

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2020

THESE 2020/TOU3/2013

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue par

Adrien CHASTEL

Né le 28 Novembre 1989 à Royan (17)

**Mise au point du radiomarquage au gallium-68 et validation
d'une trousse pour le ciblage du récepteur du Gastrin-
Releasing Peptide (GRP-R)**

Mardi 21 Avril 2020

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Clément MORGAT

JURY

Président :	Monsieur le Professeur Elif HINDIE
1 ^{er} assesseur :	Madame le Professeur Laurence BORDENAVE
2 ^{ème} assesseur :	Madame le Docteur Séverine BRILLOUET
3 ^{ème} assesseur :	Monsieur le Docteur Jérôme PARIS

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} janvier 2019

Professeurs Emérites

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
M. MOULIS C.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SIE P.	Hématologie

Professeurs des Universités

Hospitolo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANGAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A.	Biologie
Mme BAZIARD G.	Chimie pharmaceutique
Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E.	Pharmacologie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maitres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CESTAC P. (*)	Pharmacie Clinique	Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique	M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique	Mme BON C.	Biophysique
Mme SERONIE-VIVIEN S. (*)	Biochimie	M. BOUAJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
		Mme CABOU C.	Physiologie
		Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS C.	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		M. DELCOURT N.	Biochimie
		Mme DERAËVE C.	Chimie Thérapeutique
		Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
		Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F.	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
		Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
		Mme LEFEVRE L.	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MIREY G. (*)	Toxicologie
		Mme MONFERRAN S.	Biochimie
		M. OUCHON A.	Biochimie
		Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*)	Chimie Analytique
		M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
		Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires		Assistant Associé des Universités	
Mme LARGEAUD L.	Immunologie	Mme MARTINI H.	Physiologie
M. MOUMENI A.	Biochimie		
M. METSU D.	Pharmacologie		
Mme PALUDETTO M.N.	Chimie thérapeutique		
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique		
Mme SALABERT A.S.	Biophysique		

Remerciements

À mon jury de thèse :

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le Docteur Clément MORGAT. Merci de me suivre depuis tant d'années, pour ton soutien, ta patience, ton engagement et ton encouragement dans tous mes projets en allant du Master à la thèse de sciences, sans oublier ma thèse de pharmacie.

Professeur Elif HINDIE, je vous remercie de me faire l'honneur de présider cette thèse ainsi que d'avoir accepté de diriger ma thèse de sciences. Cela fait plusieurs années que vous me suivez et m'encouragez à m'épanouir dans mes études.

Professeur Laurence BORDENAVE, merci beaucoup d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et me faire l'honneur de juger mon travail. Merci aussi de votre accueil au sein du service de médecine nucléaire au fil de mes stages.

Docteur Severine BRILLOUET, merci beaucoup de vous libérer pour participer à ce jury de thèse. Votre expertise en radiopharmacie en oncologie apportera une grande valeur à cette soutenance.

Docteur Jérôme PARIS, merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury et permis de soutenir cette thèse.

À l'équipe de l'INICIA

Plus particulièrement au Professeur Jean René Cazalets : merci de m'accueillir au sein de votre laboratoire, me permettant ainsi de découvrir l'activité de recherche et enrichir considérablement mon parcours professionnel. Merci aussi à Laura CARDOIT Frédéric MASMEJEAN et Catherine SAVONA-BARON : ce fut un plaisir de travailler à vos côtés. Merci surtout à Delphine VIMONT, ton aide a été précieuse et indispensable à la réalisation des expériences pour cette thèse. Merci aussi de m'avoir fait découvrir de nombreux jeux de sociétés lorsque nous attendions pendant les temps d'incubation de nos cellules.

Aux services de médecine nucléaire du CHU Pellegrin et Haut-Lévêque :

Docteur Frédéric DEBORDEAUX, merci pour m'avoir fait découvrir la spécialité passionnante de la médecine nucléaire lors de ma préparation au concours de l'internat. Grâce à toi, j'ai su dès le début de mon internat que je souhaitais m'orienter vers cette discipline.

À l'équipe de pharmaciens : Docteur Julie MIGUEL, Docteur Valérie POTTIER et Docteur Joachim MAZERE. Merci de m'avoir accompagné lors de mes stages et m'avoir appris tant de choses. Mes stages effectués avec vous resteront les plus marquants de mon internat.

Merci également aux médecins, Docteur Henri DE-CLERMONT-GALLERAN, Docteur Nicolas BALAMOUTOFF et Docteur Antoine DENIS, pour votre aide et votre écoute. Vous avez toujours été disponibles en cas de besoin.

Merci aussi au reste de l'équipe :

- Les manipulateurs radio : Elsa, Sandrine, Joëlle et Solène – merci de votre bonne disponibilité et bonne humeur au quotidien. Merci aussi à Djamel (j'attends ton record au semi-marathon en moins de 1h40. Je te souhaite aussi bonne continuation loin là-bas, dans le Sud-Est), Anthony et Pierre (merci pour les fous rires, notamment lors des batailles avec Thierry à coup de seringues d'eau ou lors des blocages des casiers).

- Florence et Éric : les AS de choc, toujours prêts à me sortir de ma galère quand je cherche quelque chose.

- Merci également aux ARC Caroline et Sandrine ainsi que les secrétaires Maëlys et Véronique.

À mes amis et ma famille :

À mes grands-parents, l'éloignement géographique n'entrave en rien mes pensées et mon amour pour vous. Papi et Mamie Vert, votre encouragement et votre soutien au cours de mes études n'aura jamais faibli, malgré leur durée considérable. J'ai une pensée particulière pour Mamie Chichoune Papi Chichoune qui m'a toujours incité à poursuivre mes études à Sepmes et non pas à Bordeaux, ce qui aurait considérablement changé le cours de ma vie (si tu pouvais être là aujourd'hui, tu serais fier de ton Jules). Papi Cannelle, tu as toujours été fier que je fasse des études de pharmacie, les voilà terminées.

Maman, je n'oublierai pas la partie de tarot (cette arnaque !) qui a déterminé mon futur. Tu as été d'une patience et d'un dévouement incroyable pour me faire réviser et pour relire mes écrits. Papa, merci de me changer les idées, j'espère continuer encore longtemps les compétitions avec toi (semi-marathon et bike and run – bientôt l'Ironman ?). Garance, je n'aurai pas réussi le pari de terminer mes études avant que tu ne commences les tiennes. Je suis heureux que tu aies trouvé ta voie et que tu t'épanouisses dans ta discipline.

À la bande du lycée : Emeric (Senen), Dimitri (Heruringa), Nicolas (Dren), Etienne (Rorix), Pierre (Demi Goth)... merci pour tous ces moments partagés autour de parties de jeux de rôle, jeux de société, jeux vidéo, parties de Go... Sans oublier nos nuits blanches à la petite maison.

Aux copains de la fac : Jules, Ben, Quentin, Aurore... sans qui les années fac auraient été très insipides. Merci pour ces moments passés aux assos, aux WEIs, aux Crits... Au final, les Poneys du Capocalypse ne seront jamais allés à l'Hippocup ensemble.

À ceux que j'ai rencontrés lors de mon internat : Nicolas et Solène, Thibault et Marine, Florent, Cécile, Sacha... Merci pour tous ces moments passés ensemble, plus particulièrement lors du tour de France avec l'AIAIPB. Même si je suis le dernier à être docteur, je le serai deux fois plus ! Je vous attends avec Poutine et rhum arrangé pour fêter les deux doctorats.

Pour terminer, Marie-Caroline, ma compagne de tous les jours, à mes côtés lorsque ça va bien, mais également moins bien. Tu arrives toujours à me tirer vers le haut, et sans toi je n'y serai pas arrivé. Je suis heureux de faire ma vie avec toi et Victor en est le plus beau témoin.

J'ai également une pensée pour Philippe Fernandez, qui nous a quittés bien trop tôt.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	9
TABLE DES FIGURES	10
TABLE DES TABLEAUX	12
PREAMBULE	13

I. INTRODUCTION.....15

A. Le médicament radiopharmaceutique utilisable en imagerie TEP.....	15
1. Cadre réglementaire.....	15
2. Structure des médicaments radiopharmaceutiques	15
3. Structure des MRP radiomarqués par méthode indirecte	16
B. Radioéléments.....	17
1. Radioéléments employés en TEP	17
2. Isotopes du gallium	18
3. Gallium-68	19
4. Chimie du Gallium	22
C. Chélates bifonctionnels.....	23
1. Généralités	23
2. Chélates macrocycliques	23
3. Exemple de chélateur acyclique : HBED	24
D. Espaceurs.....	25
E. Vecteurs	25
F. Les cibles des médicaments radiopharmaceutiques	26
1. Généralités	26
2. Les récepteurs de la famille de la bombésine	27
3. Le GRP-R	28
G. Radiopharmaceutiques ciblant le GRP-R	30
1. Généralités	30
2. Historique	30
3. Le RM2.....	31
H. Objectif de ce travail de thèse.....	35

II. MATERIELS ET METHODES.....36

A. Trousse RM2.....	36
B. Étude de la péremption de la trousse de RM2.....	36
C. Étude du [⁶⁸Ga]Ga-RM2	37
1. Optimisation des conditions de radiomarquage au ⁶⁸ Ga	37
2. Validation des conditions de radiomarquage et contrôles de qualités	38
3. Évaluation in vitro	40
4. Évaluation des coûts.....	41
D. Analyse statistique.....	41

III. RESULTATS....	42
A. Étude de la stabilité de la trousse RM2	42
B. Optimisation des conditions de radiomarquage	44
C. Validation des conditions de radiomarquage	46
D. Étude de la stabilité du [⁶⁸ Ga]Ga-RM2.....	47
1. Évaluation in vitro	47
2. Résumé.....	49
E. Étude pharmaco-économique	49
1. Détermination des postes de dépense.....	49
2. Temps d'une synthèse.....	52
IV. DISCUSSION.....	53
V. CONCLUSION.....	59
REFERENCES.....	60

