> We then investigated the possibility of applying this methodology to the synthesis of a BCA analogue of TE1PA, bearing an isothiocyanate anchoring function to repeat such a success for the same targeted application. However, inserting an additional function on a mono-*N*-functionalized macrocycle is not an easy task considering its non-symmetrical structure and the fact that the overall synthesis route has to be reinvestigated to allow full control of the macrocycle design. Such a project was very challenging, because the macrocycle synthesis had to be rethought from the beginning.

In this paper, we present the first synthesis of the bifunctional chelating agent *p*-SCN-Bn-TE1PA using our *C*-functionalization methodology to obtain a conjugate of TE1PA that preserves its original properties. This work also presents the conjugation of the new BCA with a 9E7.4 antibody and its characterization *via* radiolabeling followed by preliminary immunoreactivity studies. The study was also performed with *p*-SCN-Bn-DOTA and *p*-SCN-Bn-NOTA to compare our BCA to two already renowned references, the analogous BCAs of DOTA and NOTA, respectively. A comparison was also made with our previously published *p*-SCN-Bn-TE2A<sup>9</sup> and to TE1PA<sup>15</sup> directly conjugated *via* its carboxylic acid function. Finally, a preliminary  $^{64}\text{Cu}$  immuno-PET phenotypic imaging study of a MM cancer was performed and discussed, highlighting the good performance of our new radiopharmaceutical.

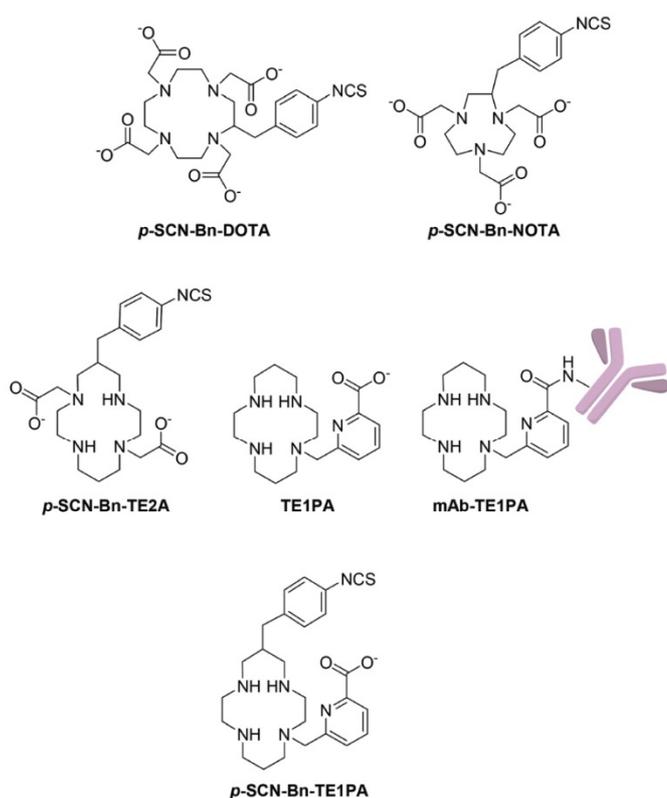


Fig. 1 The ligands discussed in this study.

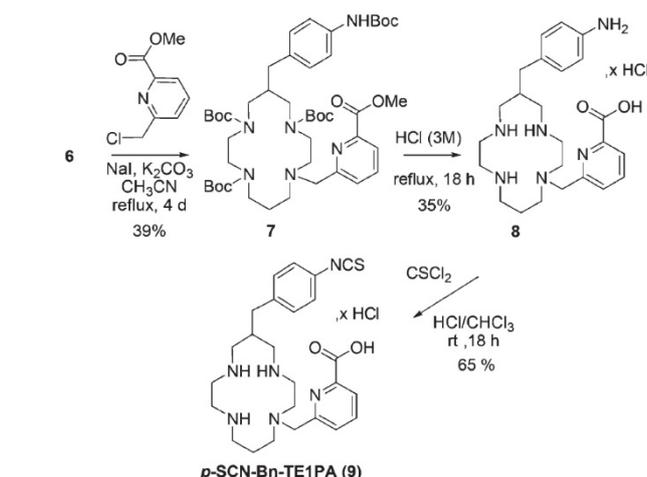
## Results and discussion

### Synthesis of a bifunctional analogue of TE1PA:

#### *p*-SCN-Bn-TE1PA (9)

Two main difficulties had to be overcome to allow the synthesis of the targeted bifunctional ligand *p*-SCN-Bn-TE1PA, **9**: the macrocyclization that generates a coupling function and the regiospecific mono-*N*-functionalization of the obtained azamacrocycle. The bisaminal chemistry was chosen for its double interest allowing the cyclization *via* a template effect and the regiospecific alkylation through discriminating one of the four nitrogen atoms of the macrocycle. The *C*-functionalized analogue of TE1PA, *p*-SCN-Bn-TE1PA (**9**), was synthesized according to a revised protocol based on our previously described method for synthesising *C*-functionalized cyclams (Schemes 1 and 2). The characterization data and spectroscopic spectra for each intermediate are given in the ESI (from Fig. S1 to S26†).

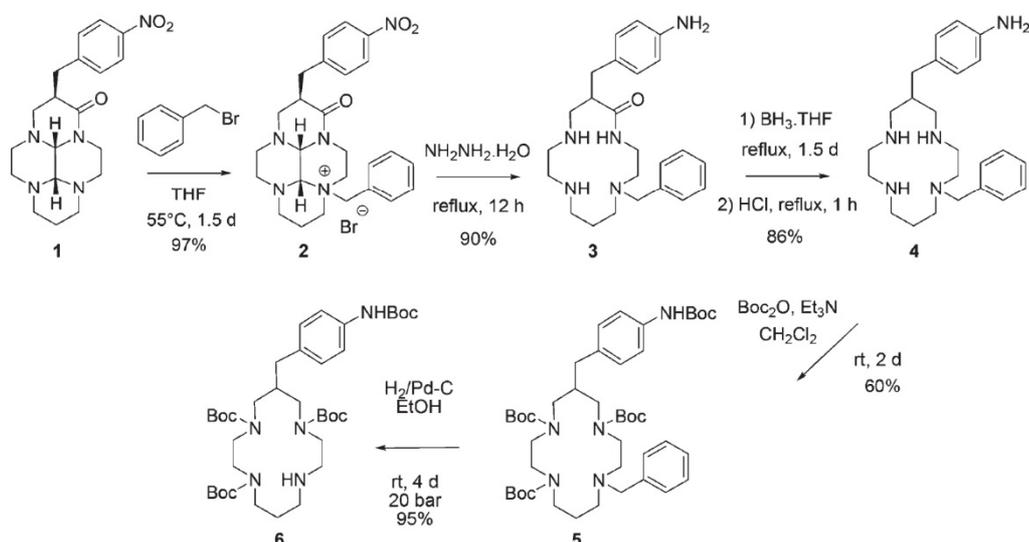
Starting compound **1** was previously obtained in a good overall yield using an organic template effect allowing the cyclization of the bisaminal derivative of the linear tetraamine 1,4,8,11-tetraazaundecane with a functionalized  $\alpha,\beta$ -unsaturated ester through the reaction of the secondary amines of the bisaminal group *via* both an aza-Michael addition and a nucleophilic addition/elimination that generates an appended arm on the carbon skeleton.<sup>13</sup> The regiospecific *N*-alkylation of **1** with benzylbromide was carried out to give the monoammonium salt **2** quantitatively. This regiospecific alkylation happens due to the structure of the key-intermediate **1** and has been already studied in our previous work.<sup>13</sup> A subsequent one-pot deprotection of the bisaminal bridge and reduction of the nitro function of **2** was then achieved in hydrazine hydrate under reflux to give **3**, a BCA oxocyclam. It is worth noting that the selective removal of the bisaminal bridge without reaction on the nitro benzyl group



Scheme 2 Synthesis of *p*-SCN-Bn-TE1PA (**9**).

was also possible when the reaction was carried out at room temperature, but this was not useful in our case since the nitro function had to be reduced anyway. Further reduction of the amide group of **3** with  $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$  led to the monobenzylated (monobenzylated) *p*- $\text{NH}_2$ -Bn-cyclam **4**. Then, the protection of the primary and secondary amines of **4** was performed using Boc groups to give **5**, which was subsequently debenzylated *via* catalytic hydrogenolysis to yield **6**. This compound comprised a regiospecifically tetra-*N*-protected *C*-functionalized cyclam with only one remaining free secondary amino function that could prove useful for many other applications.

Alkylation of the free secondary amino function of **6** was performed with methyl 6-(chloromethyl)pyridine-2-carboxylate to give **7**, which was subsequently entirely deprotected *via* acidic hydrolysis to give **8** as its hydrochloride salt. The final conjugable BCA, *p*-SCN-Bn-TE1PA (**9**), was then obtained after



Scheme 1 Synthesis of the regiospecifically tetra-*N*-protected *C*-functionalized cyclam **6**.

treatment of **8** with thiophosgene following a standard procedure (Scheme 2).

Despite the number of steps, this synthesis was easily performed and led to an acceptable overall yield. One can note that, in the first step, the direct introduction of the picolinate moiety is theoretically possible, but so far, the low reactivity of methyl 6-(chloromethyl)pyridine-2-carboxylate did not allow the formation of the ammonium salt equivalent to **2**. Studies are in progress to improve such a direct alkylation. Additionally, following a common starting procedure, the present synthetic strategy led to several compounds of interest (*cis* di-*N*-protected cyclam **3**, mono-*N*-protected cyclam **4**, and tetra-*N*-protected cyclam **6**) versus only one for the previously described syntheses.

### Bioconjugation on an 9E7.4 antibody and <sup>64</sup>Cu radiolabeling: characterization of the immunoconjugate

Considering our previous investigations<sup>8,9</sup> and taking into account the fact that DOTA is the only clinically acknowledged reference for <sup>64</sup>Cu immuno-PET imaging,<sup>5</sup> we first performed a comparative study between *p*-SCN-Bn-TE1PA and *p*-SCN-Bn-DOTA (Fig. 1), its direct DOTA-BCA analogue. Moreover, with NOTA also being a strong competitor currently studied in this field, *p*-SCN-Bn-NOTA was included in this work (Fig. 1).<sup>16</sup> For targeting applications, we chose an *in vivo* model using the previously mentioned 9E7.4 antibody, produced in the lab, with well-known properties.<sup>17</sup> This antibody presents high liver uptake compared to others and was chosen in order to increase hepatic metabolization that increases the copper transchelation from ligand to metalloproteins.

A simple, quick and reproducible coupling method is essential for the development of a radiopharmaceutical. In this work, the conjugation of the three BCAs was evaluated through <sup>64</sup>Cu radiolabeling testing. To achieve the immunoconjugate synthesis, the same coupling protocol was used for coupling between the BCA and the 9E7.4 antibody in order to obtain a suitable ligand to antibody ratio, leading to a specific activity that allowed further biological studies.

Bioconjugation of *p*-SCN-Bn-TE1PA (**9**) and its NOTA and DOTA competitors, *p*-SCN-Bn-NOTA and *p*-SCN-Bn-DOTA, respectively, was performed on a 9E7.4 antibody (see Experimental section), with a comparable molar BCA/antibody ratio of 20, which is in agreement with literature values,<sup>18</sup> to obtain 9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA (**10**), 9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA (**11**) and 9E7.4-*p*-SCN-Bn-DOTA (**12**), respectively. Less ligand could lead to non-grafted antibodies remaining after coupling, while more ligand could increase the risk of modifying the antigen-binding site, thus affecting the immunoreactivity of the radioimmunoconjugates (see after). The immunoconjugates were then synthesized and radiolabeled with <sup>64</sup>Cu. The best conditions, *i.e.* sodium acetate 0.3 M, pH 7, 40 °C and 30 min, were chosen for radiolabeling the immunoconjugates.

After coupling, the immunoconjugates were purified using gel filtration and controlled using UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography). No significant trace of aggregates was detected and a single retention peak was observed for the

**Table 1** Characterization of immunoconjugates 9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA (**10**), 9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA (**11**), 9E7.4-*p*-SCN-Bn-DOTA (**12**) and 9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE2A (**13**)<sup>15</sup> after radiolabeling tests with <sup>64</sup>Cu

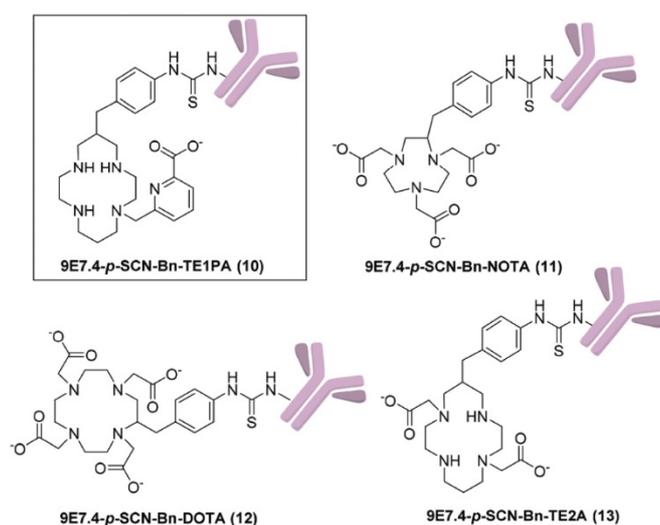
<sup>64</sup> Cu-	-10	-11	-12	-13 <sup>a</sup>
Chelates/mAb	5 ± 1	1	1	3 ± 1
Immun. (%)	84.2 ± 1.3	58.3 ± 4.5	42.3 ± 3.1	81 ± 7
Radiolab. yield (%)	98.2	95.3 ± 2.6	94.6 ± 3.4	95
Sp. act. (MBq mg <sup>-1</sup> )	108.4	<sup>b</sup>	<sup>b</sup>	188

<sup>a</sup> Data from ref. 15. <sup>b</sup> Not given (useless).

immunoconjugates (see Fig. S27–S30 in the ESI†), thus prove the absence of remaining non-grafted ligands. The results of the bioconjugation, including the number of ligands per mAb, radiolabeling yields and remaining specific activity, are reported in Table 1. Previous results obtained with the same mAb with the corresponding TE2A bifunctional derivative leading to 9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE2A (**13**) have also been added in the table for comparison (Fig. 2).

Firstly, with the usual applied methods and despite numerous attempts (see Table S1 in the ESI†), the coupling of *p*-SCN-Bn-NOTA and *p*-SCN-Bn-DOTA with 9E7.4 could not be achieved in good yields. Indeed, only 1 ligand was grafted per antibody, which is much less than that obtained under the same conditions with other antibodies.<sup>19</sup> This is probably due to interactions between the antigen binding sites and the carboxylic function in same area considering that in the case of the cyclam framework, the binding function moves the acidic moieties away from the antibody. Therefore, the specific activity after radiolabeling was too low to compare with that of other BCAs. The UPLC control after coupling showed no significant trace of antibody aggregates, dismissing this as the cause for the immunoreactivity drop (see Fig. S27–S29 in the ESI†).

In contrast, the results obtained for 9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA (**10**) show an average ligand per antibody ratio of 5, which is



**Fig. 2** The studied immunoconjugates.

pretty remarkable compared to the highest values reported in the literature and makes it essential to conduct the comparison study. Considering our previous results obtained for 9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE2A (**13**)<sup>15</sup> (Table 1), compared to those of the studied *p*-SCN-Bn-chelators, one can note that, in this series of isothiocyanate coupling ligands, only *C*-functionalized cyclam-based BCAs allow conjugation on the 9E7.4 mAb. This point highlights, in this case, an important difference between commercial the NOTA and DOTA BCAs studied here and our cyclam chelators. Additionally, compared to *p*-SCN-Bn-TE2A, this new study with *p*-SCN-Bn-TE1PA (**9**) shows a slight increase of the conjugation rate from  $3 \pm 1$  to  $5 \pm 1$  for the chelate/mAb ratio, confirming the positive effect of a decrease of the number of acetate functions. These new results also underline the importance of *C*-functionalization of the picolinate derivative for conjugation on biomolecules, when compared to our previous results.<sup>9</sup> Indeed, when the TE1PA ligand was directly conjugated on the same 9E7.4 mAb *via* its activated picolinate carboxyl group, only 0.6 chelates/mAb (see the ESI of ref. 9) were found on the biovector. The new methodology allows an enhancement of the conjugation rate by more than 8 times.

The radiolabeling yields, as well as specific activities, were determined for the three radioimmunoconjugates. For 9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA (**10**), the radiolabeling yield was close to 100% and no purification step was required. The measured specific activity of  $108.4 \text{ MBq mg}^{-1}$  is similar to standard literature values with <sup>64</sup>Cu-radiolabeled antibodies.<sup>20</sup> Additionally, compared to the specific activity of the starting <sup>64</sup>Cu solution ( $8.52 \text{ MBq nmol}^{-1}$  of total copper;  $7.38 \text{ MBq nmol}^{-1}$  of total metallic contaminant), the value obtained with the new immunoconjugate **10** is remarkable. One can finally note that compared to our previous results for 9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE2A (**13**), the radiolabeling yield obtained here was slightly higher due to the higher chelating performance of the TE1PA backbone *versus* that of TE2A.

In conclusion, the *C*-functionalization of TE1PA led to an increase in the grafting rate and radiolabeling yields and thus should give a much higher performing radiopharmaceutical for immuno-PET imaging on the condition that it retains a strong immunoreactivity.

### Immunoreactivity

We have determined the immunoreactivity of our radioimmunoconjugates, which is the fraction of the antibody still able to recognize its target after coupling, to assure that the coupling did not alter the antigen-binding site. As a reference, the immunoreactivity of the non-grafted antibody was determined using radiolabeling with <sup>125</sup>I and beads coated with the fragment of the antigen that is recognized by 9E7.4, and was determined to be  $85.6 \pm 0.8\%$ . Despite good radiolabeling, the immunoreactivities determined for the radioimmunoconjugates were  $58.3 \pm 4.5\%$  for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA (**11**), and  $42.3 \pm 3.1\%$  for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-DOTA (**12**), which are too low for *in vivo* applications. These low values, which should have been better given the low rate of conjugated che-

lates, have to be attributed again to the possible interactions between the carboxylate groups and the antibody antigen recognition site. A value of  $84.2 \pm 1.3\%$  (not significantly different from the reference) was obtained for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA (**10**), demonstrating that the capacity of the antibody to recognize its target was not affected by the high grafting rate obtained for TE1PA-BCA. Comparing to <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE2A (**13**), both measured immunoreactivities were of the same order of value despite an increase in the conjugated chelates per antibody ratio, demonstrating the efficiency of the coupling reaction with TE1PA-BCA.

More interestingly, when TE1PA was previously grafted on 9E7.4 mAb *via* its activated picolinate carboxyl group, the subsequent immunoreactivity was shown to be 60%.<sup>9</sup> Again, the *C*-functionalization of TE1PA led to an improvement of the radiopharmaceutical properties since <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA (**10**) had 1.4 times higher immunoreactivity.