Liste des abréviations

[¹⁸F]FDG : FluoroDésoxyGlucose

¹¹¹In : Indium-111

¹⁷⁷Lu : Lutetium-177

¹⁸F : Fluor-18

⁶⁸Ga : Gallium-68

⁶⁸Ge : Germanium-68

⁹⁹Mo : Molybdène-99

^{99m}Tc : Technetium-99 métastable

AMM : Autorisation de mise sur le marché

BN : Bombésine

Ca²⁺ : Ion calcium

CCM : Chromatographie sur couche mince

CHU : Centre hospitalier universitaire

CIN : Néoplasie cervicale intra épithéliale

CLCC : Centre de lutte contre le cancer

DOTA : Acide 1, 4, 7, 10-tétraazacyclododécane – 1, 4, 7, 10-tétraacétique

DTPA : Acide Diéthylène Triamine Penta Acétique

EDTA : Éthylène Diamine Tétra Acétique

GRP : Gastrin Releasing peptide

GRP-R : Gastrin Releasing peptide receptor

HBED : Acide N, N'-di(2-hydroxybenzyl)-éthylènediamine-N, N'-diacétique

HCL : Acide Chlorhydrique

HPLC-UV : Chromatographie Liquide Haute Performance – UltraViolets

IRM : Imagerie par résonance magnétique

ITLC-SG : Instant Thin Layer Chromatography - Silica Gel

Kd : Constante de dissociation à l'équilibre

LAL : Lysat d'amœbocytes de limules

LC-MS : Chromatographie liquide – Spectrométrie de masse

Mg²⁺ : Ion magnésium

MIBG : Métaiodobenzylguanidine

MRP : Médicament radiopharmaceutique

NaCl : Chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium ou Soude

^{Nat}Tb : Terbium naturel

NMBR : NeuroMedin B Receptor

NODAGA : Acide 1,4,7-triazacyclononane, 1-Acide glutérique-4,7-acétique

NOTA : Acide 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique

PBS : Phosphate Buffered Saline

Pharm. Eur. : Pharmacopée Européenne

PIN : Prostatic Intraepithelial Neoplasia

PSA : Prostate Specific Antigen

PSMA : Prostate Specific Membrane Antigen

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

RE : Récepteur aux œstrogènes

SCLC : Small Cell Lung Cancer

T_{1/2} : Demi-vie

TDM : Tomodensitométrie

TEP : Tomographie par émission de positons

THP-PSMA : Tri(hydroxypyridinone) Prostate Specific Membrane Antigen

Zn²⁺ : Ion Zinc

Table des Figures

Figure 1 : Illustration des différents modes de désintégration discutés dans ce document ..	16
Figure 2 : Radiomarquage par méthode indirecte (à gauche ; [⁶⁸ Ga]Ga-Édotrétotide) et directe (à droite ; [^{99m} Tc]Tc-Benzoyl mercaptoacétyltryglycine).....	16
Figure 3 : Schéma d'un MRP radiomarké par méthode indirecte	17
Figure 4 : Équation de la désintégration β ⁺	17
Figure 5 : Schématisation du phénomène d'annihilation	17
Figure 6 : Minerai de gallium	18
Figure 7 : Décroissance du ⁶⁸ Ga et de son élément père le ⁶⁸ Ge.....	19
Figure 8 : Générateur ⁶⁸ Ge/ ⁶⁸ Ga (GalliaPharm® à gauche et IRE® Galli Ad à droite).....	20
Figure 9 : Module Fast Lab R&D de Raytest.....	22
Figure 10 : Schéma du Ga (III) en fonction du pH	22
Figure 11 : Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane – 1,4,7,10-tétraacétique ou DOTA.....	23
Figure 12 : Acide 1,4,7-triazacyclononane – 1,4,7-triacétique ou NOTA.....	24
Figure 13 : Acide N, N'-di(2-hydroxybenzyl)-éthylènediamine-N, N'-diacétique ou HBED.....	25
Figure 14 : Schéma d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG).....	27
Figure 15 : GRP-R humain	28
Figure 16 : Autoradiographie in vitro du GRP-R sur des coupes en séries d'adénocarcinome de la prostate invasif (A-C), Prostatic Intraepithelial Neoplasia (PIN) de haut grade (D-F) et prostate normale (G-I). Le rectangles représentent les zones observées à plus fort grossissement, les étoiles en A correspondent à de l'adénocarcinome invasif, en D à du PIN de haut grade et en G à du tissus prostatique glandulaire normal. L'échelle indiquée en A, D et G correspond à 1mm.	28
Figure 17 : NeoBOMB1	31
Figure 18 : RM26.....	31
Figure 19 : RM2.....	32
Figure 20 : Image MicroPET/CT d'une xénogreffe PC3 sur des souris nues après injection de [⁶⁸ Ga]Ga-RM2 à 1h (a) et 1h avec blocage (b)	32
Figure 21 : Les images TEP du [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA11 et du [⁶⁸ Ga]Ga-RM2 ne montrent pas de captation tumorale du [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA11 et une captation localisée (flèche) au niveau des ganglions retro-péritonéaux de [⁶⁸ Ga]Ga-RM2 (A), et une captation localisée (flèche) de ganglions rétro-péritonéaux de [⁶⁸ Ga]Ga-PSM11 et pas de captation tumorale de [⁶⁸ Ga]Ga-RM2 (B).....	33
Figure 22 : TEP/TDM au [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-617 (A,B), au [⁶⁸ Ga]Ga-RM2 (C,D) et à la [¹⁸ F]F-Choline (E,F) et coupe histologique de biopsie de la prostate (G).....	34
Figure 23 : Trousse RM2	36
Figure 24 : Mise en œuvre du radiomarquage de la trousse RM2	37
Figure 25 : HPLC du kit RM2 à 220nm	42
Figure 26 : Stabilité du RM2 au cours du temps (HPLC)	42
Figure 27 : Spectrométrie de masse du RM2 à t=12mois.....	43
Figure 28 : Évolution des produits de différentes masses moléculaires en fonction du temps	43
Figure 29 : Différents pH étudiés pour le radiomarquage du [⁶⁸ Ga]Ga-RM2	44
Figure 30 : Évolution de la pureté radiochimique du [⁶⁸ Ga]Ga-RM2 en fonction des différents temps de chauffage utilisés	44
Figure 31 : Différents volumes réactionnels utilisés pour le radiomarquage du [⁶⁸ Ga]Ga-RM2	45
Figure 32 : Pureté radiochimique du [⁶⁸ Ga]Ga-RM2 en CCM et HPLC au cours du temps	47
Figure 33 : Affinité du [⁶⁸ Ga]Ga-RM2 pour le GRP-R sur la lignée PC3	48

Figure 34 : Fractions du [⁶⁸ Ga]Ga-RM2 liée au GRP-R sur la lignée PC3	48
Figure 35 : Efflux du [⁶⁸ Ga]Ga-RM2 in vitro (lignée PC3)	49
Figure 36 : Proposition de structure de l'impureté de 1621 Da détectée par LC-MS.....	54

Table des Tableaux

Tableau 1 : Médicaments radiopharmaceutiques ayant l'AMM en France pour la TEP	14
Tableau 2 : Radioéléments candidats pour le radiomarquage d'un radiotraceur en TEP	18
Tableau 3 : Affinités des peptides endogènes pour les différents sous-types de récepteur à la bombésine (Le peptide endogène pour BB3 n'est pas connu à ce jour.)	27
Tableau 4 : Comparaison du RM2, RM26 et NeoBOMB1 marqués à l'indium (lignées cellulaires et xénogreffes PC3).....	34
Tableau 5 : Certificat d'analyse du générateur $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ GalliAd®	37
Tableau 6 : Résumé des spécifications des contrôles qualités du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$	39
Tableau 7 : Résultats des contrôles qualité (CQ) des lots de validation de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$	46
Tableau 8 : Comparaison de la synthèse du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ en module ou à partir d'une trousse	47
Tableau 9 : Étude du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ sur la lignée cellulaire PC3	49
Tableau 10 : Coût par synthèse (module et trousse RM2)	51
Tableau 11 : Comparaison de l'étude du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ sur la lignée cellulaire PC3 aux études cellulaires du RM2 radiomarqué dans la littérature	57

Préambule

La médecine nucléaire est la discipline médicale, créée dans les années 80, qui regroupe l'ensemble des utilisations de radio-isotopes chez l'Homme, sous forme de sources non scellées dans un but diagnostique et/ou thérapeutique. Elle est sollicitée dans le cadre d'un grand nombre de pathologies (cancers, infections, troubles endocriniens...). En 2011, la Société Française de Médecine Nucléaire¹ a dénombré en France, 219 unités de médecine nucléaire représentant un parc d'imagerie d'environ 450 caméras TEMP (tomographie par émission monophotonique ou scintigraphie) et 105 caméras TEP (tomographie par émission de positon). On compte actuellement 129 radiopharmaciens (Janvier 2018, Ordre National des Pharmaciens) et 788 médecins nucléaires (Janvier 2020, Ordre National des Médecins) en France métropolitaine.

L'émergence de la médecine nucléaire est liée à la découverte de la radioactivité artificielle par Frédéric Joliot et Irène Curie en 1934. Dès les années 50, l'iode 131 est le premier radioélément approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) aux États Unis. Il deviendra un isotope radioactif majeur lorsqu'une technique pour capter les rayonnements gamma émis et les convertir en images s'est développée. Elle fut employée pour la première fois en 1951, permettant l'obtention d'une première image de la thyroïde chez l'Homme.

Les médicaments employés en médecine nucléaire ont le statut de médicaments radiopharmaceutiques (MRP). Un MRP est soit un atome radioactif ayant un tropisme physiologique pour un organe ou une fonction précise (Ex : isotopes de l'iode pour la thyroïde, comme l'iode-123 ou iode-131), soit constitué d'un radioélément lié à une molécule dite « vectrice » (molécules organiques, anticorps, cellules sanguines, ...) dont le but est de permettre au radioélément d'atteindre une cible choisie. Ce sont soit des spécialités pharmaceutiques livrées prêtes à l'emploi, soit des préparations extemporanées réalisées in situ à partir de trousse et de générateurs.

Le choix du radioélément administré (par voie intraveineuse le plus souvent) dépendra de l'objectif de l'examen réalisé. On emploiera soit des gamma-caméras (γ -caméras) qui captent des photons dans le cadre de la scintigraphie, soit des caméras TEP, apparues dans les années 80, détectant les photons d'annihilation issus de la désintégration bêta plus (β^+). Ces techniques d'imagerie non invasives permettent notamment une étude fonctionnelle ou métabolique des organes, tissus ou cellules. On parle alors d'imagerie fonctionnelle ou métabolique. Aujourd'hui, les radioéléments les plus utilisés en TEMP sont le technétium-99 métastable (^{99m}Tc) et l'iode 123 (^{123}I), et ceux employés en TEP sont le fluor-18 (^{18}F) et le gallium-68 (^{68}Ga). La TEP est en général une technique avec une meilleure sensibilité, une meilleure résolution que la TEMP et la possibilité de quantifier du signal. C'est pourquoi l'utilisation clinique de la TEMP en cancérologie a diminué ces dernières années au profit de la TEP.

Le Plan Cancer, mis en place par Jacques Chirac à partir de 2000, a permis le développement des TEP entre 2003 et 2007 en France. Ce plan avait pour but d'« offrir l'accès le plus large à l'innovation diagnostique et thérapeutique », et la mesure 44 précise la mise en place d'une TEP pour 1 million d'habitants dont au moins une par centre de lutte contre le cancer (CLCC) et par centre hospitalo-universitaire (CHU).

Durant la dernière décennie, la TEP couplée à la tomodensitométrie (TEP/TDM) ou plus récemment à l'imagerie par résonance magnétique (TEP/IRM) est devenue un examen d'imagerie largement pratiqué en oncologie. L'objectif de l'imagerie nucléaire en oncologie

est de caractériser l'agressivité et le développement de la maladie chez les patients atteints de cancers afin de mettre en place, le plus tôt possible, le traitement le plus adapté. Les nouvelles connaissances en oncologie permettent de mieux prendre en compte les caractéristiques biologiques des cellules cancéreuses et donc l'hétérogénéité de ces cancers. Ceci explique l'impact potentiel de cette imagerie moléculaire fonctionnelle dans la prise en charge thérapeutique des patients, qui sera de plus en plus personnalisée. Les perspectives en imagerie moléculaire sont notamment le développement de l'aptitude de nos caméras à mieux quantifier et localiser les MRP, et la mise au point de nouveaux vecteurs ciblant des marqueurs tumoraux.

Il existe aujourd'hui 7 MRP disposant d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour l'imagerie TEP en France (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Médicaments radiopharmaceutiques ayant l'AMM en France pour la TEP²

Médicament	Indication
[¹⁸ F]FDG	<ul style="list-style-type: none"> - Diagnostic, stadification, suivi de la réponse thérapeutique et détection des récurrences en oncologie - Localisation des foyers épileptogènes en neurologie - Évaluation de la sévérité d'une insuffisance cardiaque - Localisation de foyers infectieux et inflammatoires
[¹⁸ F]FNa	<ul style="list-style-type: none"> - Détection d'ostéogenèse anormale - Détection et localisation de métastases osseuses en oncologie - Aide au diagnostic étiologie de douleurs dorso-lombaires - Détection de lésions osseuses en cas de suspicion de maltraitance d'un enfant
[¹⁸ F]FCholine	<ul style="list-style-type: none"> - Détection des lésions osseuses métastatiques du cancer de la prostate chez les patients à haut risque - Localisation de lésions de carcinome hépatocellulaire
[¹⁸ F]FDOPA	<ul style="list-style-type: none"> - Diagnostic, stadification, suivi de la réponse thérapeutique et détection des récurrences en oncologie - Différenciation des tremblements essentiels des syndromes parkinsoniens liés à des maladies dégénératives affectant le système nigro-strié en neurologie
[¹⁸ F]Florbétaïr	<ul style="list-style-type: none"> - Diagnostic de la maladie d'Alzheimer par recherche de plaques séniles bêta-amyloïdes
[¹⁸ F]Florbétaben	<ul style="list-style-type: none"> - Diagnostic de la maladie d'Alzheimer par recherche de plaques séniles bêta-amyloïdes
[⁶⁸ Ga]Ga-Edotrétotide	<ul style="list-style-type: none"> - Détection, caractérisation et stadification de tumeurs neuroendocrines primitives ainsi que de leur récurrence - Complément de l'imagerie morphologique pour l'évaluation pré-thérapeutique d'un méningiome

Ce travail de thèse s'inscrit donc dans le développement de nouveaux médicaments radiopharmaceutiques utilisables en imagerie TEP oncologique. Nous avons choisi de nous concentrer sur les opportunités offertes par le ciblage d'un récepteur de neuropeptide : le récepteur du Gastrin-releasing Peptide (GRP-R).