### PET imaging of a multiple myeloma mouse model

The PET-CT images obtained with <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA (**10**) are presented in Fig. 3. Considering the poor results obtained with **11** and **12**, we found that it was not crucial to pursue the study by sacrificing animals due to ethical rules. Biodistribution evaluation based on the PET-CT images was unfortunately not possible due to difficulties with precisely defining smaller organs. PET imaging was performed 24 h and 48 h after injection of  $100 \mu\text{g}$  ( $10 \text{ MBq}$ ) of radiolabeled 9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA (**10**). An analysis time of 48 h was chosen to be optimal in terms of tumor-to-tissue ratio, and 24 h was chosen to have a first look at the tumor targeting at an earlier time. Mice were injected subcutaneously with 5T33 tumor cells into the posterior legs in order to facilitate the tumor growth measurement. The right and left tumors are not the same size because mice were injected with different quantities of cells in the right and left femoral area. This technique was chosen in order to take into account inter-individual variability of tumor growth and to determine the limit of the tumor size that can be detected with <sup>64</sup>Cu-PET imaging. In the presented images, the size of the smallest tumor was 1.5 mm, while largest was 4 mm (largest diameter size). The quantification scale shows that the percentage of injected dose per gram ( $\text{ID g}^{-1}$ ) of the tumor reaches 15%  $\text{ID g}^{-1}$  in the external part of the tumor with a heterogeneous distribution for the largest tumor site. This type of radioactive tumor distribution was previously described in other publications and can be explained by the characteristics of the antibody.<sup>21</sup> Indeed, it is now clearly demonstrated that macromolecules cannot easily cross physiological barriers and have difficulties penetrating within tumors. The other radioactive fixation sites change the antibody metabolism. It can be observed that the radiolabeled antibody is trapped in the liver and preferentially excreted by bowels. The tumor-to-tissue ratios were greater than 1 for all tissues except for the liver and at this time, and no fixation was observed in the bones, heart and vascular compartments, which reflects the <sup>64</sup>Cu chelate stability and inertness. The high liver fixation can be explained by the antibody meta-

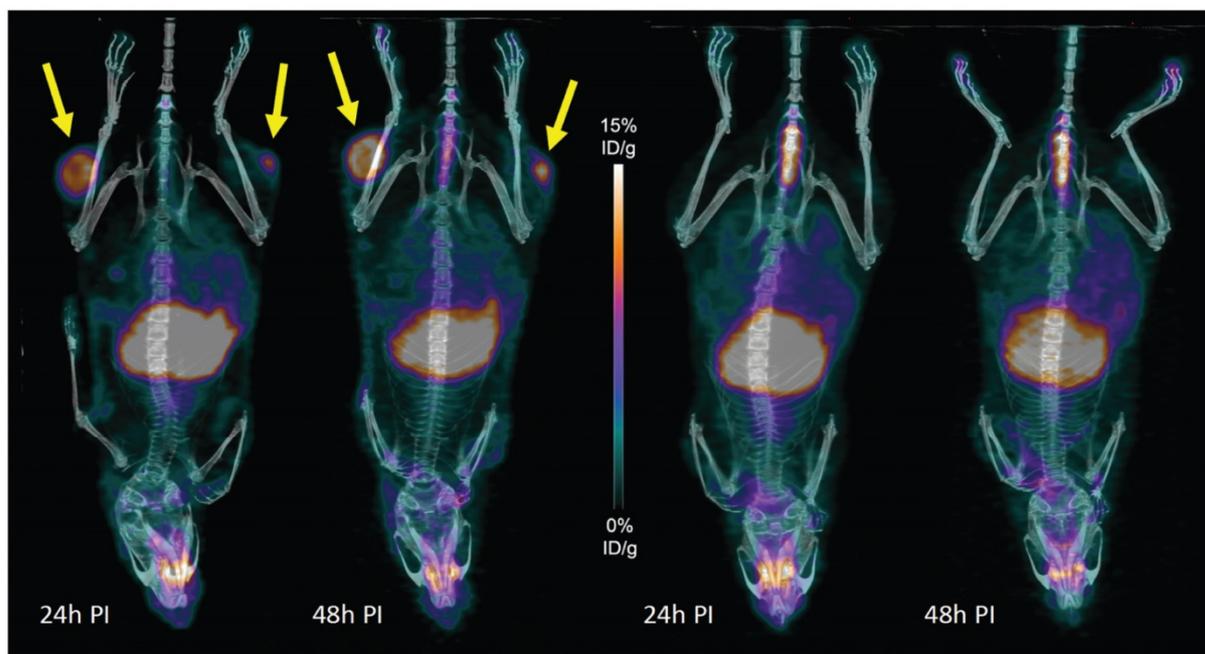


Fig. 3 PET-CT images in one axis: subcutaneous MM tumor bearing (left) and healthy (right) mice at 24 h and 48 h PI of  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA. The yellow arrows indicate tumors.

bolism and the fact that syndecan-1 was present in the liver tissue. The salivary fixation can also be explained by the presence of the target inside the salivary glands, knowing that the mice naturally licked the injection areas. Interestingly, it can be observed that liver uptake decreases more rapidly than tumour uptake between 24 h and 48 h, without a parallel increase of blood or bone fixation. This reflects that the specific uptake into the liver is probably associated with the metabolism of the radiolabeled antibody, which explains the higher radioactivity level inside the bowel at 48 h compared to 24 h.

The images of healthy mice were obtained to illustrate the metabolism of  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA. Similar to that for the myeloma model, a rapid decrease of the liver radioactivity between 24 h and 48 h was observed. The liver uptake and metabolism were thus confirmed in healthy mice, which explains the radioactive material located in the liver and all parts of the intestine with some differences observed between 24 h and 48 h, associated with faeces progression into bowel (fecal elimination). This non-usual method of radioactivity elimination could be attributed to a metabolic breaking of the linkage between the antibody and copper complex, knowing that the same distribution was previously observed with the non-coupled TE1PA complex.<sup>8,9</sup> The release of small complexes from radiolabeled antibodies through liver metabolism has already been described for  $^{111}\text{In}$  and other complexes.<sup>22</sup> In the present study, the release of the  $^{64}\text{Cu}$ -*p*-SCN-Bn-TE1PA complex and its intestinal elimination reflect the fact that the  $^{64}\text{Cu}$ -TE1PA BCA-chelate derivative is a lipophilic stable copper complex that is not affected by the intestinal medium and entero-hepatic cycle and can finally be eliminated in faeces.

These results confirm the fact that TE1PA, in its *C*-functionalized form 9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA, is a relevant chelator for  $^{64}\text{Cu}$  radiolabeling and immuno-PET imaging. One can assume that the high stability of the  $^{64}\text{Cu}$ -*p*-SCN-Bn-TE1PA complex suggests that it could be grafted to the large panel of vectors already available for preclinical and clinical trials.

## Conclusions

In view of the efficiency of TE1PA, which is a mono-picolinate cyclam for natural copper and copper-64 coordination in solution, *in vitro* and *in vivo*, we investigated a synthetic method to achieve its conjugation to biological vectors for  $^{64}\text{Cu}$ -immuno-PET imaging. Since it has been proven that the coordination structure of chelators should not be changed to avoid any decrease of the thermodynamic, kinetic and *in vivo* properties, we performed *C*-functionalization of the ligand to obtain its BCA analogue bearing an isothiocyanate coupling function. Thanks to the bisaminal chemistry, the challenging regioselective mono-*N* or tetra-*N*-protection of the *C*-appended cyclam gave two compounds of interest and high added value. Despite the loss of symmetry of the *C*-functionalized cyclam compared to the cyclam, full control of the *N*-protection and *N*-functionalization was successfully achieved from the starting compound.

The mono-*N*-protected cyclam easily gave the expected *p*-SCN-Bn-TE1PA in an overall acceptable yield. To be optimal, direct introduction of the picolinate moiety on the starting material **1** would be a real benefit.

The coupling reaction of *p*-SCN-Bn-TE1PA on a 9E7.4 antibody targeting a MM was successfully performed under usual conjugation conditions.  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA then outperformed  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-TE1PA obtained by grafting the ligand through the carboxyl function of the picolinate (grafting rate  $\times 8$  and immunoreactivity  $\times 1.4$ ). The results were even improved when comparing the grafting rate, the radiolabeling yield and the immunoreactivity with those of our previous BCA, *p*-SCN-Bn-TE2A, studied under the same conditions. More interestingly, the results are astonishingly higher than those of commercial *p*-SCN-Bn-NOTA and *p*-SCN-Bn-DOTA, the two main rivals of our new  $^{64}\text{Cu}$ -radiotracer, for which the conjugation led to very poor yields. This means that these commercial BCAs, already known for their *in vivo* instability, are not usable on all types of antibody, probably due to interactions between the antigen binding sites and carboxylic chelating functions.

The PET-CT images obtained after 24 h and 48 h unambiguously show the remarkable clearance of  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA, presenting *p*-SCN-Bn-TE1PA as a new performing agent for  $^{64}\text{Cu}$ -PET imaging.

Work is now in progress to find DOTA and NOTA BCA derivatives that are able to be successfully grafted on the 9E7.4 antibody. A complete comparative study will then be performed involving complete metabolic and biodistribution studies to confront TE1PA with its NOTA and DOTA equivalent adversaries.

From a chemical point of view, our main objective is to increase the potentiality of the synthesis to allow the insertion of other coupling functions on the *C*-appended position. Work is also in progress toward this aim.

## Experimental section

### Materials and methods

Reagents were purchased from ACROS Organics, TCI, ALDRICH Chemical Co, and EasyChelators. Compound **1** was synthesized as previously described,<sup>13,15</sup> and the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR shifts and spectra are given in the ESI.† NMR data were recorded at the “services communs” of the University of Brest.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded using Bruker Avance 500 (500 MHz) or Bruker AMX-3 300 (300 MHz) spectrometers. The  $\delta$  scales are relative to TMS ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ ). The signals are described as follows: chemical shift, multiplicity (s, singlet; br s, broad singlet; d, doublet; t, triplet; m, multiplet), coupling constants *J* in hertz (Hz), assignment:  $\text{CH}_n$ - $\alpha$ -N or  $\text{CH}_n$ - $\beta$ -N (*n* = 1 or 2) corresponding to a CH or  $\text{CH}_2$  located in the alpha or beta position of the considered nitrogen atom, respectively; the type of nuclei is indicated in italic; Ar is a generic term used in subscript for all H or C aromatic atoms; Ph is the abbreviation for a  $\text{C}_6\text{H}_5$  group;  $\text{PhNO}_2$ ,  $\text{PhNH}_2$ ,  $\text{PhNHBoc}$  and  $\text{PhNCS}$  correspond to the aromatic part of the *C*-functionalization in its different forms; *pico* is an abbreviation used for the picolinate group including the ester form; *quat* is the abbreviation used in subscript to indicate quatern-

ary C atoms. HRMS spectra were recorded at the HRMS platform of the University of Orleans, France (FR 2708 CBM-ICOA). All analytical spectra and data are given in the ESI.†

### Compound 2

Benzyl bromide (11.05 g, 7.68 mL, 64.6 mmol, 8 eq.) was added to a suspension of compound **1** (3.00 g, 8.08 mmol) in dry THF (50 mL). The mixture was heated at 55 °C for 1.5 days. After cooling to RT, the precipitate was filtrated and washed with THF (2  $\times$  5 mL). The precipitate was dried under vacuum to yield **2** as a white solid (4.27 g, 97%).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  8.07 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$   $\text{PhNO}_2$ ), 7.60 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$  Ph), 7.37 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$   $\text{PhNO}_2$ ), 7.30–6.94 (m, 3H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$  Ph), 6.20 (s, 1H, N-CH-N), 5.85 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ -Ph), 5.56 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ -Ph), 4.49 (m, 2H, N-CH-N;  $\text{CH}_2$ - $\alpha$ -N), 4.24 (m, 1H), 4.14–3.88 (m, 2H), 3.63 (dd, *J* = 13.8, 4.2 Hz, 1H), 3.45–3.33 (m, 3H), 3.08–2.97 (m, 2H), 2.79 (m, 3H), 2.69–2.49 (m, 2H), 2.42 (m, 1H), 2.22 (m, 1H), 2.09 (m, 1H), 1.73 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ - $\beta$ -N).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  171.7 (CO), 148.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$   $\text{PhNO}_2$ ), 146.5 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$   $\text{PhNO}_2$ ), 133.7 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$  Ph), 130.5 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$  Ph), 130.0 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$   $\text{PhNO}_2$ ), 129.0 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$  Ph), 126.1 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$  Ph), 123.6 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$   $\text{PhNO}_2$ ), [79.5, 65.2] [N-CH-N], [60.5, 58.5, 53.3 ( $\times 2$ ), 51.9, 48.0, 42.5] ( $\text{CH}_2$ - $\alpha$ -N), 37.7 (CH- $\beta$ -N), 35.8 ( $\times 2$ ) ( $\text{CH}_2$ - $\alpha$ -N;  $\text{CH}_2$ - $\text{PhNO}_2$ ), 19.3 ( $\text{CH}_2$ - $\beta$ -N). ESI-HRMS (positive) *m/z* calcd for  $[\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_3]^+$ , 462.2499; found 462.2499 [ $\text{M}^+$ ].

### Compound 3

Hydrazine monohydrate 65% (20 mL) was added to compound **2** (1.050 g, 1.93 mmol) and the mixture was heated to reflux overnight. Then the solution was cooled to precipitate the product, which was then filtrated. The solid was dissolved in  $\text{CHCl}_3$  and washed with distilled  $\text{H}_2\text{O}$  (3  $\times$  20 mL) to remove the excess of hydrazine. The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$  and the solvent was evaporated under reduced pressure to give compound **3** as a yellowish oil (0.712 g, 90%).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  8.36 (s, 1H, NH-CO), 7.28–7.17 (m, 5H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$  Ph), 6.84 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$   $\text{PhNH}_2$ ), 6.50 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$   $\text{PhNH}_2$ ), 3.62 (s, 2H), 3.54 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ -Ph), 3.40 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ -Ph), 3.56–3.35 (m, 2H, NH), 3.26–3.12 (m, 1H), 2.97–2.94 (m, 1H), 2.66–2.26 (m, 15H), 1.83–1.66 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ - $\beta$ -N).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  174.6 (CO), 144.7 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$   $\text{PhNH}_2$ ), 138.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$  Ph), 129.4 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$   $\text{PhNH}_2$ ), 129.3 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$  Ph), 128.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$   $\text{PhNH}_2$ ), 127.9 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$  Ph), 126.9 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$  Ph), 115.0 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$   $\text{PhNH}_2$ ), 57.4 ( $\text{CH}_2$ -Ph), [54.1, 52.6, 49.8, 48.7, 48.6, 47.8] ( $\text{CH}_2$ - $\alpha$ -N), 46.8 (CH- $\beta$ -N), [35.8, 34.6] ( $\text{CH}_2$ - $\alpha$ -N;  $\text{CH}_2$ - $\text{PhNH}_2$ ), 25.5 ( $\text{CH}_2$ - $\beta$ -N). ESI-HRMS (positive) *m/z* calcd for  $[\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}]^+$ , 410.2914; found 410.2913 [ $\text{M} + \text{H}^+$ ], calcd for  $[\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}]^+$ , 320.2444; found 320.2443 [ $\text{M} + \text{H} - \text{C}_7\text{H}_7^+$ ], calcd for  $[\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}]^{2+}$ , 205.6493; found 205.6496 [ $\text{M} + 2\text{H}^+$ ].

### Compound 4

A solution of  $\text{BH}_3$ -THF (20 mL, 1.0 M, 20 mmol) was slowly added to compound **3** (0.715 g, 1.75 mmol) under a nitrogen atmosphere. The solution was heated to reflux for 2 days. After

cooling to RT, MeOH (15 mL) was added to the reaction mixture and the solvent was evaporated under reduced pressure. HCl (20 mL, 3 M) was added to the residue and the solution was refluxed for 1 h. After cooling to RT, an extraction with CHCl<sub>3</sub> (3 × 30 mL) was performed to eliminate the organic impurities. Then the aqueous layer was saturated with NaOH pellets to adjust the pH to 14. Compound 4 was extracted with CHCl<sub>3</sub> (5 × 30 mL). The organic fractions were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure to give 4 as a colorless oil (0.594 g, 86%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ 7.40–7.15 (m, 5H, CH<sub>Ar</sub> Ph), 6.86 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, CH<sub>Ar</sub> PhNH<sub>2</sub>), 6.54 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, CH<sub>Ar</sub> PhNH<sub>2</sub>), 3.66 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-Ph), 3.40 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-Ph), 3.70–2.98 (m, 5H, NH; NH<sub>2</sub>), 2.90–2.20 (m, 18H, CH<sub>2</sub>-α-N; CH<sub>2</sub>-PhNH<sub>2</sub>), 2.10–1.80 (m, 3H, CH-β-N; CH<sub>2</sub>-β-N). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ 144.5 (C<sub>Ar</sub> PhNH<sub>2</sub>), 138.7 (C<sub>Ar</sub> Ph), 130.0 (C<sub>Ar</sub> PhNH<sub>2</sub>), 129.7 (CH<sub>Ar</sub> PhNH<sub>2</sub>), 129.3 (CH<sub>Ar</sub> Ph), 128.1 (CH<sub>Ar</sub> Ph), 127.0 (CH<sub>Ar</sub> Ph), 115.1 (CH<sub>Ar</sub> PhNH<sub>2</sub>), 57.9 (CH<sub>2</sub>-Ph), [55.4, 54.1 (×2), 53.4, 49.2, 48.8, 47.9, 47.2] (CH<sub>2</sub>-α-N), 39.7 (CH-β-N), 37.9 (CH<sub>2</sub>-PhNH<sub>2</sub>), 26.0 (CH<sub>2</sub>-β-N). ESI-HRMS (positive) *m/z* calcd for [C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>N<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 396.3121; found 396.3119 [M + H]<sup>+</sup>, calcd for [C<sub>17</sub>H<sub>32</sub>N<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 306.2652; found 306.2651 [M + H - C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup>, calcd for [C<sub>24</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>]<sup>2+</sup>, 198.6597; found 198.6601 [M + 2H]<sup>2+</sup>.

#### Compound 5

Di-*tert*-butyl dicarbonate (1.57 g, 7.80 mmol, 5 eq.) was added to a solution of compound 4 (0.570 g, 1.44 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) with triethylamine (0.973 mL, 7.20 mmol, 5 eq.). The solution was stirred for over 48 h and the reaction was monitored using HPLC-MS. Once the reaction was complete, the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified using column chromatography on aluminum oxide (CHCl<sub>3</sub>/MeOH from 100:0 to 90:10) to afford compound 5 as a yellowish oil (0.690 g, 60%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN, 70 °C) δ 7.50–7.05 (m, 9H, CH<sub>Ar</sub> PhNHBOC; CH<sub>Ar</sub> Ph), 3.72–3.21 (m, 11H), 3.22–2.86 (m, 3H), 2.80–2.19 (m, 8H), 1.87–1.17 (m, 37H, CH<sub>3</sub> Boc; CH<sub>2</sub>-β-N). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>CN, 70 °C) δ [157.4, 157.2, 156.7, 154.4] (CO Boc), [140.5, 138.7, 135.9] (C<sub>Ar</sub> Ph; C<sub>Ar</sub> PhNHBOC), 130.7 (CH<sub>Ar</sub> PhNHBOC), [130.5, 129.4, 128.2] (CH<sub>Ar</sub> Ph), 120.0 (CH<sub>Ar</sub> PhNHBOC), [80.8, 80.6, 80.4, 80.2] (C<sub>quat</sub> Boc), 61.0 (CH<sub>2</sub>-Ph), [54.1, 53.0, 52.5, 52.2, 48.7 (×2), 48.1, 47.7] (CH<sub>2</sub>-α-N), 40.4 (CH-β-N), 37.2 (CH<sub>2</sub>-PhNHBOC), 29.2 (×12) (CH<sub>3</sub> Boc), 28.5 (CH<sub>2</sub>-β-N). ESI-HRMS (positive) *m/z* calcd for [C<sub>44</sub>H<sub>70</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>]<sup>+</sup>, 796.5218; found 796.5216 [M + H]<sup>+</sup>.

#### Compound 6

Compound 5 (0.460 g, 0.578 mmol) was dissolved in EtOH (20 mL), and palladium on activated charcoal 10% (0.300 g) was added to this solution. The mixture was stirred under a hydrogen atmosphere for 4 days. The mixture was filtered through Celite® and the solvent was evaporated under reduced pressure to give compound 6 as a yellow oil (0.385 g, 95%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN, 70 °C) δ 7.02–6.82 (m, 3H, NHBOC; CH<sub>Ar</sub> PhNHBOC), 6.70 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, CH<sub>Ar</sub> PhNHBOC), 3.96

(br s, 1H, NH), 3.31–2.99 (m, 4H), 2.96–2.68 (m, 5H), 2.63–2.41 (m, 4H), 2.41–2.19 (m, 3H), 2.09–1.85 (m, 2H), 1.44–1.29 (m, 2H), 1.26–0.90 (m, 37H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>CN, 70 °C) δ [158.1, 157.3, 157.0, 154.6] (CO Boc), [138.8, 136.1] (C<sub>Ar</sub> PhNHBOC), [130.8, 120.3] (CH<sub>Ar</sub> PhNHBOC), [81.3, 80.9, 80.7, 80.6] (C<sub>quat</sub> Boc), [53.5, 51.2, 50.2, 49.9, 48.2, 46.7, 46.6 (×2)] (CH<sub>2</sub>-α-N), 40.7 (CH-β-N), 37.6 (CH<sub>2</sub>-PhNHBOC), 29.2 (×12) (CH<sub>3</sub> Boc), 28.9 (CH<sub>2</sub>-β-N). ESI-HRMS (positive) *m/z* calcd for [C<sub>37</sub>H<sub>64</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>]<sup>+</sup>, 706.4749; found 706.4748 [M + H]<sup>+</sup>.

#### Compound 7

A solution of 6-chloromethylpyridine-2-carboxylic acid methyl ester (111 mg, 0.6 mmol, 1.1 eq.) in dry CH<sub>3</sub>CN (5 mL) was added to a solution of compound 5 (385 mg, 0.55 mmol) in dry CH<sub>3</sub>CN (30 mL). K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (300 mg, 4 eq.) and NaI (90 mg, 1.1 eq.) were added and the mixture was heated to reflux for 4 days. After evaporation of the solvent under reduced pressure, the crude product was purified using column chromatography on aluminum oxide (CHCl<sub>3</sub>/MeOH from 100:0 to 95:5) to afford compound 7 as a colorless oil (183 mg, 39%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN, 70 °C) δ 7.93 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub> pico), 7.85 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub> pico), 7.59 (s, 1H, NHBOC), 7.30 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, CH<sub>Ar</sub> PhNHBOC), 7.25 (s, 1H, CH<sub>Ar</sub> pico), 7.15 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, CH<sub>Ar</sub> PhNHBOC), 3.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub> pico), 3.82 (d, *J* = 14.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> pico), 3.68 (d, *J* = 14.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> pico), 3.58–2.60 (m, 9H), 3.22–2.90 (m, 3H), 2.86–2.72 (m, 1H), 2.68–2.30 (m, 6H), 2.01 (s, 1H), 1.60–1.33 (m, 36H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>CN, 70 °C) δ 167.2 (CO pico), 161.7 (C<sub>Ar</sub> pico), [157.5, 157.4, 156.9, 154.6] (CO Boc), 149.15 (C<sub>Ar</sub> pico), 138.7 (CH<sub>Ar</sub> pico), 136.2 (×2) (C<sub>Ar</sub> PhNHBOC), 130.8 (CH<sub>Ar</sub> PhNHBOC), [127.96, 124.62] (CH<sub>Ar</sub> pico), 120.3 (CH<sub>Ar</sub> PhNHBOC), [80.9, 80.7, 80.5, 80.4] (C<sub>quat</sub> Boc), 62.6 (CH<sub>2</sub> pico), [54.8, 53.6] (CH<sub>2</sub>-α-N), 53.3 (CH<sub>3</sub> pico), [52.7, 52.4, 48.7 (×2), 48.2, 47.7] (CH<sub>2</sub>-α-N), 40.5 (CH-β-N), 37.4 (CH<sub>2</sub>-PhNHBOC), 29.1 (×12) (CH<sub>3</sub> Boc), 28.7 (CH<sub>2</sub>-β-N). ESI-HRMS (positive) *m/z* calcd for [C<sub>45</sub>H<sub>71</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>]<sup>+</sup>, 855.5226; found 855.5226 [M + H]<sup>+</sup>.

#### Compound 8: *p*-NH<sub>2</sub>-Bn-TE1PA

Compound 7 (183 mg, 0.214 mmol) was dissolved in hydrochloric acid (3 M, 15 mL) and the solution was refluxed for 18 h. The water and excess of hydrochloric acid were evaporated under reduced pressure. The crude product was purified using reverse phase C18 HPLC (H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN from 0 to 80% CH<sub>3</sub>CN) to give compound 8 as a colorless oil (41 mg, 35%) in its hydrochloride salt. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O, 25 °C) δ 8.07 (m, 2H, CH<sub>Ar</sub> pico), 7.81–7.68 (t, 1H, CH<sub>Ar</sub> pico), 7.33 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, CH<sub>Ar</sub> PhNH<sub>2</sub>), 7.24 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, CH<sub>Ar</sub> PhNH<sub>2</sub>), 4.47 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> pico), 4.35 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> pico), 3.66–3.00 (m, 17H), 2.90 (m, 2H), 2.79 (m, 1H), 2.26–2.06 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-β-N). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O, 25 °C) δ 168.8 (CO), [154.1, 148.4] (C<sub>Ar</sub> pico), 144.7 (CH pico), 140.4 (C<sub>Ar</sub> PhNH<sub>2</sub>), 133.7 (CH<sub>Ar</sub> PhNH<sub>2</sub>), 131.50 (C<sub>Ar</sub> PhNH<sub>2</sub>), [131.45, 128.7] (CH<sub>Ar</sub> pico), 126.3 (CH<sub>Ar</sub> PhNH<sub>2</sub>), 60.3 (CH<sub>2</sub> pico), [52.9, 50.8, 49.8, 49.3, 45.5, 44.0, 43.9, 42.8] (CH<sub>2</sub>-α-N), 37.8 (CH<sub>2</sub>-PhNH<sub>2</sub>), 35.3 (CH-β-N), 22.5 (CH<sub>2</sub>-β-N). ESI-HRMS (positive) *m/z* calcd for [C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 441.2972; found 441.2972

$[M + H]^+$ , calcd for  $[C_{24}H_{38}N_6O_2]^+$ , 221.1522; found 221.1523  
 $[M + 2H]^{2+}$ .

### Compound 9: *p*-SCN-Bn-TE1PA

Compound 8 (27 mg, 0.049 mmol) was dissolved in hydrochloric acid (1 mL, 3 M) and then this reacted with a solution of thiophosgene (76  $\mu$ L, 0.987 mmol, 20 eq.) in 1 mL of chloroform. The reaction mixture was vigorously stirred overnight at RT. The excess of thiophosgene was removed and the aqueous phase was washed with chloroform (3  $\times$  1 mL). The aqueous phase was lyophilized to give compound 9 as a white powder (19 mg, 65%) in its hydrochloride salt (estimation  $x = 3$ ).  $^1H$  NMR (500 MHz,  $D_2O$ , 25  $^\circ C$ )  $\delta$  8.14 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H,  $CH_{Ar}$  pico), 8.01 (t,  $J = 7.1$  Hz, 1H  $CH_{Ar}$  pico), 7.61 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H,  $CH_{Ar}$  pico), 7.27 (s, 4H,  $CH_{Ar}$  PhNCS), 4.08 (d,  $J = 14.6$  Hz, 1H,  $CH_2$  pico), 3.71 (d,  $J = 14.6$  Hz, 1H,  $CH_2$  pico), 3.42–2.88 (m, 12H,  $CH_2$ - $\alpha$ -N), 2.87–2.55 (m, 6H;  $CH_2$ - $\alpha$ -N;  $CH_2$ -PhNCS), 2.28 (s, 1H), 2.12 (s, 1H), 2.04 (s, 1H).  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $D_2O$ , 25  $^\circ C$ )  $\delta$  170.7 (CO), [160.4, 150.5] ( $C_{Ar}$  pico), 142.3 ( $CH_{Ar}$  pico), 140.7 ( $C_{Ar}$  Ph), 136.5 ( $C_{Ar}$  NCS), 133.0 ( $CH_{Ar}$  PhNCS), 131.9 ( $C_{Ar}$  Ph), 131.0 ( $CH_{Ar}$  pico), 128.7 ( $CH_{Ar}$  PhNCS), 128.0 ( $CH_{Ar}$  pico), 59.6 ( $CH_2$  pico), [56.5, 56.2, 55.2, 54.6, 48.4, 48.2, 47.6, 45.8] ( $CH_2$ - $\alpha$ -N), 39.0 ( $CH$ - $\beta$ -N), 38.6 ( $CH_2$ -PhNCS), 25.0 ( $CH_2$ - $\beta$ -N). ESI-HRMS (positive)  $m/z$  calcd for  $[C_{25}H_{35}N_6O_2S]^+$ , 483.2536; found 483.2528  $[M + H]^+$ , calcd for  $[C_{25}H_{36}N_6O_2S]^+$ , 242.1304; found 242.1305  $[M + 2H]^{2+}$ .

### Conjugation on the 9E7.4 antibody

**Materials.** Sodium acetate hydrate, sodium citrate and sodium hydrogen carbonate were TraceSelect® grade and purchased from Fluka Analytics. EDTA (ethylene diaminetetraacetic acid) and BSA (bovine serum albumin) were purchased from Sigma. Hydrochloric acid (trace select) was purchased from Aldrich. The water used was produced using a Gradient Milli-Q® system from Millipore, with an 18.2 M $\Omega$  cm resistivity.

The 9E7.4 antibody is a rat IgG2 $\kappa$  targeting CD-138 antigen also named syndecan-1, which is overexpressed in MM cells. Its production was carried out in-house using a hybridoma obtained from rats immunization with a murine CD-138-like peptide.

*p*-Bn-SCN-DOTA and *p*-Bn-SCN-NOTA were purchased from Macrocylics.

Copper-64 dichloride in 0.1 M hydrochloric acid was obtained from ARRONAX cyclotron (Saint-Herblain, France) with funding from IRON Labex. The radionuclidic purity was determined using gamma spectrometry using a DSPEC-JR-2.0 type 98-24B HPGE detector (Ametek) and the chemical purity was measured using ICP-OES using an iCAP 6500 DUO (Thermo Fisher Scientific).

For the antibody control, an UPLC Acquity® system with a Protein BEH SEC column (Waters) was used. The elution was carried out with phosphate buffer 0.1 M (pH 7.2), with a 0.4 mL min $^{-1}$  flow rate for 10 min, and the detection was performed using UV at  $\lambda = 280$  nm. The software Empower pro 1154 was used for the analysis.

### Conditioning of the mAb

The 9E7.4 mAb was stored in PBS (phosphate buffer saline: phosphate buffer 0.01 M, pH = 7.2; sodium chloride 0.15 M) at 4  $^\circ C$ . 10% (vol/vol) EDTA 10 mM pH 4.5 solution was added to the antibody solution in order to obtain a final EDTA concentration of 1 mM. The mixture was stirred at room temperature for 2 h and then the EDTA metal complexes were removed by 3 ultrafiltrations in carbonate buffer 0.3 M pH 8.6 (trace select) at 2000g (centrifuge 2-16PK, Sigma) using a disposable Amicon Ultra-15® 30K membrane (Millipore). Then, the 9E7.4 solution concentration was adjusted to 2–4 mg mL $^{-1}$  with 0.3 M sodium carbonate buffer (pH 8.6). The exact volume of the solution was determined by weighing and the concentration was measured by UV-visible spectrophotometry using a NanoDrop® 1000 (Thermo Fisher Scientific). The purity of the antibody was also tested using the UPLC system, leading to a single peak with a retention time  $t = 2.94$  min.

### Conjugation (mAb-BCA coupling)

*p*-SCN-Bn-NOTA, *p*-SCN-Bn-DOTA and *p*-SCN-Bn-TE1PA were dissolved in 0.1 M HCl. To 2.52, 4.91 and 4.22 mg of the 9E7.4 antibody (corresponding to 16.8, 32.7 and 28.1 nmol) in carbonate buffer pH 8.5, 336, 654 and 562 nmol of *p*-SCN-Bn-NOTA, *p*-SCN-Bn-DOTA and *p*-SCN-Bn-TE1PA (molar ratio BCA-antibody: 20) were added, respectively. The solutions were then stirred at room temperature overnight.

### Purification of the immunoconjugates

The excess of ligand was removed by gel filtration using a PD-10 column (GE Healthcare) eluted with 500  $\mu$ L fractions of sodium acetate 0.1 M. Under these conditions, the conjugated antibodies were eluted with a retention volume between 2.5 and 4 mL, while the uncoupled ligands, for which the molecular weights are below 10 kDa, were eluted with a retention volume of 5 to 7.5 mL. Fractions containing the conjugated mAb were pooled and concentrated at around 1 mL by ultrafiltration. The exact volume was determined by weighing and the concentration by UV-visible spectrophotometry. The final concentrations were 2.33 mg mL $^{-1}$  (2.29 mg, 986  $\mu$ L, 15.3 nmol) for *p*-SCN-Bn-NOTA, 2.04 mg mL $^{-1}$  (3.26 mg, 1595  $\mu$ L, 21.7 nmol) for *p*-SCN-Bn-DOTA and 3.61 mg mL $^{-1}$  (3.35 mg, 929  $\mu$ L, 22.3 nmol) for 9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA. The conjugated antibodies were controlled with the UPLC system, to verify the absence of antibody aggregates and non-conjugated ligands. A single peak was observed, with retention times  $t = 2.92$  min, 2.81 min and 2.89 min for *p*-SCN-Bn-NOTA, *p*-SCN-Bn-DOTA and *p*-SCN-Bn-TE1PA, respectively. The aggregates percentages were lower than 3% for all the immunoconjugates.

### Characterization of the immunoconjugates

**Determination of chelate number per antibody.**  $^{64}CuCl_2$  in HCl 0.1 N was added in 3 different copper-to-immunoconjugate ratios (1, 3 and 5 molar equivalents) into acetate 0.1 M pH 5–6 buffered antibody solutions. The reaction mixture was incubated at 40  $^\circ C$  for 30 min. Then, the radiolabeling reaction

was quenched through adding a calculated volume of 1 mM EDTA pH 6 (corresponding to a EDTA/antibody molar ratio of 10) and stirred at room temperature for 10 min. 2  $\mu$ L of this solution was taken out and deposited on an ITLC-SG plate (Agilent Technologies). The thin layer chromatography was developed for 10 cm using 0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.5). The plate was then removed from the solvent and exposed for 5 min on a storage phosphor plate, and this was revealed using a radiometric phosphor imager Cyclone® Plus (PerkinElmer) and analyzed with the Optiquant® software to obtain a radiochromatogram. Under these conditions, the radioimmunoconjugate stays at the bottom (Rf. 0) while the  $^{64}\text{Cu}$ -EDTA migrates to the top of the plate (Rf. 1). The chelate per antibody number was evaluated using the following formula: chelate per antibody number = number of copper equivalents per antibody  $\times$  ratio (radioactivity at Rf 0 to total radioactivity at the chromatography plate). For example, a 1 ligand per antibody ratio is interpreted as a 100% radiolabeling yield with 1 equiv. of copper, a 33% radiolabeling yield with 3 equiv. of copper, and a 20% radiolabeling yield with 5 equiv. of copper. The formula is then:  $3 \times 0.33 = 1$  chelate per antibody. No purification step was required for the  $^{64}\text{Cu}$  radioimmunoconjugate complexes, with the radiolabeling being close to quantitative.

#### Immunoreactivity of the radiolabeled antibody

NHS-activated magnetic beads (Thermo Fisher Scientific) were previously conjugated with a customized CD-138-like peptide produced by Genecust, using the protocol given by Thermo Fisher Scientific.<sup>23</sup> The final concentration of the conjugated beads was 10 mg mL<sup>-1</sup> in PBS. To test the immunoreactivity of the copper-64 radiolabeled antibody, 20  $\mu$ L of the coated beads solution (0.2 mg) was added to 1 pmol of purified radioimmunoconjugates. A solution of 0.1% BSA in PBS was then added, up to a final volume of 150  $\mu$ L. This mixture was incubated at 37 °C for 2 h. Supernatants containing non-reactive antibodies and magnetic beads were collected separately, using a magnetic rack (MagRack®, GE Healthcare). The radioactivity in each fraction was assessed using a Wallac 1480-Wizard® gamma counter (PerkinElmer). The immunoreactivity was determined through calculating the percentage of the number of CPM (counts per minute) of the beads compared to the total activity (beads and supernatant).

#### Mouse microPET imaging

The 5T33-CD138 + murine multiple myeloma cell line was kindly provided by Dr H. Turner (Nuclear medicine Service, Fremantle Hospital, Western Australia) with the permission of Dr J. Radl (TNO Institute, Leiden, Netherlands).

C57BL/KaLwRij mice were purchased from Envigo and housed under conventional conditions at the Experimental Therapeutic Unit animal facility (SFR François Bonamy, IRS-UN, University of Nantes). Experiments were approved by the local veterinary committee.<sup>24</sup> Mice were 10 to 23 weeks and received a subcutaneous graft of 1 to 2 million 5T33 cells into the femoral area, 10 days prior to the biodistribution studies.

This allowed the development of subcutaneous tumors on the mice. When the tumor sizes reached 2 to 5 mm in diameter, the mice were used for microPET imaging. Mice were isoflurane anesthetized 10 min before they were imaged at 24 h and 48 h using a Siemens microPET gamma camera.<sup>25</sup> Fusion computed images were obtained using Inveon Research Workplace (Siemens Healthcare)<sup>26</sup> software.

## Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

## Acknowledgements

R. T. and N. L. B. acknowledge the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Centre National de la Recherche Scientifique and in particular "La ligue contre le Cancer" for the PhD fellowship of T. L. B. and the CSIRGO program 2016–17 (Nouveaux radiopharmaceutiques à base de  $^{64}\text{Cu}$  pour l'imagerie TEP). R. T. also thanks the "Service Commun" NMR facilities of the University of Brest.

We acknowledge the "Institut National de la Santé et de la Recherche". We also thank the LABEX IRON (ANR-LABX-0018-01) and Equipex ArronaxPlus (ANR-11-EQPX-0004) operated by the French National Research Agency (ANR) within the program "Investissements d'Avenir". We also thank the "Plateau Technique de Radioactivité" and the animal housing of the "IRS-UN".

## Notes and references

- (a) M. Shokeen and C. J. Anderson, *Acc. Chem. Res.*, 2009, **42**, 832–841; (b) J. V. Frangioni, *J. Clin. Oncol.*, 2008, **26**, 4012–4021.
- (a) C. Marcus, E. Mena and R. M. Subramaniam, *Brain, Clin. Nucl. Med.*, 2014, **39**(10), e413–e426; (b) E. Lopci, I. Grassi, A. Chiti, C. Nanni, G. Cioria, L. Toschi, C. Fonti, F. Lodi, S. Mattioli and S. Fanti, *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2014, **4**(4), 365–384.
- (a) N. R. Evans, J. M. Tarkin, M. M. Chowdhury, E. A. Warburton and J. H. F. Rud, *Curr. Atheroscler. Rep.*, 2016, **18**, 30; (b) J. Kim, J. E. Park, M. Nahrendorf and D. E. Kim, *Direct, J. Stroke*, 2016, **18**(3), 286–296.
- (a) G. Cheng and H. Huang, *PET Clin.*, 2018, **1**, 59–72; (b) C. Bailly, R. Leforestier, B. Jamet, T. Carlier, M. Bourgeois, F. Guérard, C. Touzeau, P. Moreau, M. Chérel, F. Kraeber-Bodéré and C. Bodet-Milin, *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, **18**(2), e445; (c) S. Avril, R. F. Muzic Jr., D. Plecha, B. J. Traughbe, S. Vinayak and N. Avril, *J. Nucl. Med.*, 2016, **57**(suppl 1), 34S–39S; (d) H. J. Adams and T. C. Kwee, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2016, **106**, 55–63.
- (a) E. Caserta, J. Chea, M. Minnix, D. Viola, S. Vonderfecht, P. Yazaki, D. Crow, J. Khalife, J. F. Sanchez, J. M. Palmer, S. Hui, N. Carlesso, J. Keats, Y. Kim, R. Buettner,