I. Introduction

A. Le médicament radiopharmaceutique utilisable en imagerie TEP

1. Cadre réglementaire

Les médicaments radiopharmaceutiques sont définis dans le code de santé publique comme « tout médicament qui, lorsqu'il est prêt à l'emploi, contient un ou plusieurs isotopes radioactifs, dénommés radioéléments, incorporés à des fins médicales ». Leur utilisation est limitée à un couple de spécialités médicales : la médecine nucléaire et la radiopharmacie.

La directive du Conseil de l'Union Européenne n° 89/343 du 3 mai 1989 a fait entrer les radiopharmaceutiques dans le domaine du médicament en prévoyant des dispositions complémentaires pour les produits radiopharmaceutiques. Ces textes ont été transposés en France par la loi du 8 décembre 1992 qui a officialisé le statut des radiopharmaceutiques en tant que médicaments. Du fait de leur nature radioactive, les radiopharmaceutiques sont soumis à une double réglementation : celle des médicaments (notamment des substances vénéneuses) et celle des radioéléments, avec pour conséquence un double référentiel législatif, réglementaire et normatif, ainsi que des contraintes spécifiques à toutes les étapes de leur utilisation allant de leur fabrication à l'élimination des déchets.

La préparation et la dispensation des MRP sont des activités incontournables réalisées par la radiopharmacie. La radiopharmacie est une unité de production dépendant de la pharmacie à usage intérieur (PUI) mais fonctionnellement détachée au sein du service de médecine nucléaire. Il s'agit d'une activité optionnelle de PUI mais qui est obligatoire dans le cadre d'un service de médecine nucléaire. Les MRP sont des médicaments spécifiques dont la préparation et la dispensation sont réalisés par des radiopharmaciens (pharmaciens hospitaliers ayant validés le DESC de radiopharmacie). Ce sont soit des spécialités pharmaceutiques prêtes à l'emploi, soit des préparations réalisées à partir de trousse et de générateurs.

2. Structure des médicaments radiopharmaceutiques

Les MRP sont constitués d'un isotope radioactif (on parle de radioisotope ou de radioélément) qui peut être utilisé seul ou couplé à un vecteur (molécule, anticorps, hormone, peptide).

Un radioélément est un atome au noyau instable dont la désintégration libère de l'énergie. Cette énergie est émise sous forme de rayonnements (gamma) qui peuvent être détectés à l'aide de caméras pour établir des diagnostics in vivo. Il existe également des émissions particulières (alpha et bêta), non directement observables mais employées à visée diagnostique (bêta plus) ou thérapeutique (bêta moins et alpha) (**Figure 1**).

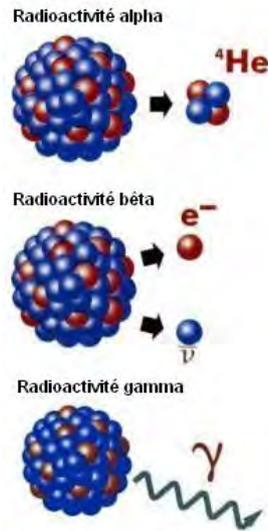


Figure 1 : Illustration des différents modes de désintégration discutés dans ce document

Utilisé seul, l'isotope radioactif doit avoir un tropisme naturel pour l'organe cible (exemple : l'iode pour la thyroïde). Dans le cas d'une association d'un radioélément à son vecteur (on parle alors de radiomarquage), le couplage de la molécule d'intérêt à un radioélément peut être envisagé suivant deux approches (**Figure 2**) : La méthode directe, permettant de fixer le radioélément directement au vecteur et la méthode indirecte utilisant un chélate capable de se lier au radioélément à une extrémité et à la molécule biologiquement active à l'autre (on parle alors de chélate bi-fonctionnel).

La méthode indirecte est principalement utilisée pour le marquage des macromolécules (peptides, protéines, anticorps...) qui permettent de cibler, entre autres, certains récepteurs surexprimés à la surface de cellules tumorales.

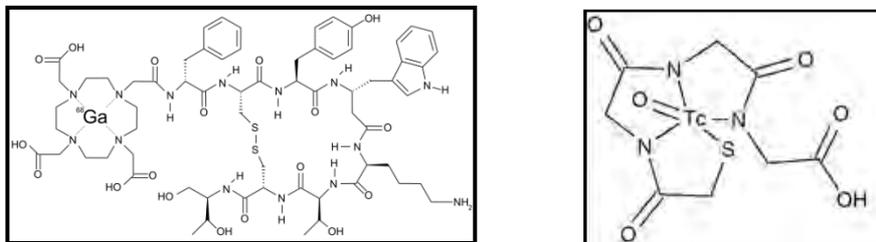


Figure 2 : Radiomarquage par méthode indirecte (à gauche ; [⁶⁸Ga]Ga-Édotrétotide) et directe (à droite ; [^{99m}Tc]Tc-Benzoyl mercaptoacétyltriglycine)

3. Structure des MRP radiomarqués par méthode indirecte

Dans le cas de la méthode indirecte, les radiotraceurs spécifiques sont généralement constitués de quatre parties (**Figure 3**) :

- un **radioélément** (ex : ⁶⁸Ga, ^{99m}Tc...), dont les propriétés physiques (période, nature et énergie des rayonnements émis...) doivent être adaptées aux besoins et dont la période physique doit être compatible avec la pharmacocinétique du vecteur, tout en minimisant l'exposition du patient aux énergies émises.

- un **chélateur** (ex : DOTA, NOTA...) qui est une molécule possédant à la fois un groupement fonctionnel permettant une liaison covalente stable avec une biomolécule et un site de coordination disponible pour un radioélément métallique.

- une **biomolécule d'intérêt** (ex : Prostate Specific Membrane Antigen ou PSMA...) permettant le ciblage spécifique d'un récepteur ou d'une structure surexprimée dans un tissu pathologique.

- un **groupement chimique espaceur** dit « Espaceur ». Son rôle est d'éviter un encombrement stérique de la part du chélateur qui empêcherait la liaison du radiotraceur à sa cible³.

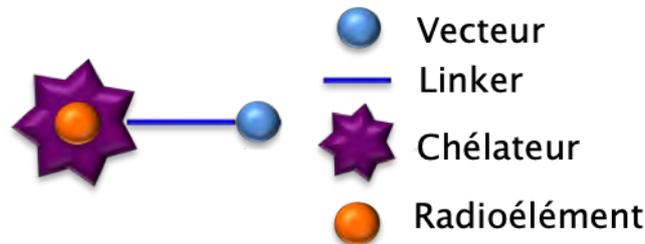


Figure 3 : Schéma d'un MRP radiomarqué par méthode indirecte

B. Radioéléments

1. Radioéléments employés en TEP

En imagerie TEP, les radioéléments utilisés sont émetteurs de positons. Ils ont une désintégration par émission béta+ (β^+) (**Figure 4**). L'instabilité du noyau père est due à un excès de protons dans le noyau. Il se désintègre alors vers un état plus stable par transformation d'un proton en neutron au sein de son noyau, conduisant à l'émission d'un positon et d'un neutrino. Il s'agit d'une transformation isobarique.

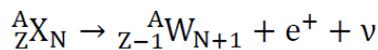


Figure 4 : Équation de la désintégration β^+

Ce positon, antiparticule de l'électron, est émis hors du noyau et effectue un parcours de l'ordre du millimètre au sein du milieu environnant. Dans le cas de l'imagerie TEP ce milieu est le corps du patient. Au cours de ce trajet, le positon perd au fur et à mesure son énergie cinétique, il peut alors interagir avec un électron libre et réaliser la réaction d'annihilation (**Figure 5**). La masse du couple particule/antiparticule se transforme alors en deux photons d'annihilation de 511keV chacun, émis dans des directions opposées.

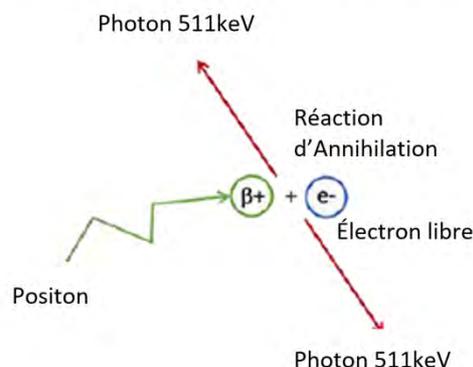


Figure 5 : Schématisation du phénomène d'annihilation

Les principaux radioéléments utilisables en TEP sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Radioéléments candidats pour le radiomarquage d'un radiotraceur en TEP

Radioéléments	Demi-vie physique	Rapport d'embranchement β^+ (%)	Production
Carbone-11	20,3min	99,8	Cyclotron
Azote-13	9,96 min	100	Cyclotron
Oxygène-15	2,05 min	99,9	Cyclotron
Fluor-18	110min	97	Cyclotron
Scandium-43	3,89 h	88,1	Cyclotron
Scandium-44	3,97 h	94,3	Générateur/Cyclotron
Cuivre-64	12,7 h	17,4	Cyclotron
Gallium-66	9,49 h	56,5	Cyclotron
Gallium-68	67,7min	88,9	Générateur/Cyclotron
Rubidium-82	76 s	95	Générateur
Yttrium-86	14,74 h	31,9	Cyclotron
Zirconium-89	3,3 jours	23	Cyclotron
Iode-124	4,17 jours	22	Cyclotron
Terbium-149	4,12 h	7,1	Cyclotron
Terbium-152	17,5 h	19,6	Cyclotron

Les radioéléments les plus utilisés à ce jour en médecine nucléaire TEP sont le fluor-18 (^{18}F) et le gallium-68 (^{68}Ga).

2. Isotopes du gallium

Le ^{69}Ga et le ^{71}Ga sont les deux isotopes stables du gallium et possèdent une abondance isotopique naturelle respective de 60,1% et 39,9% (Figure 6).



Figure 6 : Minerai de gallium

Il existe plusieurs isotopes radioactifs du gallium dont plusieurs sont à l'étude ou déjà utilisés en clinique :

Le ^{66}Ga ($T_{1/2} = 9,49$ h) est un émetteur β^+ . Sa décroissance se fait à 56,5% par désintégration β^+ et 43,5% par capture électronique. Bien que sa demi-vie soit suffisamment longue pour explorer des processus physiopathologiques relativement longs, il émet un positon de haute énergie ($> 4,15$ MeV) et un rayonnement gamma de haute énergie (> 4 MeV) qui limitent son intérêt pour le développement de radiopharmaceutiques au $^{66}\text{Ga}^4$.

Le ^{67}Ga ($T_{1/2} = 78,1 \text{ h}$) se désintègre par capture électronique en ^{67}Zn . Après cette capture, il émet des rayonnements détectable en TEMP (91,3 keV ; 185 keV ; 300 keV ; 394 keV). Cet isotope est notamment utilisé sous forme de citrate dans la détection de sites tumoraux primaires ou de métastases ainsi que dans la recherche de foyers infectieux.