- G. Marcucci, S. Rosen, J. Shively, D. Colcher, A. Krishnan and F. Pichiorri, *Blood*, 2018, **131**(7), 741–745; (b) A. Pfeifer, U. Knigge, J. Mortensen, P. Oturai, A. K. Berthelsen, A. Loft, T. Binderup, P. Rasmussen, D. Elema, T. L. Klausen, S. Holm, E. von Benzon, L. Højgaard and A. Kjaer, *J. Nucl. Med.*, 2012, **53**, 1207–1215; (c) C. B. Johnbeck, U. Knigge, A. Loft, A. K. Berthelsen, J. Mortensen, P. Oturai, S. W. Langer, D. R. Elema and A. Kjaer, *J. Nucl. Med.*, 2017, **58**, 451–457; (d) C. Malmberg, R. S. Ripa, C. B. Johnbeck, U. Knigge, S. W. Langer, J. Mortensen, P. Oturai, A. Loft, A. M. Hag and A. Kjær, *J. Nucl. Med.*, 2015, **56**, 1895–1900.
- 6 M. S. Cooper, M. T. Ma, K. Sunassee, K. P. Shaw, J. D. Williams, R. L. Paul, P. S. Donnelly and P. J. Blower, *Bioconjugate Chem.*, 2012, **23**(5), 1029–1039.
- 7 (a) L. M. P. Lima, D. Esteban-Gómez, R. Delgado, C. Platas-Iglesias and R. Tripier, *Inorg. Chem.*, 2012, **51**, 6916–6927; (b) L. M. P. Lima, Z. Halime, R. Marion, N. Camus, R. Delgado, C. Platas-Iglesias and R. Tripier, *Inorg. Chem.*, 2014, **53**, 5269–5279.
- 8 (a) M. Frindel, N. Camus, A. Rauscher, M. Bourgeois, F. Haddad, J. F. Gestin, R. Tripier and A. Faivre-Chauvet, *Nucl. Med. Biol.*, 2014, **41**, e49–e57; (b) T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman and C. J. Anderson, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 2858–2902; (c) E. W. Price and C. Orvig, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **43**, 260–290.
- 9 (a) M. Frindel, P. L. Saëc, M. Beyler, A.-S. Navarro, C. Saï-Maurel, C. Alliot, M. Chérel, J.-F. Gestin, A. Faivre-Chauvet and R. Tripier, *RSC Adv.*, 2017, **7**, 9272–9283. M. Frindel, *PhD*, 2015, University of Nantes.
- 10 (a) T. M. Jones-Wilson, K. A. Deal, C. J. Anderson, D. W. McCarthy, Z. Kovacs, R. J. Motekaitis, A. D. Sherry, A. E. Martell and M. J. Welch, *Nucl. Med. Biol.*, 1998, **25**, 523–530; (b) B. E. Rogers, C. J. Anderson, J. M. Connett, L. W. Guo, W. B. Edwards, E. L. C. Sherman, K. R. Zinn and M. J. Welch, *Bioconjugate Chem.*, 1996, **7**, 511–522; (c) J. L. J. Dearling, S. D. Voss, P. Dunning, E. Snay, F. Fahey, S. V. Smith, J. S. Huston, C. F. Meares, S. T. Treves and A. B. Packard, *Nucl. Med. Biol.*, 2011, **38**, 29–38.
- 11 E. A. Lewis, C. C. Allan, E. W. Boyle and S. J. Archibald, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 3059–3062.
- 12 (a) F. Kou, S. Zhu, H. Lin, W. Chen, Y. Chen and M. Lin, *Polyhedron*, 1997, **16**, 2021–2028; (b) P. V. Bernhardt, K. A. Byriel, C. H. L. Kennard and P. C. Sharpe, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 2045–2052; (c) T. Benabdallah and R. Guglielmetti, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1988, **5**, 821–827.
- 13 (a) R. Tripier and N. Camus, *World Patent*, WO 2013072491A1, 2013; (b) N. Camus, Z. Halime, N. Le Bris, H. Bernard, C. Platas-Iglesias and R. Tripier, *J. Org. Chem.*, 2014, **79**, 1885–1899.
- 14 N. Camus, N. Le Bris, S. Nuryyeva, M. Chessé, D. Esteban-Gómez, C. Platas-Iglesias, R. Tripier and M. Elhabiri, *Dalton Trans.*, 2017, **46**, 11479–11490.
- 15 (a) Z. Halime, M. Frindel, N. Camus, P.-Y. Orain, M. Lacombe, M. Chérel, J.-F. Gestin, A. Faivre-Chauvet and R. Tripier, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 11302–11314; (b) C. Bailly, S. Gouard, M. Lacombe, P. Remaud-Le Saëc, B. Chalopin, M. Bourgeois, N. Chouin, R. Tripier, Z. Halime, F. Haddad, A. Faivre-Chauvet, F. Kraeber-Bodéré, M. Chérel and C. Bodet-Milin, *Oncotarget*, 2018, **9**, 9061–9072.
- 16 L. Yonkyu Kwon, D. A. Scollard and R. Reilly, *Mol. Pharm.*, 2017, **14**(2), 492–501.
- 17 N. Fichou, S. Gouard, C. Maurel, J. Barbet, L. Ferrer, A. Morgenstern, F. Bruchertseifer, A. Faivre-Chauvet, E. Bigot-Corbel, D. Davodeau, J. Gaschet and M. Chérel, *Front. Med.*, 2015, **2**, 76.
- 18 (a) M. R. Lewis, C. A. Boswell, R. Laforest, T. L. Buettner, D. Ye, J. M. Connett and C. J. Anderson, *Cancer Biother. Radiopharm.*, 2001, **16**, 483–494; (b) H. Sun, C. G. England, R. Hernandez, S. A. Graves, R. L. Majewski, A. Kamkaew, D. Jiang, T. E. Barnhart, Y. Yang and W. Cai, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2016, **43**, 2169–2179; (c) L. Li, J. Bading, P. J. Yazaki, A. H. Ahuja, D. Crow, D. Colcher, L. E. Williams, J. Y. C. Wong, A. Raubitschek and J. E. Shively, *Bioconjugate Chem.*, 2008, **19**, 89–96; S. Hermanto, R. Dini Haryuni, M. Ramli, A. Mutalib and S. Hudiyono, *J. Radiat. Res. Appl. Sci.*, 2016, **9**, 441–448.
- 19 (a) S. Hermanto, R. Dini Haryuni, M. Ramli, A. Mutalib and S. Hudiyono, *J. Radiat. Res. Appl. Sci.*, 2016, **9**, 441–448; (b) W. Wojdowska, U. Karczmarczyk, M. Maurin, P. Garnuszek and R. Mikolajczak, *Curr. Radiopharm.*, 2015, **8**(1), 62–68.
- 20 (a) Z. Miao, G. Ren, H. Liu, L. Jiang and Z. Cheng, *Bioconjugate Chem.*, 2010, **21**(5), 947–954; (b) F. C. Maier, J. Schmitt, A. Maurer, W. Ehrlichmann, G. Reischl, K. Nikolaou, R. Handgretinger, B. J. Pichler and W. M. Thaiss, *Oncotarget*, 2016, **7**(41), 67403–67411.
- 21 (a) K. Vanderkerken, H. De Raeve, E. Goes, S. Van Meirvenne, J. Radl, I. Van Riet, K. Thielemans and B. Van Camp, *Br. J. Cancer*, 1997, **76**(4), 451–460; (b) J. Radl, J. W. Croese, C. Zurcher, M. H. Van den Enden-Vieeven and A. M. de Leeuw, *Am. J. Pathol.*, 1988, **132**, 593–597; (c) I. R. Garrett, S. Dallas, J. Radl and G. R. Mundy, *Bone*, 1997, **20**, 515–520.
- 22 J. M. Jeong, K. Garmestani, T. Saga, L. Camera, M. W. Brechbiel, O. A. Gansow, J. A. Carrasquillo, R. D. Neumann and C. H. Paik, *J. Nucl. Med.*, 1994, **35**(11), 1851–1857.
- 23 [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011758\\_Pierce\\_NHSActiv\\_Mag\\_Bead\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011758_Pierce_NHSActiv_Mag_Bead_UG.pdf).
- 24 SFR François Bonamy, IRS-UN, University of Nantes, license number: C44278/imaging reference: 00143.
- 25 (a) M. Yagi, L. Arentsen, R. M. Shanley and S. K. Huia, *Phys. Med.*, 2014, **30**(7), 849–853; (b) C. Constantinescu and J. Mukherjee, *Phys. Med. Biol.*, 2009, **54**(9), 2885–2899.
- 26 A. Van Der Gucht, O. Zehou, S. Djelbani-Ahmed, L. Valeyrie-Allanore, N. Ortonne, P. Brugières, P. Wolkenstein, A. Luciani, A. Rahmouni, E. Sbidian and E. Itti, *PLoS One*, 2016, **11**(3), e0151809.

# TE1PA as Innovating Chelator for $^{64}\text{Cu}$ Immuno-TEP Imaging: A Comparative in Vivo Study with DOTA/NOTA by Conjugation on 9E7.4 mAb in a Syngeneic Multiple Myeloma Model

Anne-Sophie Navarro,<sup>†,§</sup> Thomas Le Bihan,<sup>‡</sup> Patricia Le Saëc,<sup>†</sup> Nathalie Le Bris,<sup>‡</sup> Clément Bailly,<sup>†,§</sup> Catherine Saï-Maurel,<sup>†,§</sup> Mickaël Bourgeois,<sup>†,§,||</sup> Michel Chérel,<sup>†,||,⊥</sup> Raphaël Tripier,<sup>\*,†,§</sup> and Alain Faivre-Chauvet<sup>\*,†,§</sup>

<sup>†</sup>CRCINA, INSERM 1232-CNRS ERL 6001, University of Angers, University of Nantes, 8 quai Moncoussu, 44007 Nantes, France

<sup>§</sup>University Hospital, 44000 Nantes, France

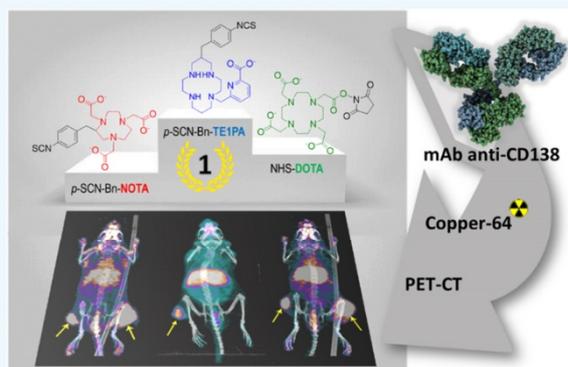
<sup>‡</sup>Univ Brest, UMR-CNRS CEMCA 6521, 6 avenue Le Gorgeu, 29200 Brest, France

<sup>||</sup>Cyclotron ARRONAX, 1 rue ARONNAX, CS 10112, 44817 Saint-Herblain, France

<sup>⊥</sup>Nuclear Medicine, ICO Cancer Center, Boulevard Jacques Monod, 44805 Saint-Herblain, France

## Supporting Information

**ABSTRACT:** Following the successful synthesis of a C-functionalized version of the TE1PA ligand, a monopicolinate cyclam, we looked to demonstrate its in vivo properties versus DOTA and NOTA, after conjugation on the 9E7.4 rat antibody, an IgG<sub>2a</sub> against CD138 murine, which has relevant properties for multiple myeloma targeting. For each ligand, different conjugation approaches had been considered to select the most appropriate for the comparative study. The *p*-SCN-Bn-TE1PA, NHS-DOTA, and *p*-SCN-Bn-NOTA were finally chosen for conjugation and radiolabeling tests. For in vivo comparison, we used a model of subcutaneous grafted mice with 5T33 tumor cells. In vitro tests and immuno-PET study highlighted  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA as the least attractive. Further competitive biodistribution and hepatic metabolic studies at 2, 24, and 48 h post-injection (100  $\mu\text{g}$  radiolabeled with 10 MBq of  $^{64}\text{Cu}$ ) were then performed with the  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA and  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA. Results show a better in vivo resistance of  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA to transchelation compared to  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA, especially at later times. This was confirmed with  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA at 48 h PI.  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA also demonstrated an excellent hepatic clearance.  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA displayed an overall superiority compared to  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA and  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA in terms of in vivo stability, reinforcing the usefulness of the *p*-SCN-Bn-TE1PA ligand for  $^{64}\text{Cu}$  immuno-PET imaging.



## INTRODUCTION

Positron emission tomography (PET) imaging currently holds a central place in diagnosis and follow-up of cancer as well as other diseases in cardiology or neurology.<sup>1–3</sup> While fluorine-18 is the most commonly used radionuclide for PET, in its  $^{18}\text{F}$ -FDG (2-deoxy-2-( $^{18}\text{F}$ )fluoro-D-glucose) form, it has several limitations including its radioactive half-life ( $t_{1/2} = 110$  min), which is not optimal for whole antibodies with a biological half-life longer than a day.<sup>4</sup> Other attractive  $\beta^+$  emitter radionuclides are under investigation for immuno-PET, especially radiometals such as zirconium-89 ( $t_{1/2} = 78.4$  h)<sup>5</sup> or copper-64 ( $t_{1/2} = 12.7$  h).<sup>6</sup> Among those, copper is one of the most promising radionuclides for the theranostic approach due to its cyclotron availability and physical properties including  $\beta^-$  and  $\beta^+$  emissions (Table 1).

To allow the use of  $^{64}\text{Cu}$  for targeted imaging, a bifunctional chelating agent (BCA) is required: first to stabilize the

radiometal by chelation, and second the covalently link the radionuclide complex to a vector (peptide or antibody). Chelating agents for  $^{64}\text{Cu}$  must lead to thermodynamically stable and kinetically inert complexes in order to prevent transchelation to the metalloproteins involved in Cu(II) blood transportation or Cu(I) cell metabolism. This indeed can cause nonspecific irradiation and lower the image quality by increasing the background noise.

Several ligands are currently under investigation, but none of them are suitable to consider in clinical use yet. Up to now, DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) has been the only copper chelator used in human clinical trials for immuno-PET imaging with  $^{64}\text{Cu}$ ,<sup>7–10</sup> mainly through bifunctionalized forms like *p*-SCN-Bn-DOTA (iso-

Received: July 25, 2019

Published: August 6, 2019

Table 1. Characteristics of the Most Commonly Used  $\beta^+$  Emitters

	Period	$E_{\beta^+_{max}}$ (keV)	$\% \beta^+$	Advantages	Inconveniences
$^{18}\text{F}$	1.83 h	634	97%	Low $\beta^+$ energy High availability  Low cost	Multistep radiolabeling Low radiolabeling yield with macromolecules Low period compared to mAb blood half-life
$^{68}\text{Ga}$	1.13 h	1899	88%	Available with generator	Insoluble hydroxide formation at pH > 4 Low period compared to mAb blood half-life
$^{124}\text{I}$	100.3 h	1532 2135	11% 11%	High radiolabeling yield with macromolecules Direct labeling Long period	High risk in radiation safety Low availability High $\beta$ energy High % emission and energy of associated $\gamma$ rays
$^{89}\text{Zr}$	78.4 h	909	23%	Long period High radiolabeling yield with macromolecules  GMP available	High associated $\gamma$ emissions Only one bifunctional chelating agent available Transchelation in vivo
$^{64}\text{Cu}$	12.7 h	653	18%	Low $\beta^+$ energy High radiolabeling yield macromolecules Period adapted to mAb half-life Low production cost Complexation with azamacrocycles 37% associated $\beta^-$ emission for theranostic applications Less than 1% of high energy $\gamma$ emissions	Nonradioactive metallic contamination Transchelation in vivo Low availability Nonradioactive metallic contamination

thiocyanate activated form) and NHS-DOTA (activated monoester form) (Figure 1).

In our objective to develop better performing copper chelators than DOTA, azamacrocyclic ligands with picolinate functionality were investigated.<sup>11</sup> Among them, TE1PA (Figure 1), a monopicolinate cyclam, was proven to have interesting properties with fast kinetics, high thermodynamic stability, Cu(II) selectivity, and inertness even in the Cu(I) state, especially compared to other azamacrocycles used for copper chelation, such as DOTA or NOTA (1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid; see Figure 1).<sup>12</sup> The usefulness of  $^{64}\text{Cu}$ -TE1PA in an in vivo animal model has already been demonstrated.<sup>13</sup> Following those results, we recently synthesized a new C-functionalized derivative of TE1PA: the *p*-SCN-Bn-TE1PA.<sup>14</sup> This compound, functionalized in a similar design as the commercially available BCA *p*-SCN-Bn-DOTA or *p*-SCN-Bn-NOTA (Figure 1), was synthesized in order to improve the conjugation efficiency between the chelator and the antibody, as well as the stability of the radiolabeling, since the direct activation of the ligand via its carboxylate function (SNHS-TE1PA, Figure 1) led to disappointing results regarding the chelate-to-antibody conjugation ratio.<sup>13</sup>

In previous works, we investigated an in vivo syngeneic myeloma tumor model and a fully characterized rat IgG<sub>2a</sub> antibody, the 9E7.4, targeting murine CD138.<sup>15,16</sup> With the 9E7.4 antibody, we were able to increase the hepatic metabolism of *p*-SCN-Bn-TE1PA by avoiding the antibody blood recycling via FcRn-specific receptors. Indeed, copper is naturally complexed in the organism by cuproproteins, particularly in the liver. Those proteins are in competition with ligands for the complexation of copper and can switch  $^{64}\text{Cu}$  within the radioimmunoconjugates through transchelation.<sup>17</sup>

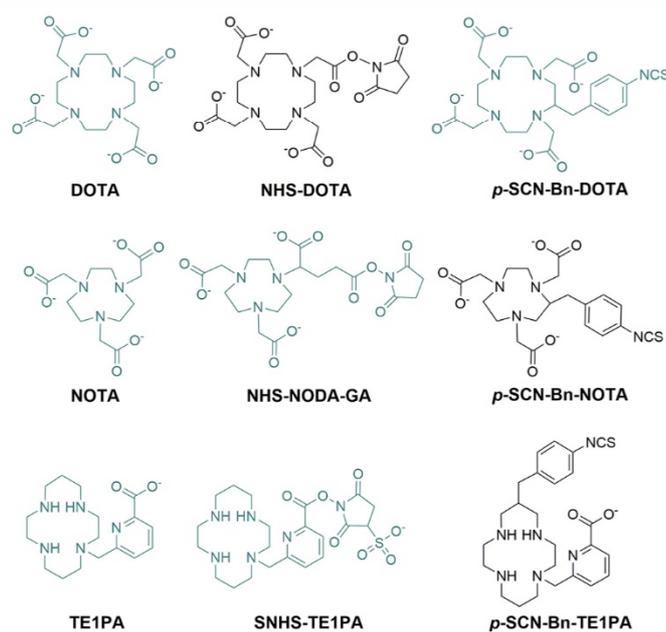


Figure 1. Representation of DOTA, NOTA, TE1PA, and bifunctional derivatives NHS-DOTA, *p*-SCN-Bn-DOTA, NHS-NODA-GA, *p*-SCN-Bn-NOTA, SNHS-TE1PA, and *p*-SCN-Bn-TE1PA. Ligands studied in vivo are colored in black.

If *p*-SCN-Bn-TE1PA was successfully conjugated, leading to encouraging results (including  $^{64}\text{Cu}$  PET-CT imaging), we proved that *p*-SCN-Bn-DOTA and *p*-SCN-Bn-NOTA were not fully suitable for the bioconjugation to the 9E7.4 antibody, since the immunoreactivity (fraction of the antibody still able to recognize its target after radiolabeling) slightly decreased after grafting.<sup>14</sup> Therefore,  $^{64}\text{Cu}$  radiolabeled *p*-SCN-Bn-TE1PA was presented as an interesting radiotracer, but

without any possible comparison with another currently available.

To make the best comparison study, we then chose to test the NHS-DOTA ester and NHS-NODA-GA ester<sup>18</sup> as additional comparators for *p*-SCN-Bn-TE1PA to select the best candidate for a comparative study using the 9E7.4 antibody model.<sup>19</sup> The choice of DOTA and NOTA, rather than other described copper chelating agents such as SarAr<sup>20</sup> or another cyclam (such as CB-TE2A<sup>21</sup>) or cyclen derivative (such as CB-DO2A<sup>22</sup>), was done because there is no consensus regarding the best comparison model for <sup>64</sup>Cu imaging. Additionally, NHS-DOTA ester and NHS-NODA-GA ester can be considered as serious competitors in the race for <sup>64</sup>Cu PET-imaging, thanks to their commercial availability, even if their copper complexes are known to be sensitive to competitive metal excess.<sup>23,24</sup>

Consequently, the aim of this new investigation step was to propose a viable radiotracer based on NOTA and DOTA, for comparison to *p*-SCN-Bn-TE1PA within the 9E7.4 model. The new immunoconjugates obtained were radiolabeled with <sup>64</sup>Cu, facilitating determination of the ligand-to-antibody ratio, the specific activity, as well as the immunoreactivity. After comparison of the possible NOTA, DOTA, and TE1PA-based radiotracers, *p*-NCS-Bn-NOTA and NHS-DOTA ester were selected for an immuno-PET study versus *p*-SCN-Bn-TE1PA. Finally, this work presents a complete biodistribution and hepatic metabolic study for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA and <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA (Figure 2), the latter being the

most suitable for a comparative study. This work describes this investigation and how <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA unambiguously appeared as a better radiotracer than its two competitors. Additionally, to the best of our knowledge, this is the first <sup>64</sup>Cu-immuno-PET study ever reported comparing a “homemade” ligand BCA with these two commercially available and renowned competitors.

## RESULTS

**Conjugation and Radiolabeling.** Data extracted from the first tests of conjugation, radiolabeling, and immunoreactivity for each BCA grafted to the 9E7.4 antibody are presented in Table 2. Results obtained for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-NODA-GA and <sup>64</sup>Cu-9E7.4-SNHS-TE1PA were insufficient to assess the immunoreactivity. The renewed results for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-NCS-Bn-NOTA confirm that it was not suitable in this model for a complete comparative study, so we decided to select it only for a restricted animal study. On the contrary, the NHS-DOTA ester led to better results than its *p*-SCN-Bn-DOTA analogue, with a ligand-to-antibody ratio similar for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-Bn-SCN-TE1PA and <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA (5 ± 1 vs 4.5 ± 1). Finally, the C-functionalized version of TE1PA, as previously demonstrated, is unambiguously higher-performing than its SNHS-TE1PA analog.

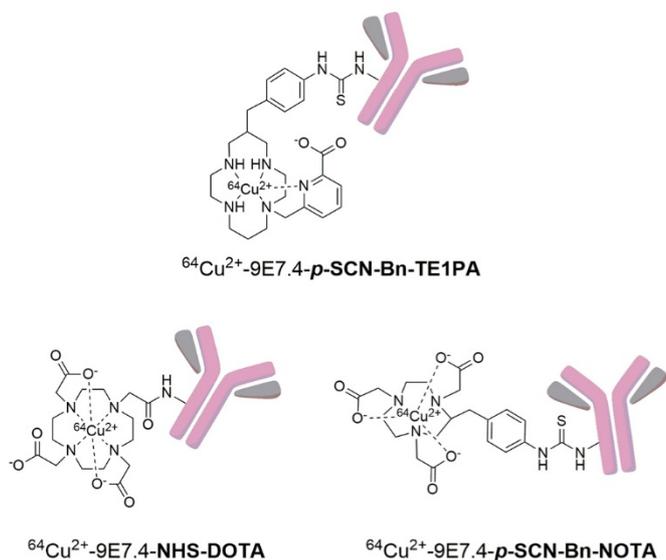
Radiolabeling yields, as well as specific activities, were determined on the radioimmunoconjugates used for the in vivo studies. For all three, the radiolabeling yields were close to 100% and no purification step was needed. The immunoreactivity performed for the radioimmunoconjugates was 76.5 ± 2.5% for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA, 58.3 ± 4.5% for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA, and 84.2 ± 1.3% for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA.

The table displays the average specific activities measured on several tests: 123.1 MBq/mg for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA and 108.4 MBq/mg for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA, both results being quite similar.

Consequently, <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA was selected for a complete in vivo comparative study with <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA, since their in vitro results were quite similar.

**Biodistribution Study.** Similar quantities of radioimmunoconjugates were injected in order to compare the selected ligands: 104 ± 2 μg (12.5 ± 0.3 MBq) for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA, 86 ± 3 μg (8.3 ± 0.6 MBq) for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA, and 100 μg (9.2 MBq) for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA. Results in terms of injected dose per gram of organ (% ID/g) are shown in Table 3 and Figure 3. % ID/g for the <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA can be found in Supporting Information 1.

At 2 h PI, most of the radioactivity was found in the blood (19.28 ± 1.50% ID/g for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA and 25.22 ± 3.60% ID/g for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA) and highly vascularized organs like heart, lungs, and liver. Concerning

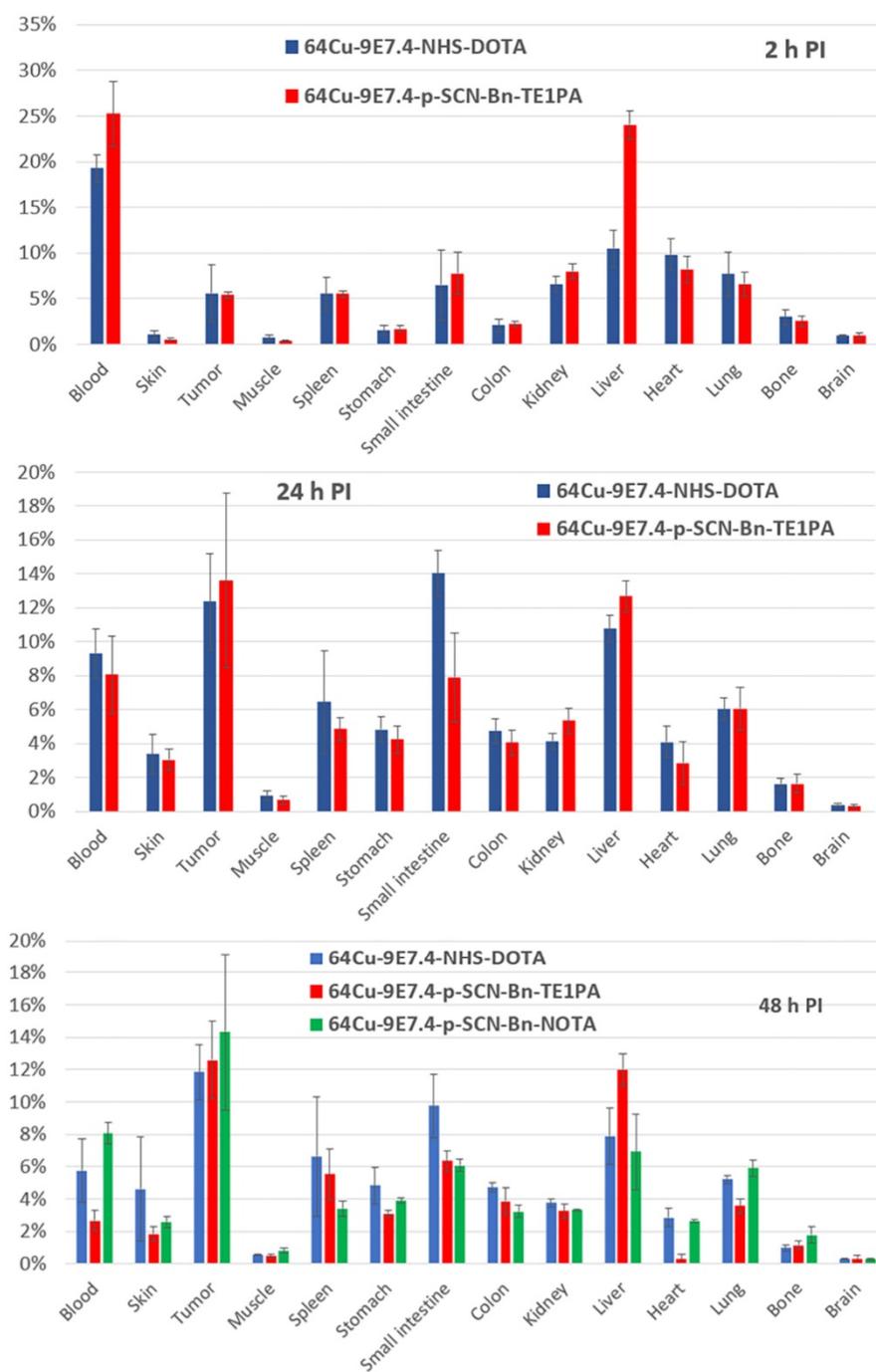


**Figure 2.** Radiolabeled bioconjugates <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA, <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA, and <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA.

**Table 2.** Characterization of Radioimmunoconjugates after Radiolabeling Tests with <sup>64</sup>Cu<sup>a</sup>

<sup>64</sup> Cu-9E7.4-BCA	BCA					
	SNHS-TE1PA	<i>p</i> -SCN-Bn-TE1PA	NHS-DOTA	<i>p</i> -SCN-Bn-DOTA	NHS-NODA-GA	<i>p</i> -SCN-Bn-NOTA
Ligand-to-antibody ratio	0.8 ± 1.2	5 ± 1	4.5 ± 1	2.4 ± 0.5	0.5 ± 0.2	1.2 ± 0.2
Immunoreactivity (%)	-	84.2 ± 1.3	76.5 ± 2.5	51.9 ± 5.1	-	58.3 ± 4.5
Radiolabeling yield (%)	77 ± 2.9	99.3 ± 0.4	99.7 ± 0.6	92.9 ± 3.7	50.5 ± 0.2	95.7 ± 3.6
Specific activity (MBq/mg)	-	168 ± 84	159 ± 60	-	-	-

<sup>a</sup>Standard deviations were calculated using several tests (*n* = 4).



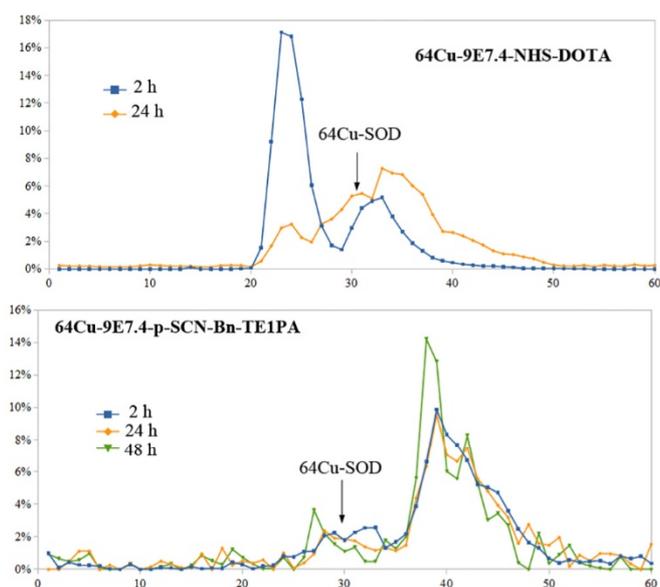
**Figure 3.** Biodistribution of  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA and  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA in mice grafted with 5T33 cells, expressed in % of the injected dose per gram of organ, at 2, 24, and 48 h post-injection and biodistribution of  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA at 48 h post-injection.

tion 3). The tumor was clearly visible at 24 and 48 h PI. For  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA, the liver uptake decreased visibly at 24 and 48 h PI. At later times, blood distribution can be seen for  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA and  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA, mostly in arteries and the heart, confirming the data obtained from the biodistribution study.

## DISCUSSION

During the past decade, research toward new radiopharmaceuticals for cancer diagnosis has become a major concern. In order to increase the imaging performance, radiolabeled phenotypic markers were developed to improve the distribution and accessibility of the target. Today, the combination of

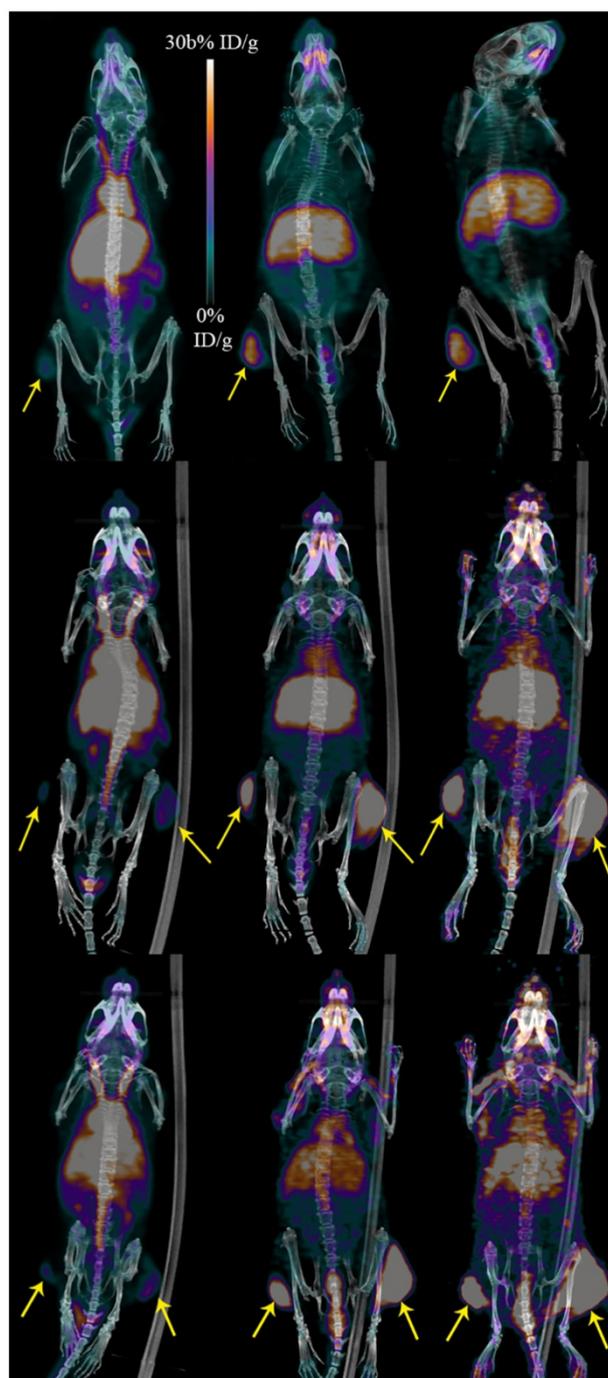
phenotypic imagery and metabolic imagery with PET-CT helps physicians set a prognosis diagnosis in oncology and direct treatments toward therapies adapted to each patient. The diagnosis of multiple myeloma is based on the patient's biologic status and on imaging using MR (magnetic resonance) and/or CT (computed tomography), and more recently on  $^{18}\text{F}$ -FDG PET-CT.<sup>25</sup> In this context, it is very difficult to visualize all tumoral sites due the characteristic heterogeneity of this disease, and phenotypic imaging is required to facilitate the prognosis. The first promising results have been obtained with a CXCR4 radiolabeled inhibitor ( $^{68}\text{Ga}$ -pentixafor),<sup>26</sup> but the target was not recovered at same level for all tumor cells.



**Figure 4.** Size exclusion chromatography of the liver extract from mice sacrificed at 2, 24, and 48 h post-injection for  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA and  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA. Results are expressed in percentage of total radioactivity.

Development of new phenotypic theranostic agents will be of great interest. Considering the tumor cell surface antigens, an interesting target is CD138, which is constantly expressed by multiple myeloma tumor cells. Antibodies and antibody derivatives are available against this target. The IgG<sub>2a</sub> rat antibody 9E7.4 was chosen to monitor the copper radiolabeled antibody metabolism and evaluate the theranostic properties. Even if the tumor targeting via antibody is faster and accessible in multiple myeloma disease, its associated blood half-life implies the use of a longer half-life PET radionuclide than  $^{18}\text{F}$  or  $^{68}\text{Ga}$ .  $^{64}\text{Cu}$  has low  $\gamma$  associated emission and low-energy  $\beta$  which hold great advantages compared to other radionuclides with long half-lives, notably  $^{89}\text{Zr}$  and  $^{124}\text{I}$  which impose high radiation safety constraints. Indeed, zirconium and iodine  $\beta^+$  emitter radionuclides have a high percentage of  $\gamma$  emission, higher than 1 MeV, that limits their use in clinical practice. Furthermore, in the context of theranostic use,  $^{64}\text{Cu}$  seems to be ideal due to its  $\beta^+/\beta^-$  emissions as well as the possibility of using its  $\beta^-$  radioisotope analog  $^{67}\text{Cu}$ . This study is a step toward a higher performing radiopharmaceutical using  $^{64}\text{Cu}$  as the radionuclide.

Our groups already strived to synthesize a ligand with a high selectivity for copper. We designed cyclam-based ligands with an additional picolinate function that was proven to form copper complexes with remarkable thermodynamic stability. Among them, TE1PA was the most promising, with proven *in vitro* superiority when compared to DOTA.<sup>12</sup> An *in vivo* study using the F6 antibody (targeting the carcinoembryonic antigen) showed that  $^{64}\text{Cu}$ -F6-TE1PA was suitable for PET imaging, although not significantly superior to  $^{64}\text{Cu}$ -F6-*p*-SCN-Bn-DOTA regarding *in vivo* stability in those experimental conditions.<sup>13</sup> The fairly low liver metabolism observed in this publication was probably due to the chosen antibody, a mouse antibody captured by the FcRn mouse liver receptor, limiting the antibody liver metabolism,<sup>27</sup> with the liver being the main organ in copper metabolism. Because of this, we have selected a rat IgG<sub>2a</sub> antibody for this study and a syngeneic tumor model. This antibody holds great interest for multiple



**Figure 5.** PET-CT images of subcutaneous ST33 grafted mouse at 2, 24, and 48 h post-injection of  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-NCS-Bn-TE1PA (top, one tumor grafted),  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA (middle, two tumors grafted), and  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA (bottom, two tumors grafted). Yellow arrows indicate tumors.

myeloma imaging,<sup>23</sup> and the mouse model increases its liver uptake, which was relevant for studying *in vivo* resistance to transchelation.

In order to improve TE1PA and synthesize the highest performing copper ligand, we added a C-functionalization with a Bn-NCS function allowing the conjugation with the primary amines of the antibody. Indeed, nonfunctionalized TE1PA formerly needed an activation step, leading to a modest 0.6 to 0.8 ligand coupled on the 9E7.4 antibody (respectively for 500 and 700 equiv of activated chelator added). This is due to the

poor reactivity of the carboxylic aromatic function, even with a coupling agent. The immunoreactivity also decreased from 85% to 60% and 55% (respectively for 500 and 700 equiv of activated chelator added) after grafting, probably because of the large excess of ligand needed for the conjugation. This shows that the one-step coupling method chosen has a drastic impact on the antibody properties compared to the thiourea.

The conjugation using the C-functionalized TE1PA proved to be extremely efficient, with about five ligands coupled by antibody and no decrease of the immunoreactivity after grafting. It brings the twofold advantage of keeping its targeting properties while allowing a much higher specific activity of the radioimmunoconjugate, added to an easier and quicker conjugation between the ligand and the antibody. It is worth mentioning that in those experimental conditions, the immunoreactivity of 9E7.4-NHS-DOTA and 9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA decreases slightly, suggesting *in vitro* superiority of 9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA, which displays a better ligand-to-antibody ratio while conserving the targeting properties of the antibody.

With the chosen IgG<sub>2a</sub> antibody, another surprising result has been obtained. The classic bifunctional chelating agent *p*-SCN-Bn-DOTA cannot be grafted on this antibody with more than one ligand per molecule without losing its immunoreactivity.<sup>14</sup> This result could be explained by the presence of lysine residues near the antibody CDR (Complementarity-Determining Region) area. In case of a large excess of ligands during the conjugation procedure, some of them can bind near the CDR and interact with it. Charge and spatial presentation of the picolinate cyclam derivative and DOTA derivatives could explain the differences observed with the two ligands studied. It clearly highlights that *p*-SCN-Bn-TE1PA is more efficient than *p*-SCN-Bn-DOTA. Only the NHS-DOTA derivative has shown satisfying results, probably due to the difference of the carbon chain between the cyclen and conjugation functions. The relatively low specific activity observed in our study reflects the low specific activity of copper sources that ranged between 8 and 20 MBq/nmol. It also explains the high standard deviation, the radiolabeling being impacted by the quality of the copper source.

Coupling tests with NHS-NODA-GA showed that this ligand was not suitable to conduct the comparison study with this antibody, orienting our choice on its isothiocyanate derivative *p*-SCN-Bn-NOTA. This BCA did not present relevant conjugation results, so it was not chosen for the complete *in vivo* study. A complementary study was made with PET imaging at 2, 24, and 48 h PI and a biodistribution study at 48 h PI, to demonstrate the sensitivity of NOTA to *in vivo* transchelation.

Our *in vivo* studies were designed to further explore a potential superiority of the 9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA. A 100 μg antibody quantity was chosen to saturate the metabolism and have a better view of the distribution of the radioimmunoconjugates, even if it involves a decrease of the tumor % ID/g. The injected activity was also chosen given the radioactive half-life of the <sup>64</sup>Cu, allowing a sufficient remaining activity at 48 h post-injection (PI) for imaging and *in vivo* studies. Biodistribution at the latest time (48 h PI) was evaluated to see the stability of the radioimmunoconjugates within the organism. In comparison with earlier times, it also allows us to see the clearance of the radioimmunoconjugates in each organ with time.

The earlier time (2 h PI) showed a quite high hepatic uptake for both radioimmunoconjugates, but significantly higher for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA. This liver uptake was confirmed by the imagery study and had already been described for antibodies.<sup>15,16</sup> It was comparable to blood and can be explained by the fact that this organ is highly vascularized. The difference between the two radioimmunoconjugates was confirmed by the metabolic study. For <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA, the main peak at 2 h PI did not differ much from the nonmetabolized radioimmunoconjugate used as a reference (retention time: 23 min). It suggested that only a small proportion of the <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA was metabolized in the liver at early times and could be linked to a smaller % ID/g compared to <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA for the liver. These differences could be due to a faster internalization of the picolinate derivative after its fixation on the liver target compared to the DOTA derivative. The nonmetabolized antibody observed at 2 h PI with DOTA reflected its localization in the extracellular aqueous compartment, and the second peak at 33 min translated the beginning of its metabolism. The differences between the two radiolabeled derivatives of 9E7.4 could be explained by differences in the associated charges of the copper complexes. This hypothesis seemed to be confirmed by the later times studied. Indeed, the DOTA derivative at 24 and 48 h appeared to be completely metabolized, like the picolinate derivative. The same hypothesis has been developed with affibodies coupled with DOTA<sup>28</sup> and can also explain the higher kidney uptake observed with the positively charged <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA compared to the negatively charged <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA at early times. At late times, the kidney uptake is comparable for the two derivatives. This can be explained by the lower transchelation of the TE1PA derivative compared to the DOTA derivative. Indeed, in the case of transchelation, the associated charge of the copper complexes changes, which could explain the comparable kidney fixation between 24 and 48 h only observed with the DOTA derivative, unlike what had been observed with the TE1PA derivative. Liver uptake was lower for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA, once again probably because of a difference in the associated charge of the complex.