Le ^{68}Ga ($T_{1/2} = 67,7 \text{ min}$) est employé en imagerie TEP. Sa décroissance se fait à 89% par désintégration β^+ , avec une émission de positon dont l'énergie maximale est de 1899 keV (qui par phénomène d'annihilation donnera deux photons de 511keV), occasionnellement accompagné par une émission d'un photon (1077 keV ; 3,22%)⁵.

Ainsi, le gallium-68 est le radioisotope du gallium le plus intéressant pour le développement de l'imagerie TEP grâce à son rapport d'embranchement β^+ proche des 90% ainsi qu'une bonne disponibilité grâce à des méthodes de production en générateur isotopique ou par cyclotron.

3. Gallium-68

a) Généralités

Le marquage d'une molécule d'intérêt par un radioélément peut être envisagé selon une méthode directe ou indirecte en utilisant un chélateur, comme expliqué précédemment.

Un des obstacles majeurs au développement et à l'utilisation des traceurs TEP pour des récepteurs peptidiques est la disponibilité limitée de radioéléments adaptés à l'imagerie TEP. L'avantage du ^{68}Ga est la possibilité de production par cyclotron ou par un générateur germanium-68/gallium-68 ($^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$) lui conférant une disponibilité croissante.

La demi-vie du ^{68}Ga (**Figure 7**) est également compatible avec les propriétés pharmacocinétiques de nombreux vecteurs auxquels il peut être associé, à savoir des molécules de faible poids moléculaire (peptides ou fragments d'anticorps) qui se distribuent rapidement. De plus, la chimie de coordination du $^{68}\text{Ga}^{3+}$ est simple et relativement bien connue, facilitant le radiomarquage. Enfin, les propriétés chimiques des éléments père et fils sont suffisamment différentes pour permettre leur séparation.

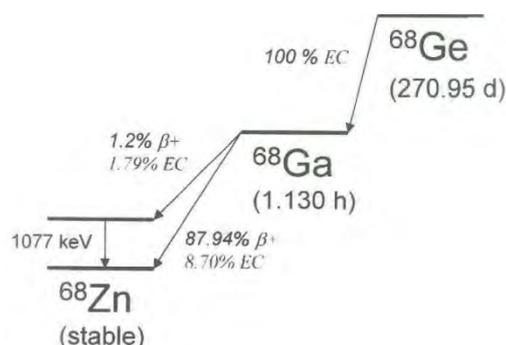


Figure 7 : Décroissance du ^{68}Ga et de son élément père le ^{68}Ge

Le germanium-68 peut être produits selon différentes réactions nucléaires, utilisant des particules chargées avec un accélérateur à particule ($^{69}\text{Ga}(p ; 2n)^{68}\text{Ge}$)⁶.

b) Production du ^{68}Ga

Comme nous l'avons mentionné plus haut, le gallium-68 peut être produit par cyclotron ou par générateur. Un générateur a l'avantage de permettre une excellente disponibilité du ^{68}Ga , à la demande et indépendamment de l'existence à proximité d'un cyclotron⁷. Par cyclotron, le bombardement de la cible enrichie de ^{68}Zn par des protons dans la gamme d'énergie de 11–14 MeV, produit du ^{68}Ga par la réaction nucléaire $^{68}\text{Zn}(p, n)^{68}\text{Ga}$. Le rendement est meilleur lorsque le ^{68}Zn est sous forme solide (vs liquide). Le meilleur résultat rapporté récemment a été un rendement de 194GBq de ^{68}Ga en irradiant une cible de ^{68}Zn solide déposée sur de l'argent pendant 120min avec un faisceau de protons ayant une énergie de 13MeV et une intensité de $80\mu\text{A}$ ⁸.

Les générateurs $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ actuellement sur le marché bien que plus simples à employer qu'un cyclotron présentent certains inconvénients notamment une disponibilité limitée avec un délai de 3 à 6mois pour obtenir un nouveau générateur, une activité limitée à 1850MBq aujourd'hui, un rendement d'élution de 60 à 80% selon le type de générateur et diminuant dans le temps, et enfin un coût important autour de 80 000€ / 100 000\$⁹.

Il est important de préciser qu'un générateur ayant une capacité deux fois plus importante a été développé (4,04 GBq soit 109 mCi), mais n'est pas encore disponible commercialement¹⁰.

La première AMM d'un générateur de ^{68}Ga , en France, a été octroyé en 2015 pour le générateur GalliaPharm® commercialisé par Eckert&Ziegler (**Figure 8**). Un deuxième générateur (IRE® Galli Ad) a également obtenu l'AMM depuis. Le générateur $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ pourrait avoir un impact clinique dans le diagnostic par TEP en médecine nucléaire autant que le générateur $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ l'a eu pour la SPECT si la disponibilité de vecteurs et trousse augmente significativement.



Figure 8 : Générateur $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (GalliaPharm® à gauche et IRE® Galli Ad à droite)

Par ailleurs, la demi-vie relativement longue de l'élément père ($T_{1/2} \text{ } ^{68}\text{Ge} = 270,9$ jours), permet au générateur d'être utilisé au sein d'un service de médecine nucléaire pendant une année. Par conséquent, son utilisation pluriquotidienne est possible, et ce à un coût raisonnable. L'avantage d'un générateur isotopique est qu'il permet, en outre, de s'affranchir de la nécessité d'avoir un cyclotron. En effet, ce système offre une flexibilité par rapport à la livraison de MRP fluorés par un cyclotron qui n'est pas nécessairement situé à proximité.

La période physique du ^{68}Ga (67,7 min) entraîne une irradiation limitée du patient pour une activité injectée compatible avec une bonne qualité des images TEP. Cette période

permet un délai entre le radiomarquage du vecteur et l'acquisition des images TEP. Cette période physique est suffisamment « longue » pour permettre le radiomarquage, le contrôle, l'injection et l'acquisition d'image TEP au ^{68}Ga . La mise à disposition au sein du service de médecine nucléaire d'un tel générateur couplé à un module de marquage, permet une certaine flexibilité vis-à-vis de l'organisation quotidienne du service.

Actuellement, le ^{68}Ge obtenu est adsorbé sur une résine constituée d'oxyde de titane, de dioxyde d'étain ou encore d'un composant organique¹¹. Une élution par une solution d'acide chlorhydrique (HCl) permet de recueillir le ^{68}Ga et fournit un éluât composé de ^{68}Ga sous forme ionique en solution aqueuse : le $^{68}\text{Ga}^{3+}$. Le ^{68}Ga se trouve à l'état d'oxydation +3 qui correspond à son état d'oxydation le plus stable en solution aqueuse à température ambiante. Son nombre de coordination de 6 permet une complexation aisée avec des ligands possédant un nombre de coordination de 4, 5 ou 6. En pratique, un tel générateur peut être élué toutes les 3,4 heures pour éluer une activité de ^{68}Ga quasi égale (90%) à celle du ^{68}Ge encore présent.

Dans l'état actuel de la réglementation française, seul un médicament radiopharmaceutique marqué au ^{68}Ga possède l'AMM (5 avril 2017) : le [^{68}Ga]Ga-édotrétotide (ou [^{68}Ga]Ga-DOTATOC, [^{68}Ga]Ga-SOMAKIT-TOC© et [^{68}Ga]Ga-IASOTOC©, pour le diagnostic de tumeurs neuroendocrines et des méningiomes). Les autres traceurs radiomarqués au ^{68}Ga ne peuvent être à ce jour utilisés que dans le cadre d'études de recherche clinique ou d'autorisations temporaires d'utilisation nominatives (comme le [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 pour l'imagerie de patients atteints de cancer de prostate en récurrence biochimique).

c) Automatisation de la procédure de radiomarquage

Les radiomarquages développés en recherche préclinique débutent souvent par une phase manuelle d'optimisation des conditions¹². Toutefois, pour améliorer la radioprotection du personnel et faciliter une transition vers l'utilisation clinique de routine, des modules de marquage automatiques ont été développés. Ceux-ci sont contrôlés par un logiciel qui permet de contrôler à distance une séquence d'opérations nécessaires au marquage¹³. En éliminant la variabilité inter-opérateur, ils permettent une plus grande reproductibilité des résultats, notamment au niveau des étapes critiques du marquage telles que l'élution du générateur ou les étapes de purification¹⁴. Ces automates sont composés d'une partie mécanique (les pompes, les sondes, les tubulures, etc.) et d'une partie gérant les produits chimiques (les gaz de poussée, les solvants, etc.). L'ensemble du petit matériel est fixe et réutilisable, les tubulures sont accessibles et modifiables à souhait. Les modules utilisés en recherche sont très modulables et les paramètres de séquence de marquage peuvent-être modifiés à volonté. Récemment, des modules à cassettes ont fait leur apparition sur le marché, ils s'emploient avec des cassettes à usage unique jetables contenant l'ensemble du matériel nécessaire au radiomarquage¹⁵. Un exemple de module avec cassettes jetables utilisable en recherche clinique est le Fast Lab R&D de Raytest (**Figure 9**).

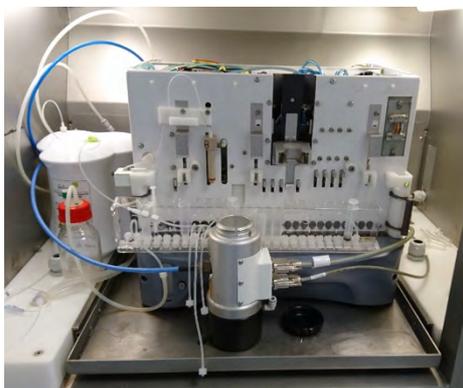


Figure 9 : Module Fast Lab R&D de Raytest

4. Chimie du Gallium

Le gallium ne peut pas être directement incorporé à un vecteur par liaison covalente, mais doit être complexé à un chélate en suivant les principes bien établis de la chimie de coordination.

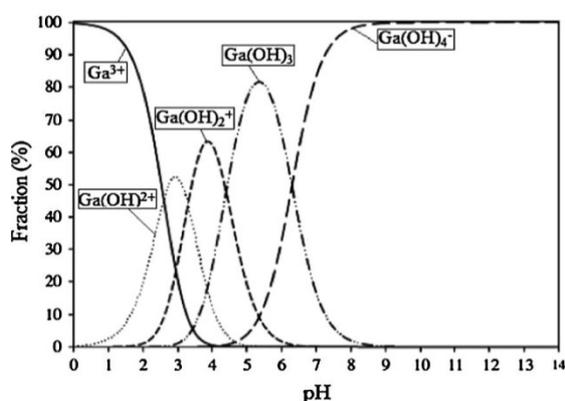


Figure 10 : Schéma du Ga (III) en fonction du pH¹⁶

En solution aqueuse, seul le degré d'oxydation (+III) est stable. Cependant, la forme ionique Ga^{3+} n'est stable qu'en milieu très acide ($\text{pH} < 3$). Aux pH de 3 à 7, le Ga s'hydrolyse sous forme d'hydroxydes de type $\text{Ga}(\text{OH})_3$ insolubles. En milieu basique, l'hydroxyde de Ga se solubilise formant l'ion gallate $\text{Ga}(\text{OH})_4^-$, rendant le gallium indisponible pour une éventuelle complexation par un ligand (**Figure 10**). La chimie de coordination du gallium présente beaucoup de similitudes avec celle du fer ce qui rend tous les composants métalliques des compétiteurs pour le radiomarquage au ^{68}Ga .

Le cation Ga^{3+} est considéré comme un acide dur de Lewis du fait de sa forte densité cationique et de son court rayon ionique (62pm), c'est donc un accepteur d'électrons. Il a une configuration électronique lui permettant d'accepter différents nombres de coordinations, majoritairement 6 et plus rarement 4 ou 5^{17,18}. Il va préférentiellement se coordonner avec des bases dures (espèces donneuses riches en électrons) telles que l'oxygène ou l'azote pour former des complexes stables^{19,20}.