The hepatic uptake stayed significantly higher for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA at 24 h PI. It is worth mentioning that compared to 2 h PI, <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA displayed a neat hepatic clearance, while there tended to be a buildup of <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA in the liver. The data of the metabolic study showed a high decrease of the peak corresponding to nonmetabolized <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-Bn-DOTA, while <sup>64</sup>Cu-SOD could be included in metabolites shown by the profile, since it has already been demonstrated that [<sup>64</sup>Cu(DOTA)]<sup>2-</sup> was less resistant to transchelation than [<sup>64</sup>Cu(TE1PA)]<sup>+</sup>. This seems to be confirmed by the size exclusion chromatogram of <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA, where no significant peak for <sup>64</sup>Cu-SOD was seen at 2, 24, or 48 h PI. In addition, this could be linked to the higher radioactivity uptake of the small intestine for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA. Given the primordial role of the small intestine in the physiologic capture of copper,<sup>29</sup> this could be a sign of dissociation between <sup>64</sup>Cu and 9E7.4-NHS-DOTA, leading to a reabsorption of free <sup>64</sup>Cu through the duodenum. The dissociation increased at 48 h PI, where a significantly higher amount of radioactivity was counted in the blood and highly vascularized organs for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA compared to <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA. We could assume that <sup>64</sup>Cu

dissociated from 9E7.4-NHS-DOTA, which was then taken by the ceruloplasmin, the most important protein in charge of copper blood transport. This observation could be linked to the metabolic study at 48 h PI: the radioactivity was undetectable in the supernatant of the liver extract after centrifugation for 9E7.4-NHS-DOTA, and all the activity was concentrated in the liver residue. This could suggest that the remaining radioactivity was fixed on heavy proteins that could not be separated with the method used. Moreover, there was a neat hepatic clearance of  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA compared to its competitor, with radioactivity decreasing by a factor of 9.4, while it decreased by a modest factor of 1.3 for 9E7.4-NHS-DOTA. PET imaging seemed to display liver uptake for  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA between 24 and 48 h PI, which could be linked to a blood distribution of free  $^{64}\text{Cu}$ . Indeed, the biodistribution at 48 h PI showed the same significantly higher blood, heart, and lung uptake observed with the  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA. This also suggests a dissociation of the  $^{64}\text{Cu}$ -NOTA complexes with the release of free copper in the bloodstream. It is interesting to note that despite a lower hepatic uptake,  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA was subject to the same metabolic and hepatic transchelation as the DOTA derivative.

All these results tend to show highly superior in vivo stability of  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA regarding  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA and  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA in the model we used. Even if the hepatic ID/g of  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA was initially more important, leading to an increased metabolism at an early time, it showed a far superior resistance to transchelation by cuproproteins in the liver. There was also a substantial hepatic clearance over time, since  $^{64}\text{Cu}$  was eliminated with the immunoconjugates, while it tended to build up in the liver for 9E7.4-NHS-DOTA, probably because it was switched to cuproproteins through transchelation, leading to an undesired irradiation of the liver. In addition, the complementary data with  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA at 48 h PI were similar to that from  $^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-NHS-DOTA regarding the blood uptake, suggesting a better stability of  $^{64}\text{Cu}$ -TE1PA complexes compared to  $^{64}\text{Cu}$ -NOTA.

This study showed that TE1PA could be especially interesting for imaging at later times.  $^{64}\text{Cu}$ -labeled CD138 antibody has already been proven higher-performing than  $^{64}\text{CuCl}_2$  and  $^{18}\text{F}$ -FDG for diagnosis in this preclinical multiple myeloma model<sup>16</sup> and TE1PA could fit perfectly as a bifunctional chelator to produce a radioimmunoconjugate for this purpose.

## CONCLUSION

Conjugation of *p*-SCN-Bn-TE1PA, the bifunctional TE1PA obtained via a C-functionalization with the anti-CD138 9E7.4 antibody, and its  $^{64}\text{Cu}$  radiolabeling have been successfully renewed and involved in a competitive study with two renowned BCAs based on DOTA and NOTA, from the bioconjugation to the PET imaging study. This constitutes the first case of such a study. Among NHS-DOTA, *p*-SCN-Bn-DOTA, NHS-NODA-GA, and *p*-SCN-Bn-NOTA, only NHS-DOTA ester and *p*-SCN-Bn-NOTA were able to produce a sufficient conjugation rate and immunoreactivity allowing the comparison with *p*-SCN-Bn-TE1PA for biodistribution, hepatic metabolism, and imaging study.

$^{64}\text{Cu}$ -9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA has shown high tumor targeting, associated with an increasing tumor-to-tissues ratio

over time that suggests an overall clearance from healthy tissues. Compared to DOTA and NOTA, TE1PA displays a significantly superior in vivo stability and resistance to transchelation. This confirms the results obtained in vitro where C-functionalized TE1PA outperformed DOTA (both NHS and NCS functionalized), *p*-SCN-Bn-NOTA, NHS-NODA-GA, and nonfunctionalized TE1PA. It has proven once again its usefulness for immuno-PET imaging in a preclinical model.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Materials.** The 9E7.4 antibody production was carried out in-house using a hybridoma obtained from rat immunization with a murine CD138-like peptide.<sup>22</sup> NHS-DOTA ester, *p*-SCN-Bn-DOTA, and *p*-SCN-Bn-NOTA bifunctional chelating agents (BCA) were purchased from Macrocyclics. *p*-SCN-Bn-TE1PA and SNHS-TE1PA were synthesized as previously published.<sup>12,14</sup> NHS-NODA-GA ester was obtained at CheMatech.

Absolute anhydrous ethanol, sodium acetate trihydrate (TraceSelect grade), and citrate monohydrate trisodium salt were purchased at VWR. BSA (bovine serum albumin) and EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) were purchased from Sigma. The protease inhibitor cocktail, HEPES base, HEPES potassium salt, and sodium chloride were obtained from Merck. 0.9% NaCl for injection was obtained from Aguettan. The water used was produced with a Gradient Milli-Q system from Millipore, with an 18.2 M $\Omega$ .cm resistivity.

The HPLC system used was composed of a control module Waters 600, a quaternary pump Waters 600, a 487 UV Waters detector, a Waters fraction collector III, and Empower pro 1154 software.

Copper-64 dichloride in 0.1 M hydrochloric acid was obtained from ARRONAX cyclotron (Saint-Herblain, France). Radionuclide purity was determined by gamma spectrometry using a DSPEC-JR-2.0 type 98-24B HPGE detector (Ametek), and chemical purity was measured by ICP-OES using an iCAP 6500 DUO (Thermo Fisher Scientific).

The 5T33 murine multiple myeloma cell line was kindly provided by Dr. H. Turner (Nuclear Medicine Service, Fremantle Hospital, Western Australia) with the permission of Dr. J. Radl (TNO Institute, Leiden, Netherlands).<sup>30</sup>

**Conjugation.** 9E7.4-NHS-DOTA, 9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA, 9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA, 9E7.4-*p*-SCN-Bn-DOTA, and 9E7.4-NHS-NODA-GA were obtained following a standard conjugation method. Nonfunctionalized TE1PA was activated with SNHS as previously described.<sup>13</sup> Briefly, *p*-SCN-Bn-TE1PA (0.272 mg, 564 nmol, in HCl 0.1 M), SNHS-TE1PA (0.283 mg, 553 nmol, in MES buffer), *p*-SCN-Bn-DOTA (0.451 mg, 655 nmol, in DMF), NHS-DOTA ester (0.334 mg, 439 nmol, in DMF), *p*-SCN-Bn-NOTA (0.189 mg, 337 nmol, in DMF), and NHS-NODA-GA ester (0.14 mg, 186 nmol, in DMF) were added to, respectively, 4.22 mg (28.1 nmol), 0.166 mg (1.11 nmol), 4.91 mg (32.5 nmol), 3.29 mg (21.9 nmol), 2.53 mg (16.9 nmol), and 0.558 mg (3.72 nmol) of 9E7.4 in carbonate buffer 0.3 M, pH 8.6. This led to a BCA-antibody molar ratio of 20 for NHS-DOTA ester, *p*-SCN-Bn-TE1PA, and *p*-SCN-Bn-NOTA, a molar ratio of 50 for NHS-NODA-GA ester, and 500 equiv for SNHS-TE1PA. The solutions were stirred at room temperature overnight. The excess of ligand was removed by gel filtration using sodium acetate buffer, 0.1 M, pH 6, in order to avoid future antibody buffer change. The concentration of immunoconjugates (in the

**Table 4. Quantities of Reagents Added for the Radiolabeling of 9E7.4-SNHS-TE1PA, 9E7.4-*p*-NCS-Bn-TE1PA, 9E7.4-NHS-DOTA, 9E7.4-*p*-SCN-Bn-DOTA, 9E7.4-NHS-NODA-GA, and 9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA**

<sup>64</sup> Cu-9E7.4-BCA	BCA					
	SNHS-TE1PA	<i>p</i> -SCN-Bn-TE1PA	NHS-DOTA	<i>p</i> -SCN-Bn-DOTA	NHS-NODA-GA	<i>p</i> -SCN-Bn-NOTA
<sup>64</sup> CuCl <sub>2</sub>	0.5 μL, 1 MBq 0.05 nmol of total Cu	49 μL, 147 MBq 18 nmol of total Cu	115 μL, 188 MBq 7.5 nmol of total Cu	2 μL, 3.3 MBq 0.5 nmol of total Cu	5 μL, 5.64 MBq 0.12 nmol of total Cu	40 μL, 67 MBq 1.73 nmol of total Cu
2.5 M sodium acetate	0.5 μL	6 μL	11 μL	1 μL	0.5 μL	4 μL
Immunoconjugates	72.6 μL, 7.2 μg, 0.05 nmol	416 μL, 1.5 mg, 10 nmol	584 μL, 1.43 mg, 9.5 nmol	24.2 μL, 75 μg, 0.5 nmol	11 μL, 0.02 mg, 0.12 nmol	300 μL, 0.7 mg, 4.67 nmol
1 mM EDTA	1 μL, 1 nmol	5 μL, 5 nmol	10 μL, 10 nmol	1 μL, 1 nmol	1 μL, 1 nmol	1 μL, 1 nmol

final product) was assessed by UV–vis spectrophotometry using a NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). The immunoconjugates were analyzed with an HPLC system to check their purity and the absence of aggregated antibodies (Supporting Information 4). Chelate-to-antibody ratio was evaluated as described in the Radiolabeling section.

**Radiolabeling.** <sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub> solution was added to 2.5 M sodium acetate to neutralize hydrochloride ions and maintain a pH close to 6. Immunoconjugates were added to a known amount of <sup>64</sup>Cu in solution, in order to obtain a copper-to-antibody molar ratio close to 1 (0.8 to 1.2). The mixture was incubated at 40 °C during 30 min. Then, a calculated volume of 1 mM EDTA was added to the radiolabeling solution (EDTA final concentration: 0.01 mM) to complex eventual free <sup>64</sup>Cu(II). The mixture was stirred at room temperature during 5 min. The quantities of each reagent added for the radiolabeling of <sup>64</sup>Cu-9E7.4-SNHS-TE1PA, <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA, <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA, <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-DOTA, <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-NODA-GA, and <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA are listed in Table 4.

To evaluate the radiochemical purity, 2 μL of the radiolabeling solution was taken out and deposited on an instant thin layer chromatography plate (Agilent Technologies). The ITLC was developed over 10 cm using 0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.5). The plate was then removed from the solvent and exposed 5 min on a storage phosphor plate, which was revealed using a radiometric phosphor imager Cyclone Plus (PerkinElmer) and analyzed with the Optiquant software to obtain a radiochromatogram. In these conditions, the radioimmunoconjugate stays at the bottom (Rf. 0) while the <sup>64</sup>Cu-EDTA migrates at the top of the plate (Rf. 1). The chelate per antibody number was evaluated using the same method but with a modification of the copper-to-antibody ratio (increased to 5 and 10). After radiolabeling, the chelate per antibody number was evaluated by the following formula: chelate-to-antibody number = nmol of added copper × % of the radioactivity fixed on the antibody (radioactivity at Rf 0 to total radioactivity on the chromatography plate)/nmol antibody added. Pictures of the radiochromatograms can be found in Supporting Information 5.

**In Vivo Studies. Animal Model.** The C57BL/KaLwRij female mice were purchased from Envigo and housed under conventional conditions at the Experimental Therapeutic Unit animal facility (SFR François Bonamy, IRS-UN, University of Nantes, license number: C44278). Experiments were approved by the local ethic committee (imaging reference: 00143.01) and by the Department of Research (biodistribution reference: 2016072014351657). The mice were 18 weeks old (for 9E7.4-NHS-DOTA), 11 weeks old (for 9E7.4-*p*-SCN-NOTA), and 10 to 23 weeks old (for 9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA) and received a subcutaneous graft of 1 million of 5T33 cells in

each paw, 10 days prior the biodistribution studies. These are from a transplantable murine myeloma cell line which expresses the CD138 antigen targeted by 9E7.4 mAb. This allowed the development of subcutaneous tumors on mice, sizes 5 to 10 mm, on one or both paws.

**Biodistribution.** Each grafted mouse was injected in the tail vein with 130 μL of <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA (12 animals) or 100 μL of <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA (11 animals) and <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA, corresponding to 83 to 105 μg (see Biodistribution results section) of radiolabeled immunoconjugates. Activity injected per mouse was 8.3 ± 0.6 MBq for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA, 9.2 MBq for <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA, and 12.8 ± 0.2 MBq for the <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA. For each group, four mice were sacrificed at 2, 24, and 48 h post-injection (PI), except for the group at 48 h injected with <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA and with <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA (three mice each). Blood and organs were collected in order to weigh and count them using a Wallac 1480 Wizard gamma counter (PerkinElmer). The CPMs were decay-corrected and converted in Bq using the comparison with four diluted standard samples of the injected dose that are counted at the same time. For each tissue and organ, the activity was expressed in the percentage of the injected dose per gram.

**Immunoreactivity.** An immunoreactivity test was performed on each radiolabeled immunoconjugate. NHS-activated magnetic beads (Thermo Fisher Scientific) were previously conjugated with a customized CD138-like peptide produced by Genecust, using the protocol given by Thermo Fisher Scientific. The final concentration of the conjugated beads was 10 mg/mL in PBS. 20 μL of the bead suspension (0.2 mg) was added to 1 pmol of purified radiolabeled antibodies. A solution of 0.1% BSA in PBS was then added, up to a final volume of 150 μL. This mixture was incubated at 37 °C during 2 h. Supernatants containing nonreactive radiolabeled antibodies and magnetic beads were collected separately, using a magnetic rack (MagRack, GE Healthcare). The radioactivity in each fraction was assessed using a gamma counter. The immunoreactivity was obtained by calculating the percentage for the number of CPM (counts per minute) of the beads compared to the total activity (beads and supernatant).

**Metabolic Study.** For each biodistribution time, for both <sup>64</sup>Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-TE1PA and <sup>64</sup>Cu-9E7.4-NHS-DOTA, two hepatic lobes from two of the sacrificed mice were collected, pooled, and treated in order to separate the precipitate of proteins from the supernatant containing the radioimmunoconjugates and its metabolites. The method used was based on a protocol described by Bass et al.<sup>17</sup> and adapted by Frindel et al.<sup>13</sup> The hepatic lobes were washed out with 0.9% NaCl at 4 °C and put in a 15 mL Falcon tube containing a 65:35 ethanol/ammonium acetate 0.1 M mixture with 100

Antibody, Radiolabeling and Preclinical Application in Xenografted Colorectal Cancer. *RSC Adv.* 7 (15), 9272–9283.

(14) Le Bihan, T., Navarro, A.-S., Le Bris, N., Le Saec, P., Gouard, S., Haddad, F., Gestin, J.-F., Cherel, M., Faivre-Chauvet, A., and Tripier, R. (2018) Synthesis of C-Functionalized TE1PA and Comparison with Its Analogues. An Example of Bioconjugation on 9E7.4 MAb for Multiple Myeloma  $^{64}\text{Cu}$ -PET Imaging. *Org. Biomol. Chem.* 16 (23), 4261–4271.

(15) Fichou, N., Gouard, S., Maurel, C., Barbet, J., Ferrer, L., Morgenstern, A., Bruchertseifer, F., Faivre-Chauvet, A., Bigot-Corbel, E., and Davodeau, F. (2015) Single-Dose Anti-CD138 Radioimmunotherapy: Bismuth-213 Is More Efficient than Lutetium-177 for Treatment of Multiple Myeloma in a Preclinical Model. *Front. Med.* 2, 1 DOI: 10.3389/fmed.2015.00076.

(16) Bailly, C., Gouard, S., Lacombe, M., Saec, P., Chalopin, B., Bourgeois, M., Chouin, N., Tripier, R., Halime, Z., and Haddad, F. (2018) Comparison of Immuno-PET of CD138 and PET Imaging with  $^{64}\text{CuCl}_2$  and  $^{18}\text{F}$ -FDG in a Preclinical Syngeneic Model of Multiple Myeloma. *Oncotarget* 9 (10), 1 DOI: 10.18632/oncotarget.23886.

(17) Bass, L. A., Wang, M., Welch, M. J., and Anderson, C. J. (2000) In Vivo Transchelation of Copper-64 from TETA-Octreotide to Superoxide Dismutase in Rat Liver. *Bioconjugate Chem.* 11 (4), 527–532.

(18) Ghosh, S. C., Pinkston, K. L., Robinson, H., Harvey, B. R., Wilganowski, N., Gore, K., Sevic-Muraca, E. M., and Azhdarinia, A. (2015) Comparison of DOTA and NODAGA as Chelators for  $(^{64}\text{Cu})$ -Labeled Immunoconjugates. *Nucl. Med. Biol.* 42 (2), 177–183.

(19) Tolmachev, V., Yim, C.-B., Rajander, J., Perols, A., Karlström, A. E., Haaparanta-Solin, M., Grönroos, T. J., Solin, O., and Orlova, A. (2017) Comparative Evaluation of Anti-HER2 Affibody Molecules Labeled with  $^{64}\text{Cu}$  Using NOTA and NODAGA. *Contrast Media Mol. Imaging* 2017, 8565802.

(20) Di Bartolo, N. M., Sargeson, A. M., Donlevy, T. M., and Smith, S. V. (2001) Synthesis of a New Cage Ligand, SarAr, and Its Complexation with Selected Transition Metal Ions for Potential Use in Radioimaging. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 0 (15), 2303–2309.

(21) Wadas, T. J., and Anderson, C. J. (2006) Radiolabeling of TETA- and CB-TE2A-Conjugated Peptides with Copper-64. *Nat. Protoc.* 1 (6), 3062–3068.

(22) Boswell, C. A., Sun, X., Niu, W., Weisman, G. R., Wong, E. H., Rheingold, A. L., and Anderson, C. J. (2004) Comparative in Vivo Stability of Copper-64-Labeled Cross-Bridged and Conventional Tetraazamacrocyclic Complexes. *J. Med. Chem.* 47 (6), 1465–1474.

(23) Kukis, D. L., Li, M., and Meares, C. F. (1993) Selectivity of Antibody-Chelate Conjugates for Binding Copper in the Presence of Competing Metals. *Inorg. Chem.* 32 (19), 3981–3982.

(24) Maheshwari, V., Dearling, J. L. J., Treves, S. T., and Packard, A. B. (2012) Measurement of the Rate of Copper(II) Exchange for  $^{64}\text{Cu}$  Complexes of Bifunctional Chelators. *Inorg. Chim. Acta* 393, 318–323.