C. Chélates bifonctionnels

1. Généralités

Afin de marquer une molécule d'intérêt au ^{68}Ga , elle doit être liée à un chélateur qui complexera le métal. Il s'agit donc de chélateurs dits bifonctionnels car se lient à la fois au métal et au vecteur. Le chélateur idéal doit donc avoir une complexation au radioélément rapide et stable, mais aussi être sélectif du ^{68}Ga afin de ne pas se complexer au zinc (nucléide fils stable). Il existe de nombreux chélateurs^{21,22} : DOTA, NOTA, NODAGA, HBED-CC, EDTA, DTPA... Le choix de l'un d'eux se fera selon la molécule d'intérêt, sensible ou non à certains paramètres du radiomarquage comme la température de marquage, le pH ou encore sa polarité.

L'objectif est la complexation du chélate au métal tout en restant lié à la molécule vectrice in vivo.

Les caractéristiques d'un chélateur idéal pour le développement d'un radiopharmaceutique à base de gallium sont :

- Une **liaison chélate-métal rapide**, non influencée par la liaison du chélateur à la molécule vectrice. Cette liaison se fait le plus efficacement avec des ligands possédant 6 valences, séquestrant le Ga^{3+} en utilisant son nombre de coordinations maximum ($n = 6$),
- Une **conservation des propriétés pharmacodynamiques in vivo** de la molécule vectrice une fois liée au chélateur,
- Une **stabilité cinétique in vivo** (en prenant en compte le pH sanguin et la présence d'autres cations dans le sérum tels que Ca^{2+} , Zn^{2+} et Mg^{2+}),
- Une **stabilité du complexe ^{68}Ga -chélate** supérieure à celle du complexe ^{68}Ga -transferrine afin d'éviter une transchélation (le fer et le gallium ayant un comportement chimique similaire, la plupart des molécules chélatrices du fer sont susceptibles de fixer également le gallium entraînant la liaison in vivo d'une partie du ^{68}Ga à la transferrine²³).

Il existe deux grandes classes de chélateurs bifonctionnels : les **macrocycliques** et les **acycliques**. En général, les complexes chélateurs acycliques sont moins inertes que les complexes macrocycliques pour une stabilité comparable²⁴.

2. Chélates macrocycliques

a) DOTA

Le DOTA (**Acide 1, 4, 7, 10-tétraazacyclododécane – 1, 4, 7, 10- tétraacétique**) est le plus commun des chélateurs du gallium⁷ (**Figure 11**).

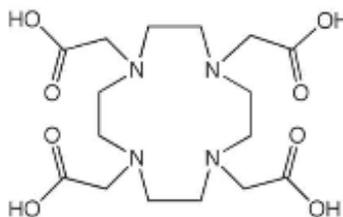


Figure 11 : Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane – 1,4,7,10-tétraacétique ou DOTA

Ses quatre fonctions carboxyles lui permettent une coordination de maximum 8 qui pourrait permettre la complexation de cations métalliques tels que l' In^{3+} ou le Lu^{3+} . Dans le cas du ^{68}Ga , le nombre de coordinations maximum est de 6 donc seuls deux bras carboxyles servent à la complexation, en plus du cycle N_4^{25} . L'un des groupements carboxyle du DOTA est souvent utilisé pour permettre la conjugaison au vecteur d'intérêt biologique.

Le DOTA a une stabilité moyenne avec le Ga, proche de celles du complexe Ga-transferrine ($\log(\beta)$ de 21,33 avec le Ga^{3+} et pGa de 15,3⁷).

Le DOTA possède une grande inertie cinétique, ceci implique une réaction de complexation lente. Les protocoles de radiomarquage intègrent un chauffage à environ 90°C pendant plusieurs minutes pour obtenir un rendement de marquage supérieur à 90%. Ceci limite donc son utilisation à des molécules thermorésistantes comme les peptides. Néanmoins, la possibilité d'incorporer des cations d'éléments possédant des radio-isotopes thérapeutiques est attractive pour des perspectives d'imagerie et de thérapie.

b) NOTA

Le NOTA (**Acide 1,4,7-triazacyclononane – 1,4,7-triacétique**) est un chélateur à 6 valences dont le cœur N_3O_3 procure une grande stabilité ($\log(\beta)$ de 30,98 et pGa de 26,4) de par la taille de son cycle plus adaptée au rayon ionique du Ga^{3+} par rapport au DOTA (**Figure 12**).

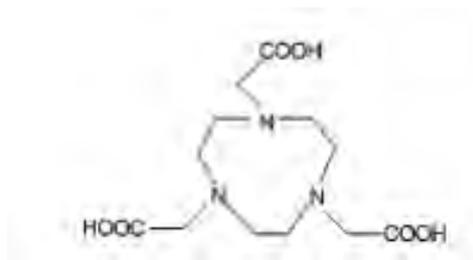


Figure 12 : Acide 1,4,7-triazacyclononane – 1,4,7-triacétique ou NOTA

Le NOTA engage ses trois bras carboxylates dans la complexation du Ga^{3+} et présente une charge neutre à pH physiologique. Si l'un de ses bras carboxylates est mobilisé pour créer une liaison directe à un vecteur, la stabilité du complexe est compromise car la coordination optimale de 6 du Ga^{3+} n'est plus possible. De plus, le complexe devient chargé positivement, ce qui peut modifier les propriétés biologiques du vecteur²⁶.

3. Exemple de chélateur acyclique : HBED

La complexation des chélateurs acycliques impose un changement drastique de leur géométrie pour que les atomes donneurs se coordonnent avec l'ion métallique. Pour la plupart ils ont une inertie cinétique plus faible que les chélateurs macrocycliques, ce qui les rend plus vulnérables à une démétallation in vivo. Mais cela se traduit également par une réaction de complexation souvent plus rapide et possible à température ambiante.

L'HBED (**Acide N, N'-di(2-hydroxybenzyl)-éthylènediamine-N, N'-diacétique**) est un dérivé voisin de l'EDTA (Acide éthylène diamine tétraacétique) qui a été décrit dans les années 60²⁷ (**Figure 13**).

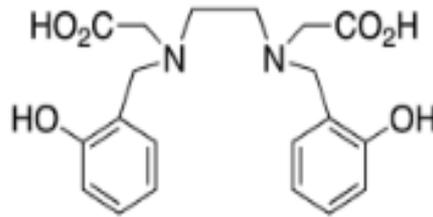


Figure 13 : Acide N, N'-di(2-hydroxybenzyl)-éthylènediamine-N, N'-diacétique ou HBED

Il a une forte affinité pour le Ga^{3+} avec un $\log(\beta)$ de 38,51 et un pGa de 28,6. Il est caractérisé par une réaction de complexation rapide avec le Ga^{3+} avec de très bons rendements et sa stabilité dans le sérum est comparable à celle du NOTA²⁸.

La réaction de complexation est rapide même à température ambiante, il est donc un chélateur particulièrement intéressant pour le radiomarquage de molécules thermolabiles. À titre d'exemple ce chélate est utilisé pour le radiomarquage du PSMA-11.

D. Espaceurs

Le rôle principal des espaceurs est d'éloigner le chélate de la partie de liaison à la cible²⁹. Néanmoins, les espaceurs peuvent avoir un impact significatif sur la biodistribution d'un radiotracer et son affinité pour sa cible³⁰. En effet, la présence d'acides aminés protonables à pH physiologiques peuvent modifier profondément le profil de distribution d'un radiopharmaceutique. Le choix des espaceurs doit donc être optimisé lors du développement de nouveaux radiopharmaceutiques.

E. Vecteurs

Les molécules vectrices peuvent être de différentes natures comme des : anticorps monoclonaux intacts, des fragments d'anticorps, des protéines, des acides aminés ou encore des oligonucléotides.

Un des écueils rencontrés avec des anticorps entiers est un temps de biodistribution trop important, rendant les radioéléments à demi-vie courte inadaptés pour l'imagerie TEP de ces molécules d'intérêt.

Pour contourner ce problème, une l'approche intéressante est celle par pré-ciblage³¹. Le principe repose sur le ciblage au préalable de la tumeur par un vecteur immunologique de taille importante. Ce vecteur est conçu de telle sorte qu'il puisse reconnaître également une petite molécule appelée haptène. Ainsi, une fois que l'anticorps injecté s'est distribué et a atteint sa cible, il ne reste plus qu'à administrer l'haptène, préalablement radiomarké, qui se liera rapidement au vecteur pré-localisé sur la tumeur afin de caractériser cette dernière. Cette stratégie nécessite une compliance importante du patient qui reçoit 2 injections. D'autres vecteurs, comme les peptides peuvent être utilisés pour simplifier cette procédure.

Les peptides sont des molécules de petite taille et de faible poids moléculaire, ayant donc une excellente perméabilité vasculaire. De plus, étant de structure similaire à celle des peptides endogènes, ils possèdent une faible immunogénicité, ce qui limite les risques de toxicité, d'effets secondaires et de réactions immunitaires. Par ailleurs, la clairance sanguine et tissulaire des peptides est rapide, ce qui permet d'atteindre d'excellents rapports de

captation tumeur/tissu non-cible. Les peptides sont en outre faciles à synthétiser et à modifier. Les peptides radiomarqués étant éliminés principalement par voie rénale (molécule hydrophile) ou hépatobiliaire (molécule lipophile), la voie d'excrétion peut être modifiée par l'introduction d'acide aminé à caractère plus ou moins hydrophile.

Le principal écueil des peptides réside dans leur dégradation rapide *in vivo* sous l'action de diverses protéases (endoprotéases et exoprotéases principalement). Il est donc nécessaire de modifier la séquence du ligand naturel pour le rendre plus résistant vis-à-vis de la dégradation enzymatique, tout en conservant une bonne affinité pour le(s) récepteur(s) ciblés. Une possibilité est par exemple la substitution de certains acides aminés par des acides aminés non naturels, conférant une plus grande stabilité au ligand³².

Ainsi, le radiopharmaceutique peptidique idéal doit donc être facile et rapide à marquer, stable et résistant vis-à-vis de la dégradation *in vivo*, et spécifique et sélectif de sa cible.

Actuellement, peu de médicaments radiopharmaceutiques peptidiques marqués au ⁶⁸Ga sont utilisés en clinique, mais ils sont aujourd'hui en plein développement. Notons l'utilisation à ce jour du [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-TOC, ciblant les récepteurs à la somatostatine dans le diagnostic des tumeurs neuroendocrines et le [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 pour le ciblage du PSMA dans le cancer de la prostate.

Dans le domaine de l'oncologie, d'autres traceurs sont en développement, ou au début de leur utilisation clinique, et explorent d'autres types de tumeurs. C'est le cas notamment du [⁶⁸Ga]Ga-RM2 dans le cancer du sein et de la prostate.

F. Les cibles des médicaments radiopharmaceutiques

1. Généralités

Différentes cibles peuvent être surexprimées par les cellules tumorales, leur identification est donc la clé pour soutenir le développement d'analogues radiomarqués³³⁻³⁵. Ces cibles peuvent appartenir à différentes familles. Une des familles de récepteurs transmembranaires la plus étudiée est celle des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Elle comprend un grand nombre de récepteurs, comme les récepteurs des neuropeptides bombésine, neurotensine ou encore somatostatine.

Les RCPG possèdent tous une structure de base identique avec 7 hélices alpha transmembranaires, 6 boucles intra et extracellulaires, 1 domaine N-terminal extracellulaire et 1 domaine C-terminal intracellulaire comme représenté sur la **Figure 14** ci-dessous.

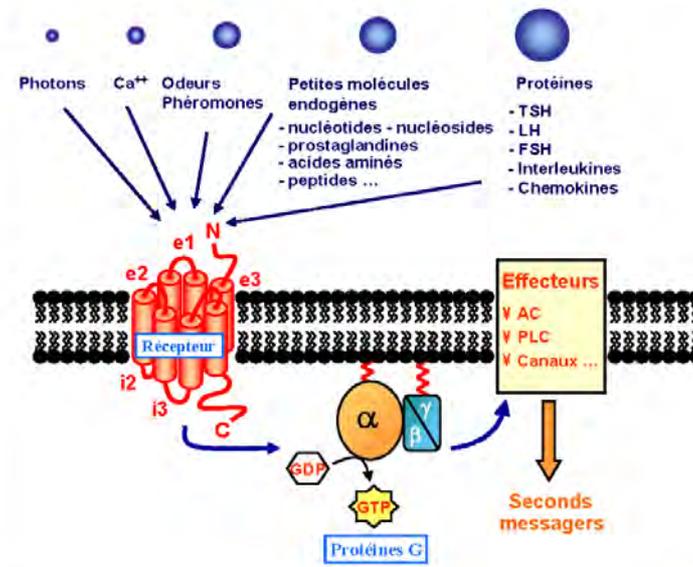


Figure 14 : Schéma d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG)

2. Les récepteurs de la famille de la bombésine

La bombésine (BN) est un peptide neuroendocrine de 14 acides aminés isolé en 1971 de la peau de la grenouille *Bombina Bombina*³⁶. L'homologue de la bombésine chez les mammifères a été isolé de l'estomac de porc et été nommé peptide libérant de la gastrine ou « gastrin-releasing peptide » (GRP) puisqu'il permet une libération abondante de la gastrine dans ce tissu³⁷. Un second peptide analogue de la bombésine, la neuromédine B (NMB), a été identifié en 1983 au niveau de la moelle épinière porcine³⁸.

Les récepteurs de la famille de la bombésine se divisent en quatre sous-types : BB1, BB2, BB3 et BB4³⁹.

Chez l'Homme 3 sous-types ont été découverts à ce jour :

- Le **récepteur de la neuromédine B (NMBR) ou BB1** humain est retrouvé au niveau de l'œsophage.
- Le **récepteur du « gastrin-releasing peptide » (GRP-R) ou BB2** humain est un récepteur de 384 acides aminés liant sélectivement le peptide de libération de la gastrine (GRP). L'expression du GRP-R dans l'organisme sain est élevée au niveau du pancréas, et plus modeste dans le tube digestif, l'œsophage et le rectum.
- Le **récepteur de type 3 humain de la bombésine (BB3)** est présent au niveau des poumons et des testicules.

Tableau 3 : Affinités des peptides endogènes pour les différents sous-types de récepteur à la bombésine⁴⁰ (Le peptide endogène pour BB3 n'est pas connu à ce jour.)

	NMBR	GRP-R
Bombésine	32 ± 3 nM	1,4 ± 0,2 nM
GRP	5080 ± 770 nM	6,2 ± 1,3 nM
Neuromédine B	8,1 ± 5,2 nM	437 ± 30 nM

En raison de l'intérêt croissant du GRP-R en oncologie un paragraphe spécifique est présenté ci-après.

3. Le GRP-R

Le GRP-R (**Figure 15**) est le récepteur de la bombésine le plus étudié car il possède la distribution somatique la plus vaste et semble impliqué dans la grande majorité des effets physiologiques du GRP et de la bombésine (souvent utilisée comme substitut du fait de sa structure quasi-identique à l'extrémité C-terminale du GRP humain). Le GRP peut être sécrété par les tumeurs elle-même et donc fonctionne, dans de nombreux cas, comme facteur de croissance autocrine⁴¹.

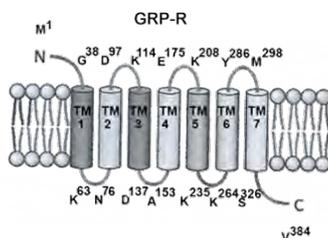


Figure 15 : GRP-R humain

Le GRP-R est particulièrement surexprimé dans les cancers de la prostate. Une des premières études d'autoradiographie a révélé que le GRP-R était retrouvé dans tous les types de cancer de la prostate, dès les stades précoces de la carcinogénèse, alors qu'il n'était pas détecté dans le tissu sain adjacent⁴². Par ailleurs, dans le cas du cancer de la prostate, l'expression du GRP-R a été associée à la transformation néoplasique⁴³, la migration cellulaire⁴⁴, la prolifération⁴⁵ ainsi qu'à la capacité d'invasion de ces cellules⁴⁶. L'étude de 530 échantillons de cancers de la prostate en immunohistochimie a confirmé l'absence ou la faible expression du GRP-R dans les tissus sains, tandis que son expression a été fortement retrouvée dans les carcinomes primaires et les métastases. De plus l'expression du GRP-R été inversement corrélée au score de Gleason, à la valeur de PSA, et la taille de la tumeur⁴⁷. Pour le cas particulier du cancer prostatique intra-épithélial, l'étude de 115 échantillons par autoradiographie (**Figure 16**) a retrouvé une surexpression du GRP-R présente dès les stades précoces de la maladie, augmentant au cours de la progression maligne, ce qui en fait un potentiel marqueur spécifique de transformation néoplasique de la prostate précoce⁴⁸.

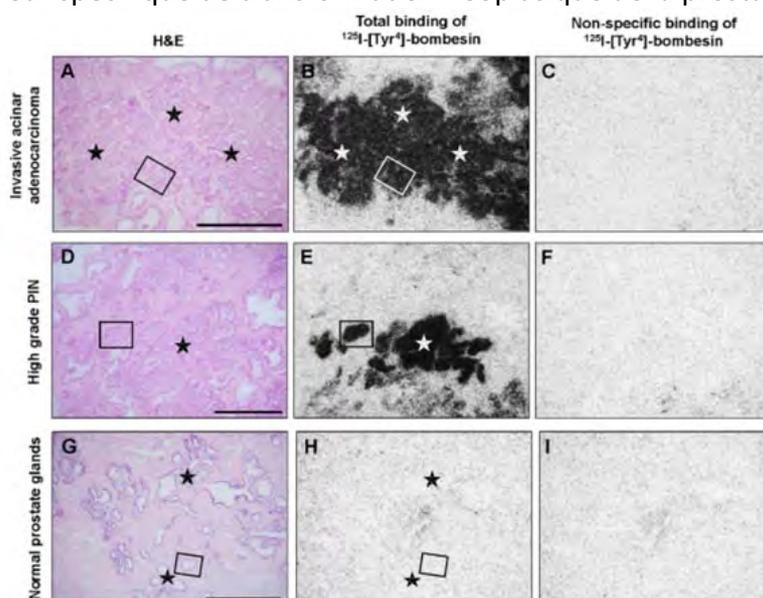


Figure 16 : Autoradiographie in vitro du GRP-R sur des coupes en séries d'adénocarcinome de la prostate invasif (A-C), Prostatic Intraepithelial Neoplasia (PIN) de haut grade (D-F) et prostate normale (G-I). Le rectangles représentent les zones observées à plus fort grossissement, les étoiles en A correspondent à de l'adénocarcinome invasif, en D à du PIN de haut grade et en G à du tissu prostatique glandulaire normal. L'échelle indiquée en A, D et G correspond à 1mm⁴⁸.

Des études ciblant le cancer du sein ont retrouvé une surexpression de GRP-R 63 à 68% des cas de carcinome canalaire invasif. Le GRP-R était également surexprimé dans 100% des métastases issues des carcinomes mammaires surexprimant le GRP-R^{49,50}. De plus, 96% des tumeurs (48/50) exprimaient le GRP-R et une très forte corrélation entre la positivité du récepteur aux œstrogènes (RE+) et l'expression du GRP-R a été retrouvée. Dans une étude plus récente réalisée par notre équipe⁵¹, l'analyse d'un tissu micro-array de 1432 tumeurs primitives du sein a révélée qu'environ 76% (1085/1432) des tumeurs primitives étudiées présentaient une surexpression du récepteur (expression modérée ou forte). La surexpression était par ailleurs très souvent associée à la positivité du récepteur aux œstrogènes (83% des tumeurs RE+ étaient GRP-R+). Dans cette même étude, 37 échantillons de ganglions métastatiques issus de tumeurs primitives GRP-R+ ont été étudiés en immunohistochimie : 95%(35/37) présentaient une surexpression de GRP-R. Par ailleurs, une étude menée chez sept patientes présentant un cancer du sein métastatique a retrouvé le GRP-R chez 4/7 tumeurs primitives et chez l'intégralité des métastases issues des tumeurs GRP-R+. Dans les deux cas (tumeur et métastase correspondante), la densité du récepteur était d'ordre comparable⁴⁹. Une autre étude évaluant l'imagerie par TEP au [⁶⁸Ga]Ga-RM2 (un antagoniste du GRP-R) chez 15 patientes a mis en évidence des métastases ganglionnaires (au niveau mammaire interne, n=8 et axillaire controlatéral, n=1) ainsi qu'une métastase osseuse⁵². Ainsi, un analogue radiomarqué ciblant le GRP-R pourrait avoir un intérêt thérapeutique d'autant plus grand qu'il cible les métastases des tumeurs primitives GRP-R positives.

Dans les cancers gynécologiques (ovaire et col de l'utérus), le GRP-R est surexprimé dans les tissus cancéreux alors que son expression est faible ou absente dans les tissus non néoplasiques et cellules saines. Une étude PCR de tumeurs ovariennes a retrouvé de l'ARNm du GRP-R dans 77% des échantillons (17/22) et l'expression du GRP-R a été confirmée par une étude d'affinité dans 73% des échantillons (8/11)⁵³. Dans le cancer du col de l'utérus, l'analyse immunohistochimique de frottis cervicaux a retrouvé la présence de GRP-R dans 85% (4/5) de lésions de néoplasie cervicale intra épithéliale de grade 1 (CIN I) 86%(13/15) des lésions CIN II-III et 100% (16/16) des échantillons de carcinomes invasifs, essentiellement dans les cellules dysplasiques mais également occasionnellement dans des cellules épithéliales normales⁵⁴.

Les cancers du poumon dits « à petites cellules » (small cell lung carcinoma SCLC) expriment à la fois le GRP et son récepteur le GRP-R activant une boucle autocrine qui augmente la prolifération et la survie des cellules tumorales. La positivité pour cette association ligand/récepteur est considérée comme un marqueur de l'agressivité tumoral de ces cancers⁵⁵⁻⁵⁷.

Dans le cancer du côlon, plusieurs études soutiennent également le rôle du GRP-R dans l'augmentation de la prolifération des cellules tumorales^{58,59}, et des transformations morphologiques menant à l'augmentation à la différenciation des cellules tumorales⁶⁰. Le GRP-R participe aussi à la stimulation de la motilité des cellules du cancer du côlon. Le GRP-R a été retrouvé dans approximativement 30% des lignées cellulaires de cancer du côlon aggressive⁵⁹, et dans 24 à 40%⁶⁰ des cancer du côlon par PCR. Une étude immunohistochimique d'adénocarcinomes du côlon de différents grades a retrouvé le GRP-R dans 76% d'entre elles (38/50)⁶¹. N'étant pas exprimé dans le côlon sain⁶², le GRP-R est donc une cible intéressante à visée diagnostique et thérapeutique dans le cadre du cancer du côlon.

G. Radiopharmaceutiques ciblant le GRP-R

1. Généralités

Depuis plusieurs années, des vecteurs peptidiques radiomarqués ciblant le GRP-R ont été développés pour des perspectives d'imagerie ou de thérapie. La majorité des développements de ces radiotraceurs a été réalisée dans des modèles de souris porteuses de cancers humains de la prostate surexprimant le récepteur humain GRP-R, comme la lignée cellulaire PC3⁶³⁻⁶⁵.

Initialement, certains traceurs marqués au ^{99m}Tc ou à l'¹¹¹In⁶⁶ sont parvenus jusqu'à des études cliniques, majoritairement pour l'imagerie scintigraphique du cancer de la prostate. Malgré une bonne tolérance par les patients, ils avaient une faible stabilité plasmatique et un faible marquage tumoral *in vivo*. Les développements plus récents se sont donc concentrés sur l'imagerie TEP et la radiothérapie interne vectorisée.