(25) Moreau, P., Attal, M., Caillot, D., Macro, M., Karlin, L., Garderet, L., Facon, T., Benboubker, L., Escoffre-Barbe, M., Stoppa, A.-M., et al. (2017) Prospective Evaluation of Magnetic Resonance Imaging and  $[^{18}\text{F}]$ 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.* 35 (25), 2911–2918.

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

(27) Wachsmann, J. (2016) Molecular Imaging and Therapy Targeting Copper Metabolism in Hepatocellular Carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 22 (1), 221.

(28) Westerlund, K., Honarvar, H., Norrström, E., Strand, J., Mitran, B., Orlova, A., Eriksson Karlström, A., and Tolmachev, V. (2016) Increasing the Net Negative Charge by Replacement of DOTA Chelator with DOTAGA Improves the Biodistribution of Radiolabeled Second-Generation Synthetic Affibody Molecules. *Mol. Pharmaceutics* 13 (5), 1668–1678.

(29) Qin, C., Liu, H., Chen, K., Hu, X., Ma, X., Lan, X., Zhang, Y., and Cheng, Z. (2014) Theranostics of Malignant Melanoma with  $^{64}\text{CuCl}_2$ . *J. Nucl. Med.* 55 (5), 812–817.

(30) Radl, J., Croese, J. W., Zurcher, C., Van den Enden-Vieveen, M. H., and de Leeuw, A. M. (1988) Animal Model of Human Disease. Multiple Myeloma. *American Journal of Pathology* 132 (3), 593–597.

---

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

- (1) Basu, S.; Alavi, A. Unparalleled Contribution of  $^{18}\text{F}$ -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  $^{15}\text{O}$ -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) Bruyant, P. D. Analytic and Iterative Reconstruction Algorithms in SPECT *J. Nucl. Med.* **2002**, vol. 43 no. 10 1343-1358
- (7) 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.
- (8) 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.
- (9) 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.
- (10) Vali, R.; Loidl, W.; Pirich, C.; Langesteger, W.; Beheshti, M. Imaging of Prostate Cancer with PET/CT Using  $^{18}\text{F}$ -Fluorocholine. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2015**, *5* (2), 96–108.
- (11) Pichler, B. J.; Wehrl, H. F.; Judenhofer, M. S. Latest Advances in Molecular Imaging Instrumentation. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49* (Suppl 2), 5S-23S.
- (12) Karp, J. S.; Surti, S.; Daube-Witherspoon, M. E.; Freifelder, R.; Cardi, C. A.; Adam, L.-E.; Bilger, K.; Muehllehner, G. Performance of a Brain PET Camera Based on Anger-Logic Gadolinium Oxyorthosilicate Detectors. *J. Nucl. Med.* **2003**, *44* (8), 1340–1349.
- (13) 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.
- (14) Gambhir, S. S.; Czernin, J.; Schwimmer, J.; Silverman, D. H. S.; Coleman, R. E.; Phelps, M. E. A Tabulated Summary of the FDG PET Literature. *J. Nucl. Med.* **2001**, *42* (5 suppl), 1S-93S.
- (15) Reske, S. N.; Kotzerke, J. FDG-PET for Clinical Use. *Eur. J. Nucl. Med.* **2001**, *28* (11), 1707–1723.
- (16) Glaudemans, A. W. J. M.; Enting, R. H.; Heesters, M. A. A. M.; Dierckx, R. A. J. O.; van Rheeën, R. W. J.; Walenkamp, A. M. E.; Slart, R. H. J. A. Value of  $^{11}\text{C}$ -Methionine PET in Imaging Brain Tumours and Metastases. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2013**, *40* (4), 615–635.

- (17) 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.
- (18) Kulshrestha, R. K.; Vinjamuri, S.; England, A.; Nightingale, J.; Hogg, P. The Role of <sup>18</sup>F-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.
- (19) 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.
- (20) Martínez, G.; Vernooij, R. W.; Fuentes Padilla, P.; Zamora, J.; Bonfill Cosp, X.; Flicker, L. <sup>18</sup>F 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).
- (21) Thobois, S.; Prange, S.; Scheiber, C.; Broussolle, E. What a Neurologist Should Know about PET and SPECT Functional Imaging for Parkinsonism: A Practical Perspective. *Parkinsonism Relat. Disord.* **2019**, *59*, 93–100.
- (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 <sup>68</sup>Ga-DOTA-Conjugated Somatostatin Receptor Targeting Peptides and <sup>18</sup>F-DOPA. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2017**, *44* (9), 1588–1601.
- (23) Pan, J. A.; Salerno, M. Clinical Utility and Future Applications of PET/CT and PET/CMR in Cardiology. *Diagnostics (Basel)* **2016**, *6* (3).
- (24) 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.
- (25) Zhuang, H.; Yang, H.; Alavi, A. Critical Role of <sup>18</sup>F-Labeled Fluorodeoxyglucose PET in the Management of Patients with Arthroplasty. *Radiol. Clin. North Am.* **2007**, *45* (4), 711–718, vii.
- (26) Jadvar, H. Is There Utility for FDG PET in Prostate Cancer? *Semin. Nucl. Med.* **2016**, *46* (6), 502–506.
- (27) Liu, Y. The Place of FDG PET/CT in Renal Cell Carcinoma: Value and Limitations. *Front. Oncol.* **2016**, *6*.
- (28) Bouchelouche, K.; Physician, C.; Choyke, P. L. PET/CT in Renal, Bladder and Testicular Cancer. *PET Clin.* **2015**, *10* (3), 361–374.
- (29) Trapani, J. A.; Darcy, P. K. Immunotherapy of Cancer. *Aust Fam Physician* **2017**, *46* (4), 194–199.
- (30) 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**.
- (31) 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. *J. Clin. Onc.* **2012**, *30* (21), 2601–2608.

- (32) McCabe, K. E.; Wu, A. M. Positive Progress in ImmunoPET—Not Just a Coincidence. *Cancer Biother. Radio.* **2010**, *25* (3), 253–261.
- (33) Kurihara, H.; Hamada, A.; Yoshida, M.; Shimma, S.; Hashimoto, J.; Yonemori, K.; Tani, H.; Miyakita, Y.; Kanayama, Y.; Wada, Y.; et al.  $^{64}\text{Cu}$ -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*.
- (34) Velikyan, I.; Schweighöfer, P.; Feldwisch, J.; Seemann, J.; Frejd, F. Y.; Lindman, H.; Sörensen, J. Diagnostic HER2-Binding Radiopharmaceutical,  $^{68}\text{Ga}$ -ABY-025, for Routine Clinical Use in Breast Cancer Patients. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2019**, *9* (1), 12–23.
- (35) 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  $^{89}\text{Zr}$ - and  $^{64}\text{Cu}$ -Labeled Anti-CD138 in a Preclinical Syngeneic Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (10), 2564.
- (36) 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 Int.* **2006**, *97* (5), 916–922.
- (37) Iagaru, A.; Goris, M. L.; Gambhir, S. S. Perspectives of Molecular Imaging and Radioimmunotherapy in Lymphoma. *Radiol. Clin. North Am.* **2008**, *46* (2), 243–252.
- (38) 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  $^{90}\text{Y}$ -Rituximab in CD20+ B-Cell Lymphoma as Predicted by  $^{89}\text{Zr}$ -Rituximab Immuno-PET: Impact of Preloading with Unlabelled Rituximab. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2015**, *42* (8), 1304–1314.
- (39) 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.
- (40) 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).
- (41) Boswell, C. A.; Brechbiel, M. W. Development of Radioimmunotherapeutic and Diagnostic Antibodies: An Inside-Out View. *Nucl. Med. Biol.* **2007**, *34* (7), 757–778.
- (42) Wu, A. M.; Olafsen, T. Antibodies for Molecular Imaging of Cancer. *Cancer J.* **2008**, *14* (3), 191–197.
- (43) Lobo, E. D.; Hansen, R. J.; Balthasar, J. P. Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93* (11), 2645–2668.
- (44) Dongen, G. A. M. S. van; Visser, G. W. M.; Hooge, M. N. L.; Vries, E. G. de; Perk, L. R. Immuno-PET: A Navigator in Monoclonal Antibody Development and Applications. *The Oncologist* **2007**, *12* (12), 1379–1389.

- (45) Goldenberg, D. M.; Sharkey, R. M.; Paganelli, G.; Barbet, J.; Chatal, J.-F. Antibody Pretargeting Advances Cancer Radioimmunodetection and Radioimmunotherapy. *J. Clin. Onc.* **2006**, *24* (5), 823–834.
- (46) Holliger, P.; Hudson, P. J. Engineered Antibody Fragments and the Rise of Single Domains. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23* (9), 1126–1136.
- (47) Fu, R.; Carroll, L.; Yahioğlu, G.; Aboagye, E. O.; Miller, P. W. Antibody Fragment and Affibody ImmunoPET Imaging Agents: Radiolabelling Strategies and Applications. *ChemMedChem* **2018**, *13* (23), 2466–2478.
- (48) 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.
- (49) Grönwall, C.; Ståhl, S. Engineered Affinity Proteins—Generation and Applications. *J. Biotechnol.* **2009**, *140* (3), 254–269.
- (50) Löfblom, J.; Feldwisch, J.; Tolmachev, V.; Carlsson, J.; Ståhl, S.; Frejd, F. Y. Affibody Molecules: Engineered Proteins for Therapeutic, Diagnostic and Biotechnological Applications. *FEBS Letters* **2010**, *584* (12), 2670–2680.
- (51) 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.
- (52) Sitarz, M.; Cussonneau, J.-P.; Matulewicz, T.; Haddad, F. Radionuclide Candidates for B+ $\gamma$  Coincidence PET: An Overview. *Appl. Radiat. Isot.* **2020**, *155*, 108898.
- (53) 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.
- (54) Linder, M. C.; Hazegh-Azam, M. Copper Biochemistry and Molecular Biology. *Am. J. Clin. Nutr.* **1996**, *63* (5), 797S–811S.
- (55) Inesi, G. Molecular Features of Copper Binding Proteins Involved in Copper Homeostasis. *IUBMB Life* **2017**, *69* (4), 211–217.
- (56) 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  $^{64}\text{Cu}$ . *Appl. Radiat. Isotopes* **2018**, *134*, 312–315.
- (57) Zinn, K. R.; Morris, S. Production of No-Carrier-Added  $^{64}\text{Cu}$  from Zinc Metal Irradiated under Boron Shielding. *Cancer* **1994**; *73*: 774–8
- (58) Peach, K.; Wilson, P.; Jones, B. Accelerator Science in Medical Physics. *Br. J. Radiol.* **2011**, *84* (Spec Iss 1), S004–S010.
- (59) Kim, J. H.; Park, H.; Chun, K. S. Effective Separation Method of  $^{64}\text{Cu}$  from  $^{67}\text{Ga}$  Waste Product with a Solvent Extraction and Chromatography. *Appl. Radiat. Isotopes* **2010**, *68* (9), 1623–1626.

- (60) Szelecsényi, F.; Blessing, G.; Qaim, S. M. Excitation Functions of Proton Induced Nuclear Reactions on Enriched  $^{61}\text{Ni}$  and  $^{64}\text{Ni}$ : Possibility of Production of No-Carrier-Added  $^{61}\text{Cu}$  and  $^{64}\text{Cu}$  at a Small Cyclotron. *Appl. Radiat. Isotopes* **1993**, *44* (3), 575–580.
- (61) 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  $^{64}\text{Cu}$  Using a Biomedical Cyclotron. *Nucl. Med. Biol.* **1997**, *24* (1), 35–43.
- (62) Obata, A.; Kasamatsu, S.; McCarthy, D. W.; Welch, M. J.; Saji, H.; Yonekura, Y.; Fujibayashi, Y. Production of Therapeutic Quantities of  $^{64}\text{Cu}$  Using a 12 MeV Cyclotron. *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30* (5), 535–539.
- (63) 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.
- (64) 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*.
- (65) Cai, Z.; Anderson, C. J. Chelators for Copper Radionuclides in Positron Emission Tomography Radiopharmaceuticals. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2014**, *57* (4), 224–230.
- (66) Linder, M. C.; Wooten, L.; Cerveza, P.; Cotton, S.; Shulze, R.; Lomeli, N. Copper Transport. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *67* (5), 965S-971S.
- (67) Peña, M. M. O.; Lee, J.; Thiele, D. J. A Delicate Balance: Homeostatic Control of Copper Uptake and Distribution. *J. Nutr.* **1999**, *129* (7), 1251–1260.
- (68) Trocetto, J.-M.; Chappuis, P.; El Balkhi, S.; Poupon, J.; Leyendecker, A.; Chaine, P.; Woimant, F. Anomalies du métabolisme du cuivre chez l'adulte. *La Revue de Médecine Interne* **2010**, *31* (11), 750–756.
- (69) Lee, J.; Peña, M. M. O.; Nose, Y.; Thiele, D. J. Biochemical Characterization of the Human Copper Transporter Ctr1. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (6), 4380–4387.
- (70) Clifford, R. J.; Maryon, E. B.; Kaplan, J. H. Dynamic Internalization and Recycling of a Metal Ion Transporter: Cu Homeostasis and CTR1, the Human Cu<sup>+</sup> Uptake System. *J. Cell. Sci.* **2016**, *129* (8), 1711–1721.
- (71) Lutsenko, S.; Barnes, N. L.; Bartee, M. Y.; Dmitriev, O. Y. Function and Regulation of Human Copper-Transporting ATPases. *Physiological Reviews* **2007**, *87* (3), 1011–1046.
- (72) Liu, N.; Lo, L. S.; Askary, S. H.; Jones, L.; Kidane, T. Z.; Nguyen, T. T. M.; Goforth, J.; Chu, Y.-H.; Vivas, E.; Tsai, M.; et al. Transcuprein Is a Macroglobulin Regulated by Copper and Iron Availability. *J. Nutr. Biochem.* **2007**, *18* (9), 597–608.
- (73) Yu, C. H.; Yang, N.; Bothe, J.; Tonelli, M.; Nokhrin, S.; Dolgova, N. V.; Braiterman, L.; Lutsenko, S.; Dmitriev, O. Y. The Metal Chaperone Atox1 Regulates the Activity of the Human Copper Transporter ATP7B by Modulating Domain Dynamics. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292* (44), 18169–18177.
- (74) Prohaska, J. R.; Gybina, A. A. Intracellular Copper Transport in Mammals. *J. Nutr.* **2004**, *134* (5), 1003–1006.

- (75) Kelner, G. S.; Lee, M.; Clark, M. E.; Maciejewski, D.; McGrath, D.; Rabizadeh, S.; Lyons, T.; Bredesen, D.; Jenner, P.; Maki, R. A. The Copper Transport Protein Atox1 Promotes Neuronal Survival. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (1), 580–584.
- (76) Culotta, V. C.; Klomp, L. W. J.; Strain, J.; Casareno, R. L. B.; Krems, B.; Gitlin, J. D. The Copper Chaperone for Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (38), 23469–23472.
- (77) Takahashi, Y.; Kako, K.; Kashiwabara, S.; Takehara, A.; Inada, Y.; Arai, H.; Nakada, K.; Kodama, H.; Hayashi, J.; Baba, T.; et al. Mammalian Copper Chaperone Cox17p Has an Essential Role in Activation of Cytochrome c Oxidase and Embryonic Development. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22* (21), 7614–7621.
- (78) Hellman, N. E.; Gitlin, J. D. Ceruloplasmin Metabolism and Function. *Annual Review of Nutrition* **2002**, *22* (1), 439–458.
- (79) Piperno, A.; Alessio, M. Aceruloplasminemia: Waiting for an Efficient Therapy. *Front. Neurosci.* **2018**, *12*, 903.
- (80) 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.
- (81) Raymond, K. N.; McMurry, T. J.; Garrett, T. M. Macrocyclic Catechol-Containing Ligands. *Pure App. Chem.* **1988**, *60* (4), 545–548.
- (82) Rollet, N. Etude des propriétés de coordinations de nouveaux ligands macrocycliques vis-à-vis de cations métalliques en vue de l'utilisation de leurs complexes pour l'imagerie médicale nucléaire. *Université de Bourgogne.* **2011**.
- (83) Cabbiness, D. K.; Margerum, D. W. Macrocyclic Effect on the Stability of Copper(II) Tetramine Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91* (23), 6540–6541.
- (84) Kubíček, V.; Böhmová, Z.; Ševčíková, R.; Vaněk, J.; Lubal, P.; Poláková, Z.; Michalicová, R.; Kotek, J.; Hermann, P. NOTA Complexes with Copper(II) and Divalent Metal Ions: Kinetic and Thermodynamic Studies. *Inorg. Chem.* **2018**, *57* (6), 3061–3072.
- (85) 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.
- (86) 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.
- (87) Mirick, G. R.; O'Donnell, R. T.; DeNardo, S. J.; Shen, S.; Meares, C. F.; DeNardo, G. L. Transfer of Copper from a Chelated <sup>67</sup>Cu-Antibody Conjugate to Ceruloplasmin in Lymphoma Patients. *Nucl. Med. Biol.* **1999**, *26* (7), 841–845.
- (88) 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.
- (89) 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.

- (90) 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.
- (91) 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.
- (92) 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.
- (93) 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  $^{64}\text{Cu}$ -TETA-1A3 with  $^{64}\text{Cu}$ -BAT-2IT-1A3. *Cancer Biother. Radio.* **2001**, *16* (6), 483–494.
- (94) Rana, T. M.; Meares, C. F. N-Terminal Modification of Immunoglobulin Polypeptide Chains Tagged with Isothiocyanato Chelates. *Bioconjug. Chem.* **1990**, *1* (5), 357–362.
- (95) 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.
- (96) Baskin, J. M.; Bertozzi, C. R. Bioorthogonal Click Chemistry: Covalent Labeling in Living Systems. *QSAR & Combinatorial Science* **2007**, *26* (11–12), 1211–1219.
- (97) 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.
- (98) 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.
- (99) 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.
- (100) Parker, D. Tumour Targeting with Radiolabelled Macrocyclic–Antibody Conjugates. *Chem. Soc. Rev.* **1990**, *19* (3), 271–291.
- (101) Blower, P. J.; Lewis, J. S.; Zweit, J. Copper Radionuclides and Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine. *Nucl. Med. Biol.* **1996**, *23* (8), 957–980.
- (102) 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.
- (103) 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.

- (104) 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.
- (105) Fleming, I. N.; Manavaki, R.; Blower, P. J.; West, C.; Williams, K. J.; Harris, A. L.; Domarkas, J.; Lord, S.; Baldry, C.; Gilbert, F. J. Imaging Tumour Hypoxia with Positron Emission Tomography. *Br. J. Cancer* **2015**, *112* (2), 238–250.
- (106) 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.
- (107) Lewis, J. S.; McCarthy, D. W.; McCarthy, T. J.; Fujibayashi, Y.; Welch, M. J. Evaluation of  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM in Vitro and in Vivo in a Hypoxic Tumor Model. *J. Nucl. Med.* **1999**, *40* (1), 177–183.
- (108) 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  $^{64}\text{Cu}$ -Labeled Tetrameric RGD Peptide. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46* (10), 1707–1718.
- (109) McQuade, P.; Miao, Y.; Yoo, J.; Quinn, T. P.; Welch, M. J.; Lewis, J. S. Imaging of Melanoma Using  $^{64}\text{Cu}$ - and  $^{86}\text{Y}$ -DOTA-ReCCMSH(Arg11), a Cyclized Peptide Analogue of Alpha-MSH. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (8), 2985–2992.
- (110) 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  $^{18}\text{F}$ - and  $^{64}\text{Cu}$ -Labeled RGD Peptide. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15* (1), 41–49.
- (111) 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.
- (112) 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  $^{64}\text{Cu}$ -DOTATATE: First-in-Humans Study. *J. Nucl. Med.* **2012**, *53* (8), 1207–1215.
- (113) 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  $^{64}\text{Cu}$ -DOTATATE and  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC PET/CT: A Prospective Study of 59 Patients with Neuroendocrine Tumors. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (3), 451–457.
- (114) Malmberg, C.; Ripa, R. S.; Johnbeck, C. B.; Knigge, U.; Langer, S. W.; Mortensen, J.; Oturai, P.; Loft, A.; Hag, A. M.; Kjaer, A.  $^{64}\text{Cu}$ -DOTATATE for Noninvasive Assessment of Atherosclerosis in Large Arteries and Its Correlation with Risk Factors: Head-to-Head Comparison with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC in 60 Patients. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56* (12), 1895–1900.
- (115) 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  $^{64}\text{Cu}$ -Complexing Bifunctional Chelators for Radioimmunoconjugation: Labeling Efficiency, Specific Activity, and in Vitro/in Vivo Stability. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23* (5), 1029–1039.