2. Historique

La première catégorie d'analogues de la bombésine qui a été explorée est celle des agonistes du GRP-R, compte tenu de leur capacité connue à être internalisés dans les cellules. Cette caractéristique était considérée au départ comme essentielle pour une rétention prolongée des isotopes métalliques dans la cellule cible et donc une condition préalable pour une bonne captation *in vivo*.

Le ⁶⁸Ga-AMBA est un puissant agoniste du GRP-R marqué au ⁶⁸Ga qui a été testé chez des patients atteints de différentes tumeurs malignes. Il a été bien toléré, avec seulement des effets indésirables mineurs et une absence de fixation significative dans d'autres organes non cibles, si ce n'est une captation pancréatique élevée due à la présence physiologique du GRP-R à la surface des cellules de cet organe, limitant potentiellement l'imagerie de la région intestinale^{67,68}. Par ailleurs le ⁶⁸Ga-AMBA avait une élimination rénale très rapide sans captation rénale spécifique et l'imagerie TEP a été positive chez un patient ayant un cancer de la prostate métastatique (ensuite traité par ¹⁷⁷Lu-AMBA) et faiblement positif chez un patient ayant un cancer thyroïdien médullaire (tissus résiduel).

L'avènement de nombreux nouveaux antagonistes du GRP-R, montrant des propriétés similaires sinon meilleures que les agonistes (dont l'absence d'effets secondaires et d'activité mitogène), a favorisé l'intérêt pour l'imagerie du GRP-R avec les antagonistes⁶⁹. Les antagonistes ont également l'avantage d'avoir une meilleure captation tumorale que les agonistes et l'absence d'effets indésirables gastro-intestinaux constatés avec les agonistes. Il est également préférable d'éviter l'activation le récepteur en raison de son rôle pro-oncogénique. De plus les antagonistes ont l'avantage de pouvoir se lier à un plus grand nombre de cibles pouvant se lier aux récepteurs actifs et inactifs⁷⁰. Parmi ceux développés initialement, le **NeoBOMB1 (D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly- His-NH-CH[CH₂-CH(CH₃)₂]₂**, **Figure 17**) semble prometteur dans une perspective de TEP ou de thérapie ciblée des cancers exprimant le GRP-R^{71,72}.

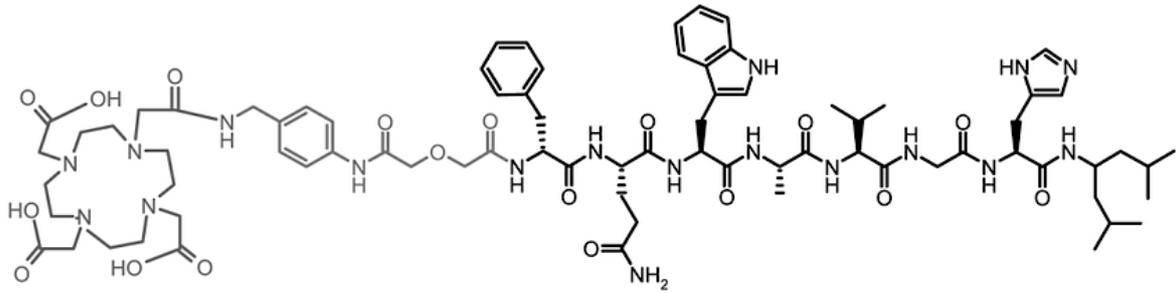


Figure 17 : NeoBOMB1

Un autre exemple d'antagoniste du GRP-R est le **RM26 (D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂, Figure 18)**, étudié en préclinique pour le cancer de la prostate et le cancer du sein⁷³. Il a ensuite été modifié par *Varasteh et al.* en introduisant un PEG. Des images TEP (3 h p.i.) ont été réalisées avec ce radiopharmaceutique, [⁶⁸Ga]Ga-RM26, chez des souris nude porteuses de xénotreffes d'un cancer du prostate (PC-3) montre une captation tumorale 4,6±0,6 %ID/g. Les tumeurs ont été clairement visualisées, mais une accumulation de la radioactivité a été détectée au niveau pancréatique (3,9±0,6 %ID/g) et rénal (1,7±0,2 %ID/g)⁷⁴. Une étude plus récente chez l'Homme a été réalisée sur 35 femmes suspectées d'avoir un cancer du sein, retrouvant une meilleure captation tumorale du [⁶⁸Ga]Ga-RM26 chez les patientes RE+ que les patientes RE-. Ils ont également retrouvé une influence du cycle menstruel avec une captation plus importante par le tissu mammaire sain en phase sécrétoire du fait de l'augmentation du taux d'œstrogènes circulants. Il faudra donc éviter de réaliser des examens d'imagerie lors de cette phase du fait d'un risque plus important de faux positif⁷⁵.

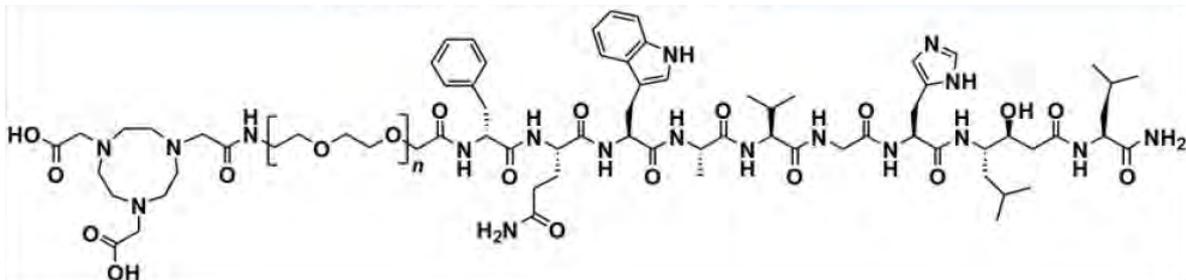


Figure 18 : RM26

3. Le RM2

Un des premiers vecteurs antagonistes ciblant le GRP-R est le **JMV594 (H-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂)**. L'ajout de la statine, d'un chélateur (DOTA) et d'un espaceur (4-amino-1-carboxyméthylpiperidine) au JMV594 a abouti à la création du RM2 (ou BAY86-7548) **Figure 19**. L'ajout de la statine a abouti à une excellente affinité et sélectivité pour le récepteur (IC₅₀ : 2,2±0,1nM pour le GRP-R ; >10 000nM pour NMBR)⁷⁶. Le choix du chélateur (DOTA) permet d'envisager l'utilisation de la molécule à des fins théranostiques car il permettrait son radiomarquage au ⁶⁸Ga mais également à l'¹¹¹In ou au ¹⁷⁷Lu. Enfin, l'espaceur a une charge positive qui augmente également l'affinité de l'ensemble pour le GRP-R⁷⁷.

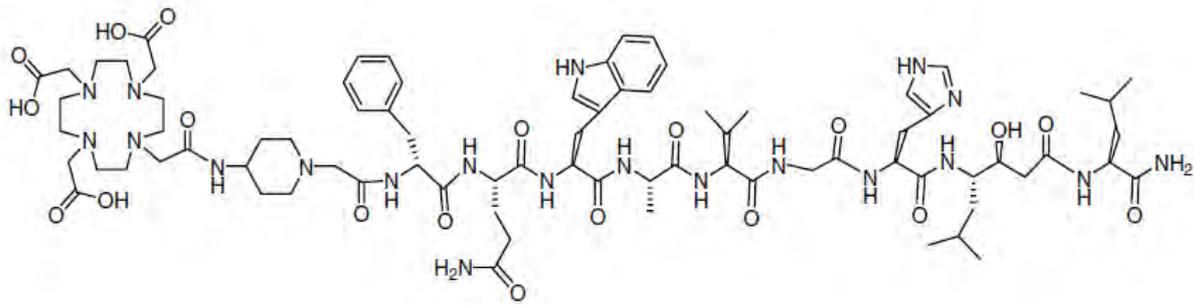


Figure 19 : RM2

Les études *in vitro* ont retrouvé une forte affinité du RM2 pour le GRP-R ($IC_{50} = 7,7 \pm 3,3$ nmol/l pour RM2 et $9,3 \pm 3,3$ nmol/l pour $[^{nat}In]In$ -RM2⁷⁷. La liaison membranaire aux cellules de la lignée PC3, de $[^{111}In]In$ -RM2 est $15,9 \pm 0,9\%$ et le taux d'internalisation de $3,7 \pm 0,4\%$ ⁷⁸. Quant au RM2 marqué au ^{177}Lu , sa liaison membranaire est de $15,7 \pm 1,2\%$ avec un taux d'internalisation de $4,5 \pm 0,6\%$ ⁷⁹. Ceci en fait un radiopharmaceutique prometteur pour cibler des tumeurs exprimant le GRP-R.

L'étude de la biodistribution du $[^{68}Ga]Ga$ -RM2 chez des souris nude avec xénogreffe PC-3 a montré une captation importante jusqu'à 2h post-injection ($13,61 \pm 0,64\%ID/g$)⁷⁷ **Figure 20**. La biodistribution de l' $[^{111}In]In$ -RM2 chez la souris nude avec xénogreffe PC-3 a retrouvé une clairance rénale rapide. Une accumulation tumorale rapide a également été observée avec une captation de $15,2 \pm 4,8\%$ IA/g à 1h post-injection. Cette captation est restée importante à 4h post-injection ($11,7 \pm 2,4\%$ IA/g)⁷⁸. L'étude de la biodistribution du $[^{177}Lu]Lu$ -RM2 retrouve une captation de $10,97 \pm 0,99\%$ IA/g à 4h post-injection et de $4,66 \pm 0,44\%$ IA/g à 24h post injection⁸⁰. Cette accumulation intra-tumorale au cours du temps rend le radiopharmaceutique intéressant pour un emploi thérapeutique chez l'Homme.

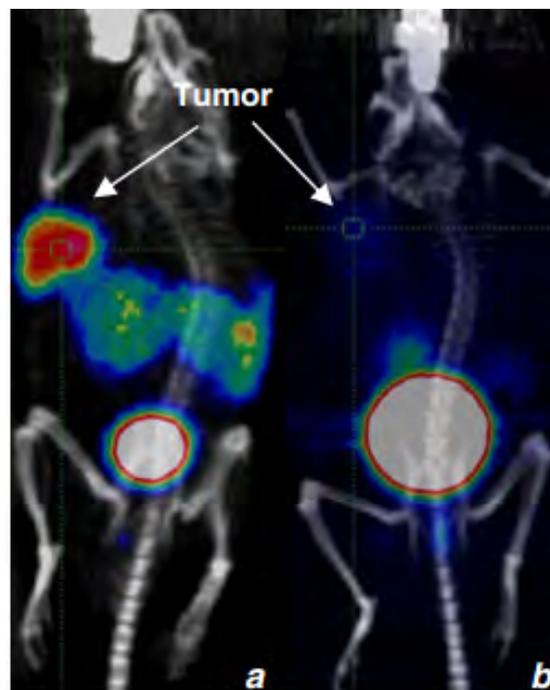


Figure 20 : Image MicroPET/CT d'une xénogreffe PC3 sur des souris nudes après injection de $[^{68}Ga]Ga$ -RM2 à 1h (a) et 1h avec blocage (b)⁷⁷

La première injection du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ chez des volontaires sains par Roivainen *et al.* a établi la sécurité de son administration ainsi qu'une bonne tolérance chez l'Homme mais a également révélé la dégradation *in vivo* rapide du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ en trois métabolites principaux (le $^{68}\text{Ga-DOTA}$, un résidu issu du clivage entre l'Alanine et la Valine et un résidu issu de l'hydrolyse de la Glutamine). Or, l'un des paramètres influençant l'efficacité de la captation tumorale est la quantité de radioligand intact atteignant la cible. Ici, il restait $92 \pm 9\%$ de RM2 intact à 1 min post injection et $29 \pm 6\%$ à 40 minutes, ce qui n'empêcherait pas son utilisation radiomarkée si la molécule s'avère avoir une distribution tumorale importante et rapide⁸¹.