- (116) Maheshwari, V.; Dearling, J. L. J.; Treves, S. T.; Packard, A. B. Measurement of the Rate of Copper(II) Exchange for  $^{64}\text{Cu}$  Complexes of Bifunctional Chelators. *Inorganica Chimica Acta* **2012**, *393*, 318–323.
- (117) Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson, C. J. Coordinating Radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium and Zirconium for PET and SPECT Imaging of Disease. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2858–2902.
- (118) 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.
- (119) 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.
- (120) 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  $^{64}\text{Cu}$  Radiopharmaceuticals. *Nucl. Med. Biol.* **2010**, *37* (1), 57–65.
- (121) 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  $^{64}\text{Cu}$ -Based Radiopharmaceuticals. *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35* (8), 875–882.
- (122) 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.
- (123) 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.
- (124) 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.
- (125) 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.
- (126) 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,  $^{64}\text{Cu}$ -Labeling and Biological Evaluation of Cross-Bridged Cyclam Chelators with Phosphonate Pendant Arms. *Dalton Trans* **2012**, *41* (7), 1938–1950.
- (127) 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.

- (128) Sasada, S.; Kurihara, H.; Kinoshita, T.; Yoshida, M.; Honda, N.; Shimoi, T.; Shimomura, A.; Yunokawa, M.; Yonemori, K.; Shimizu, C.; et al.  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-Trastuzumab PET Imaging for HER2-Specific Primary Lesions of Breast Cancer. *Ann. Oncol.* **2017**, *28* (8), 2028–2029.
- (129) 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  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-Trastuzumab in Patients with Metastatic Breast Cancer. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (1), 38–43.
- (130) 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  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-Trastuzumab PET. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55* (1), 23–29.
- (131) Steeg, P. S.; Camphausen, K. A.; Smith, Q. R. Brain Metastases as Preventive and Therapeutic Targets. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11* (5), 352–363.
- (132) 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  $^{64}\text{Cu}$  Using NOTA and NODAGA. *Contrast Media Mol. Imaging* **2017**, *2017*, 8565802.
- (133) Arteaga, C. Targeting HER1/EGFR: A Molecular Approach to Cancer Therapy. *Semin. Oncol.* **2003**, *30* (3 Suppl 7), 3–14.
- (134) Ping Li, W.; Meyer, L. A.; Capretto, D. A.; Sherman, C. D.; Anderson, C. J. Receptor-Binding, Biodistribution, and Metabolism Studies of  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-Cetuximab, a PET-Imaging Agent for Epidermal Growth-Factor Receptor-Positive Tumors. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2008**, *23* (2), 158–171.
- (135) 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  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-Cetuximab in 5 Cervical Cancer Cell Lines. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49* (9), 1472–1479.
- (136) Cai, W.; Chen, K.; He, L.; Cao, Q.; Koong, A.; Chen, X. Quantitative PET of EGFR Expression in Xenograft-Bearing Mice Using  $^{64}\text{Cu}$ -Labeled Cetuximab, a Chimeric Anti-EGFR Monoclonal Antibody. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, *34* (6), 850–858.
- (137) 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  $^{64}\text{Cu}$ -Cetuximab-F(Ab')<sub>2</sub> in Mice with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Xenografts. *Contrast Media Mol. Imaging* **2016**, *11* (1), 65–70.
- (138) Striese, F.; Sihver, W.; Gao, F.; Bergmann, R.; Walther, M.; Pietzsch, J.; Steinbach, J.; Pietzsch, H.-J. Exploring Pitfalls of  $^{64}\text{Cu}$ -Labeled EGFR-Targeting Peptide GE11 as a Potential PET Tracer. *Amino Acids* **2018**, *50* (10), 1415–1431.
- (139) 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.  $^{64}\text{Cu}$ -Labeled Repebody Molecules for Imaging of Epidermal Growth Factor Receptor-Expressing Tumors. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (2), 340–346.
- (140) Dimopoulos, M. A.; Oriol, A.; Nahi, H.; San-Miguel, J.; Bahlis, N. J.; Usmani, S. Z.; Rabin, N.; Orłowski, R. Z.; Komarnicki, M.; Suzuki, K.; et al. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375* (14), 1319–1331.

- (141) 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.
- (142) 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.
- (143) 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.
- (144) 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.
- (145) Patel, Y. C. Somatostatin and Its Receptor Family. *Front. Neuroendocrinol.* **1999**, *20* (3), 157–198.
- (146) Hanaoka, H.; Tominaga, H.; Yamada, K.; Paudyal, P.; Iida, Y.; Watanabe, S.; Paudyal, B.; Higuchi, T.; Oriuchi, N.; Endo, K. Evaluation of <sup>64</sup>Cu-Labeled DOTA-D-Phe(1)-Tyr (3)-Octreotide (<sup>64</sup>Cu-DOTA-TOC) for Imaging Somatostatin Receptor-Expressing Tumors. *Ann. Nucl. Med.* **2009**, *23* (6), 559–567.
- (147) 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.
- (148) 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.
- (149) Gabriel, M.; Decristoforo, C.; Kendler, D.; Dobrozemsky, G.; Heute, D.; Uprimny, C.; Kovacs, P.; Guggenberger, E. V.; Bale, R.; Virgolini, I. J. <sup>68</sup>Ga-DOTA-Tyr3-Octreotide PET in Neuroendocrine Tumors: Comparison with Somatostatin Receptor Scintigraphy and CT. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48* (4), 508–518.
- (150) 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.
- (151) 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 <sup>111</sup>In-Labeled Somatostatin Analogues for Tumor Scintigraphy and Radionuclide Therapy. *Cancer Res.* **1998**, *58* (3), 437–441.
- (152) 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.
- (153) Pfeifer, A.; Knigge, U.; Binderup, T.; Mortensen, J.; Oturai, P.; Loft, A.; Berthelsen, A. K.; Langer, S. W.; Rasmussen, P.; Elema, D.; et al. <sup>64</sup>Cu-DOTATATE PET for Neuroendocrine Tumors: A Prospective Head-to-Head Comparison with <sup>111</sup>In-DTPA-Octreotide in 112 Patients. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56* (6), 847–854.
- (154) Hynes, R. O. Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in Cell Adhesion. *Cell* **1992**, *69* (1), 11–25.

- (155) Hood, J. D.; Cheresch, D. A. Role of Integrins in Cell Invasion and Migration. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2* (2), 91–100.
- (156) Zhang, Y.; Yang, Y.; Cai, W. Multimodality Imaging of Integrin  $\alpha\beta3$  Expression. *Theranostics* **2011**, *1*, 135–148.
- (157) 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.
- (158) 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.
- (159) 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.
- (160) Jin, H.; Varner, J. Integrins: Roles in Cancer Development and as Treatment Targets. *Br. J. Cancer* **2004**, *90* (3), 561–565.
- (161) 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  $^{18}\text{F}$ -Labeled Dimeric RGD Peptide. *Contrast Media Mol. Imaging* **2013**, *8* (3), 238–245.
- (162) Li, Z.; Cai, W.; Cao, Q.; Chen, K.; Wu, Z.; He, L.; Chen, X.  $^{64}\text{Cu}$ -Labeled Tetrameric and Octameric RGD Peptides for Small-Animal PET of Tumor  $\text{Av}\beta3$  Integrin Expression. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48* (7), 1162–1171.
- (163) Shi, J.; Kim, Y.-S.; Zhai, S.; Liu, Z.; Chen, X.; Liu, S. Improving Tumor Uptake and Pharmacokinetics of  $^{64}\text{Cu}$ -Labeled Cyclic RGD Peptide Dimers with Gly3 and PEG4 Linkers. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20* (4), 750–759.
- (164) 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.
- (165) Schwenck, J.; Rempp, H.; Reischl, G.; Kruck, S.; Stenzl, A.; Nikolaou, K.; Pfannenberger, C.; la Fougère, C. Comparison of  $^{68}\text{Ga}$ -Labelled PSMA-11 and  $^{11}\text{C}$ -Choline in the Detection of Prostate Cancer Metastases by PET/CT. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2017**, *44* (1), 92–101.
- (166) Calais, J.; Fendler, W. P.; Herrmann, K.; Eiber, M.; Ceci, F. Comparison of  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 and  $^{18}\text{F}$ -Fluciclovine PET/CT in a Case Series of 10 Patients with Prostate Cancer Recurrence. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (5), 789–794.
- (167) 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  $^{68}\text{Ga}$ -Labelled PSMA Ligand and  $^{18}\text{F}$ -Choline-Based PET/CT for the Diagnosis of Recurrent Prostate Cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2014**, *41* (1), 11–20.
- (168) 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  $^{111}\text{In}$ -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.

(169) Grubmüller, B.; Baum, R. P.; Capasso, E.; Singh, A.; Ahmadi, Y.; Knoll, P.; Floth, A.; Righi, S.; Zandieh, S.; Meleddu, C.; et al.  $^{64}\text{Cu}$ -PSMA-617 PET/CT Imaging of Prostate Adenocarcinoma: First In-Human Studies. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2016**, *31* (8), 277–286.

(170) Cantiello, F.; Gangemi, V.; Cascini, G. L.; Calabria, F.; Moschini, M.; Ferro, M.; Musi, G.; Butticè, 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.

(171) 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.

(172) 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.

(173) 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.

(174) 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.

(175) 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.

(176) 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.

(177) Palumbo, A.; Anderson, K. Multiple Myeloma. *N. Eng. J. Med.* **2011**, *364* (11), 1046–1060.

(178) Kuehl, W. M.; Bergsagel, P. L. Multiple Myeloma: Evolving Genetic Events and Host Interactions. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2* (3), 175–187.

(179) Kyle, R. A.; Rajkumar, S. V. Criteria for Diagnosis, Staging, Risk Stratification and Response Assessment of Multiple Myeloma. *Leukemia* **2009**, *23* (1), 3–9.

(180) Rajkumar, S. V.; Dimopoulos, M. A.; Palumbo, A.; Blade, J.; Merlini, G.; Mateos, M.-V.; Kumar, S.; Hillengass, J.; Kastritis, 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.

(181) Azaïs, I.; Debiais, F. Imagerie des lésions osseuses du myélome. *Revue du Rhumatisme Monographies* **2017**, *84* (2), 187–195.

- (182) Dimopoulos, M. A.; Hillengass, J.; Usmani, S.; Zamagni, E.; Lentzsch, S.; Davies, F. E.; Raje, 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.
- (183) Rajkumar, S. V. Multiple Myeloma: 2016 Update on Diagnosis, Risk-Stratification and Management. *Am. J. Hematol* **2016**, *91* (7), 719–734.
- (184) 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.
- (185) 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*.
- (186) 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.
- (187) 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.
- (188) 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 [<sup>18</sup>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.
- (189) 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.
- (190) 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.
- (191) 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.
- (192) 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.
- (193) 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.
- (194) 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. [<sup>68</sup>Ga]Pentixafor-PET/CT for Imaging of Chemokine Receptor CXCR4 Expression in Multiple Myeloma - Comparison to [<sup>18</sup>F]FDG and Laboratory Values. *Theranostics* **2017**, *7* (1), 205–212.

- (195) Sanderson, R. D.; Yang, Y. Syndecan-1: A Dynamic Regulator of the Myeloma Microenvironment. *Clin. Exp. Metastasis* **2008**, *25* (2), 149–159.
- (196) 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.
- (197) Heffner, L. T.; Jagannath, S.; Zimmerman, T. M.; Lee, K. P.; Rosenblatt, J.; Lonial, S.; Lutz, R. J.; Czeloth, N.; Osterroth, F.; Rühle, 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.
- (198) 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.
- (199) 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  $^{64}\text{CuCl}_2$  and  $^{18}\text{F}$ -FDG in a Preclinical Syngeneic Model of Multiple Myeloma. *Oncotarget* **2018**, *9* (10).
- (200) 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*.
- (201) Grant, R. S.; Coggan, S. E.; Smythe, G. A. The Physiological Action of Picolinic Acid in the Human Brain. *Int. J. Tryptophan. Res.* **2009**, *2*, 71–79.
- (202) Pálinkás, Z.; Roca-Sabio, A.; Mato-Iglesias, M.; Esteban-Gómez, D.; Platas-Iglesias, C.; de Blas, A.; Rodríguez-Blas, T.; Tóth, É. Stability, Water Exchange, and Anion Binding Studies on Lanthanide(III) Complexes with a Macrocyclic Ligand Based on 1,7-Diaza-12-Crown-4: Extremely Fast Water Exchange on the  $\text{Gd}^{3+}$  Complex. *Inorg. Chem.* **2009**, *48* (18), 8878–8889.
- (203) Ferreirós-Martínez, R.; Esteban-Gómez, D.; Tóth, É.; de Blas, A.; Platas-Iglesias, C.; Rodríguez-Blas, T. Macrocyclic Receptor Showing Extremely High  $\text{Sr(II)/Ca(II)}$  and  $\text{Pb(II)/Ca(II)}$  Selectivities with Potential Application in Chelation Treatment of Metal Intoxication. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (8), 3772–3784.
- (204) McLaren, F.; Moore, P.; Wynn, A. M. Rates and Mechanism of Co-Ordination of Labile Transition Metal Ions with Tri- and Tetra-Azamacrocycles Functionalised with a Single Pendant Co-Ordinating 2,2'-Bipyridyl-6-Yl-Methyl Arm: Evidence for Two-Stage Reactions with Initial Co-Ordination of the Pendant Bipyridyl Group. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, No. 12, 798–800.
- (205) 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  $\text{Cu-64}$  Phenotypic Imaging. In Vitro and in Vivo Stability Studies in Mice. *Nucl. Med. Biol.* **2014**, *41* Suppl, e49–57.
- (206) 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  $^{64}\text{Cu}$  PET Imaging. Bioconjugation to Antibody,

Radiolabeling and Preclinical Application in Xenografted Colorectal Cancer. *RSC Advances* **2017**, *7* (15), 9272–9283.

(207) Le Bihan, T.; Navarro, A.-S.; Le Bris, N.; Le Saec, P.; Gouard, S.; Haddad, F.; Gestin, J.-F.; Cherel, 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 (64)Cu-PET Imaging. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (23), 4261–4271.

(208) [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011758\\_Pierce\\_NHSActiv\\_Mag\\_Bead\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011758_Pierce_NHSActiv_Mag_Bead_UG.pdf)

(209) Kou, F.; Zhu, S.; Lin, H.; Chen, W.; Chen, Y.; Lin, M. Kinetics and Mechanism of the Acid Dissociation of Copper(II) Complex of Novel C-Functionalized Macrocyclic Dioxotetramines. *Polyhedron* **1997**, *16* (12), 2021–2028.

(210) 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.

(211) 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.

(212) Rogers, B. E.; Anderson, C. J.; Connett, J. M.; Guo, L. W.; Edwards, W. B.; Sherman, E. L. C.; Zinn, K. R.; Welch, M. J. Comparison of Four Bifunctional Chelates for Radiolabeling Monoclonal Antibodies with Copper Radioisotopes: Biodistribution and Metabolism. *Bioconj. Chem.* **1996**, *7* (4), 511–522.

(213) Dearling, J. L. J.; Voss, S. D.; Dunning, P.; Snay, E.; Fahey, F.; Smith, S. V.; Huston, J. S.; Meares, C. F.; Treves, S. T.; Packard, A. B. Imaging Cancer Using PET – the Effect of the Bifunctional Chelator on the Biodistribution of a 64Cu-Labeled Antibody. *Nucl. Med. Biol.* **2011**, *38* (1), 29–38.

(214) Lewis, E. A.; Allan, C. C.; Boyle, R. W.; Archibald, S. J. Efficient N- and C-Functionalisation of Cyclam Macrocycles Utilising Bisaminal Methodology. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45* (15), 3059–3062.

(215) Hermanto, S.; Haryuni, R. D.; Ramli, M.; Mutalib, A.; Hudiyono, S. Synthesis and Stability Test of Radioimmunoconjugate 177Lu-DOTA-F(Ab')<sub>2</sub>-Trastuzumab for Theranostic Agent of HER2 Positive Breast Cancer. *J. Rad. Res. App. Sci.* **2016**, *9* (4), 441–448.

(216) Wojdowska, W.; Karczmarczyk, U.; Maurin, M.; Garnuszek, P.; Mikołajczak, R. Standardization of Procedures for the Preparation of (177)Lu- and (90)Y-Labeled DOTA-Rituximab Based on the Freeze-Dried Kit Formulation. *Curr. Radiopharm.* **2015**, *8* (1), 62–68.

(217) Radl, J. The C57BL/KaLwRij Mouse Model of B-Cell Proliferative Disorders. Is There a Relationship Between Benign Monoclonal Gammopathy and Multiple Myeloma? *Epidemiology and Biology of Multiple Myeloma*, **1991**, pp 161–165.

(218) Stanford, K. I.; Bishop, J. R.; Foley, E. M.; Gonzales, J. C.; Niesman, I. R.; Witztum, J. L.; Esko, J. D. Syndecan-1 Is the Primary Heparan Sulfate Proteoglycan Mediating Hepatic Clearance of Triglyceride-Rich Lipoproteins in Mice. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119* (11), 3236–3245.

(219) Westerlund, K.; Honarvar, H.; Norrström, E.; Strand, J.; Mitran, B.; Orlova, A.; Eriksson Karlström, A.; Tolmachev, V. Increasing the Net Negative Charge by Replacement of DOTA Chelator with DOTAGA Improves the Biodistribution of Radiolabeled Second-Generation Synthetic Affibody Molecules. *Mol. Pharmaceutics* **2016**, *13* (5), 1668–1678.

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

**Mots clés :** cuivre-64, imagerie phénotypique, ligand bifonctionnel, TEP, myélome multiple

Résumé : La théranostique est une approche innovante reposant sur la combinaison de la thérapie et des outils diagnostiques afin d'adapter au mieux le traitement à chaque patient. En oncologie, elle permet de tenir compte des particularités des tumeurs, notamment de leur expression phénotypique. Dans ce domaine, les techniques d'imagerie telle la tomographie par émission de positons (TEP) et ses dérivés sont ainsi particulièrement intéressantes.

La première partie de ce mémoire expose les principes et intérêts de la TEP, de l'imagerie phénotypique et de l'immuno-TEP. Elle se concentre principalement sur l'un des isotopes utilisés, le cuivre-64, et décrit comment ses propriétés physiques et chimiques ainsi que

son métabolisme *in vivo* influencent l'élaboration de radiopharmaceutiques destinés à une application en imagerie.

La deuxième partie détaille une étude *in vitro* d'un nouveau ligand du cuivre, le TE1PA, dans un modèle d'anticorps monoclonal, le 9E7.4. Le TE1PA est comparé à plusieurs ligands commerciaux utilisés pour l'imagerie au  $^{64}\text{Cu}$ .

La troisième partie décrit les résultats d'une étude comparative entre le TE1PA et deux ligands commerciaux, le NOTA et le DOTA, dans un modèle murin de greffe syngénique de myélome multiple. Elle met ainsi en avant les qualités du TE1PA pour l'imagerie au  $^{64}\text{Cu}$ , notamment sa meilleure stabilité *in vivo* par rapport aux ligands actuellement disponibles.

**Title:** Developing new radiopharmaceutics using copper-64 for theranostic applications in oncology.

**Keywords:** copper-64, phenotypic imaging, bifunctional chelating agent, PET, multiple myeloma

**Abstract:** Theranostic is a new, innovative approach combining therapy and diagnosis to adjust more precisely treatment for each patient. It is notably useful in oncology, allowing to take into account tumor's specificities, like their phenotypic expression. In this field, imaging technics like positron emission tomography (PET) and its derivatives are especially interesting for theranostic approach.

The first part of this thesis exposes principles and usefulness of PET, phenotypic imaging and immune-PET. We focus on copper-64, one of the most used radionuclides in this context, and describe how its physical and chemical properties as well as its *in vivo*

metabolism impact the development of radiopharmaceutics for imaging.

In a second time, we report an *in vitro* study of a new bifunctional chelating agent (BCA) for copper, the TE1PA, using the 9E7.4 monoclonal antibody. TE1PA has been investigated in comparison with other BCA commercially available and used for  $^{64}\text{Cu}$  imaging.

Finally, the last part describes a comparative study between TE1PA and two commercial BCA (DOTA and NOTA), in a murine model of syngeneic multiple myeloma. The results confirm the usefulness of TE1PA for  $^{64}\text{Cu}$ , with an emphasis on its excellent stability *in vivo*.