Les premières études évaluant cet antagoniste du GRP-R dans le diagnostic initial de cancer de la prostate se sont avérées prometteuses avec notamment une sensibilité de 88% et spécificité de 81% sur 132 lésions identifiées chez 11 patients présentant des tumeurs de haut grade⁸². Une seconde étude menée chez 16 patients présentant des lésions allant de bas à haut grade, retrouve un diagnostic positif par TEP au $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ chez 94% (15/16) des patients avec une sensibilité de 89% et spécificité de 55% (sur un total de 128 lésions étudiées). Les faux positifs étaient essentiellement liés à des lésions d'hypertrophie bénigne de la prostate⁸³. Le $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ pourrait donc avoir un intérêt dans le diagnostic initial de cancer de la prostate, du fait de sa captation importante par les cellules prostatiques tumorales. Certaines lésions telles que des métastases ganglionnaires rétro-péritonéales risquent cependant de passer inaperçues du fait d'une captation pancréatique physiologique importante⁸².

En situation de récurrence biologique, une étude pilote a comparé le $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ au $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ chez sept patients. Les deux radiopharmaceutiques ont eu une bonne captation tumorale par les lésions suspectes (similaire mais pas identiques pour les deux MRP)⁸⁴ (Figure 21). Leur administration n'a pas abouti à des effets indésirables majeurs et une meilleure qualité d'image a été retrouvée pour le $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ du fait d'une captation tumorale spécifique et importante combinée à une élimination rapide du MRP des organes exprimant physiologiquement le GRP-R^{77,82}.

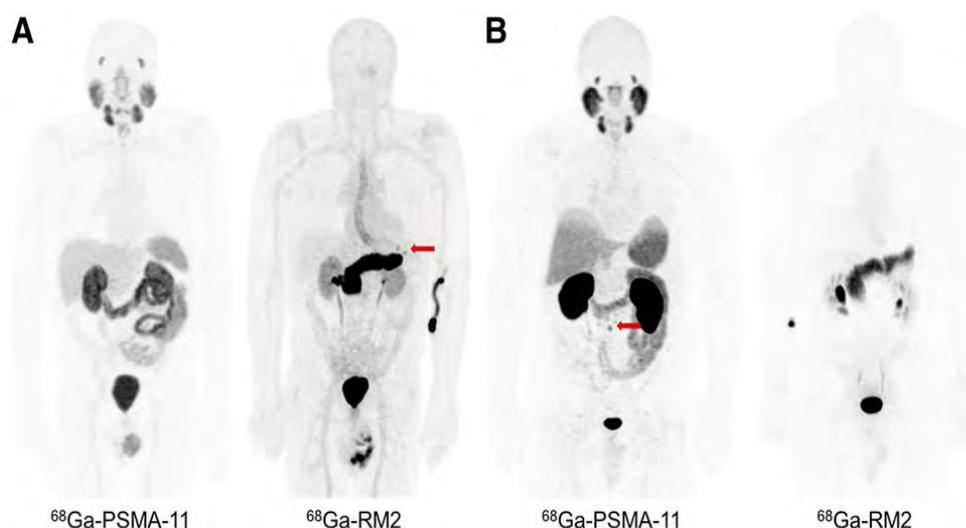


Figure 21 : Les images TEP du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA11}$ et du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ ne montrent pas de captation tumorale du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA11}$ et une captation localisée (flèche) au niveau des ganglions rétro-péritonéaux de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ (A), et une captation localisée (flèche) de ganglions rétro-péritonéaux de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSM11}$ et pas de captation tumorale de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ (B)⁸⁵

Notre équipe a comparé 3 MRP : [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-617, [⁶⁸Ga]Ga-RM2 et [¹⁸F]F-choline chez un patient de 66 ans ayant un cancer de la prostate Gleason 9 (5+4), retrouvant une faible captation tumorale du [⁶⁸Ga]Ga-RM2 toutefois concordante avec la délimitation histologique de la tumeur. Cependant, il s'est avéré moins sensible pour la détection de métastases ganglionnaires que le [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-617 (Figure 22)⁸⁶.

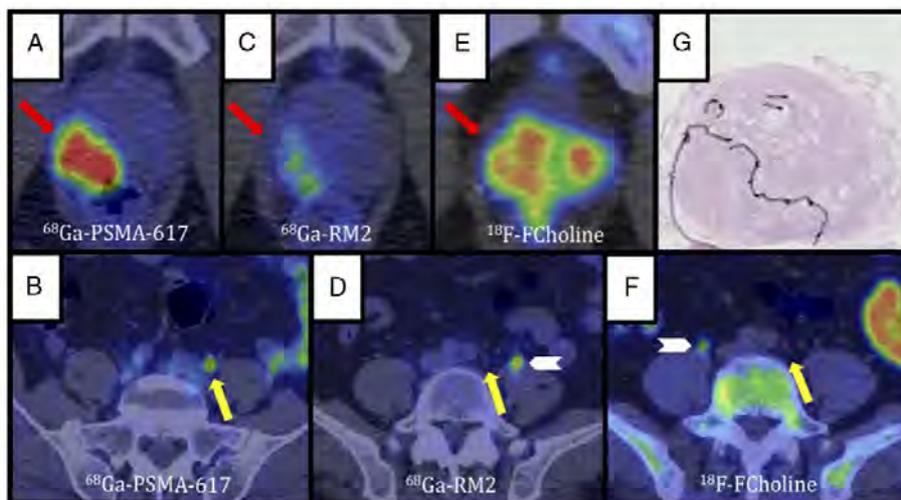


Figure 22 : TEP/TDM au [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-617 (A,B), au [⁶⁸Ga]Ga-RM2 (C,D) et à la [¹⁸F]F-Choline (E,F) et coupe histologique de biopsie de la prostate (G).

En comparant les données existantes pour le RM2, le RM26 et le NeoBOMB1 (Tableau 4), le RM2 semble la molécule la plus intéressante du fait d'une excellente captation tumorale et d'une élimination rapide et importante dans les tissus sains exprimant physiologiquement le GRP-R (pancréas). Ceci présente un net avantage en vue d'une application thérapeutique du fait d'un ratio de captation tumeur/pancréas important et persistant au cours du temps.

Tableau 4 : Comparaison du RM2, RM26 et NeoBOMB1 marqués à l'indium (lignées cellulaires et xélogreffes PC3)

	[¹¹¹ In]In-RM2 ⁷⁷	[¹¹¹ In]In-RM26 ⁸⁷	[¹¹¹ In]In-NeoBOMB1 ⁷¹
Affinité pour le GRP-R	9,3 ± 3,3 nM (IC ₅₀)	1,2 ± 0,3 nM (IC ₅₀)	1,28 ± 0,14 nM (IC ₅₀)
Fraction liée à la membrane	15,9 ± 0,9 % (4h)	N/A	43,5 ± 0,4%
Internalisation	3,7 ± 0,4 % (4h)	<8% (30min)	N/A
Captation tumorale	15,2 ± 4,8% IA/g (1h) 11,75 ± 2,43% IA/g (4h) 6,84 ± 1,02% IA/g (24h)	5,7 ± 0,2% ID/g (1h) 5,8 ± 1,3% ID/g (3h) 4,5 ± 0,9% ID/g (24h)	28,6 ± 6,0% ID/g (4h) ≈25,6 ± 6,6% ID/g (24h)
Captation pancréatique	22,64 ± 4,71% IA/g (1h) 1,55 ± 0,48% IA/g (4h) 0,32 ± 0,09% IA/g (24h)	12 ± 1% ID/g (1h) 3,38 ± 1,08% ID/g (3h) 0,11 ± 0,03% ID/g (24h)	≈191 ± 29% ID/g (4h) ≈100 ± 33% ID/g (24h)
Ratio tumeur/pancréas	0,67 (1h) 7,58 (4h) 19,54 (24h)	0,48 (1h) 1,72 (3h) 40,91 (24h)	0,15 (4h) 0,26 (24h)
Injection chez l'Homme	Oui	Oui	Oui
AMM	Non	Non	Non

H. Objectif de ce travail de thèse

À l'issue de cet exposé, il devient clair que l'imagerie et la thérapie ciblant le GRP-R possède un potentiel important notamment dans les cancers de la prostate et le cancer du sein. L'utilisation de modules de synthèse pour la production du [^{68}Ga]Ga-RM2, et par extension le [^{177}Lu]Lu-RM2, implique notamment des coûts élevés, et une standardisation des procédures insuffisantes pour des études cliniques de grande ampleur. L'avantage du radiomarquage par trousse contenant tous les composants nécessaires au radiomarquage est une réduction des coûts (autre que le précurseur), une simplification de la procédure de marquage et une diffusion large du ciblage du GRP-R à des centres non équipés de modules de synthèses. De plus, l'emploi de trousse permet un radiomarquage rapide, simple et fiable, utilisable en pratique clinique et facilement adaptable à la routine d'une radiopharmacie.

Dans le cadre d'un partenariat avec la société Life Molecular Imaging qui nous a fourni la trousse de RM2 et la société IRE EliT, fournisseur de générateur de ^{68}Ga , nous avons cherché à caractériser et valider le radiomarquage au ^{68}Ga de cette trousse. Les données seront comparées aux données relatives à la production du [^{68}Ga]Ga-RM2 en module de synthèse dans le cadre d'études cliniques de phase II en cours dans notre centre. Enfin, la caractérisation des propriétés radiopharmaceutiques du [^{68}Ga]Ga-RM2 sur des cellules de cancer de la prostate PC-3, connue pour fortement exprimer le GRP-R a été effectué. En effet, de façon surprenante, nous n'avons pas retrouvé dans la littérature de données relatives à la caractérisation in vitro du [^{68}Ga]Ga-RM2.

II. Matériels et Méthodes

A. Trousse RM2

La trousse RM2 est constituée d'un flacon en verre type IV borosilicaté et un bouchon en caoutchouc contenant :

- 50µg de RM2,
- 5mg d'acide ascorbique,
- Un excipient pour donner de la masse.

B. Étude de la péremption de la trousse de RM2

Un premier lot de trousse (**Figure 23**) a été conservé pendant 12 mois à 4°C dans un réfrigérateur possédant un suivi de température par sonde. Tous les 2 mois, une analyse LC-MS et HPLC-UV a été effectuée (7 analyses au total).



Figure 23 : Trousse RM2

En collaboration avec la Plateforme Protéome de l'Université de Bordeaux (Stéphane Claverol), l'analyse LC-MS a été effectuée sur un spectromètre de masse de type Electrospray Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™ (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Les analyses des points T0 ; 2mois ; 4mois ; 6mois ; 8mois ; 10mois ; 12mois ont été réalisées en singulet.

Pour cela, chaque trousse de RM2 a été solubilisée dans 5mL d'eau ultrapure (Qualité LC-MS Optima™ ; W6-500 ; Fisher Chemical) puis 1µL a été injecté sur une colonne de phase inverse C18 couplée au spectromètre de masse. Les données de LC-MS ont ensuite été analysées avec le logiciel BiopharmaFinder® permettant la déconvolution des spectres MS sur toute la durée de l'analyse LC. L'analyse LC-MS permet l'intégration de l'aire sous le pic pour chaque espèce ionique détectée. L'abondance relative est ensuite effectuée par rapport à la somme de l'intensité de l'ensemble des espèces détectées.

L'analyse LC-MS a été complétée par une étude en HPLC couplée à un détecteur UV à 214nm (Phenomenex Luna C18 ; 250mmx4,6mmx5µm ; 0-1min 95/5 / 1-7min 5/95 / 7-8min 5/95 / 8-9min 95/5 / 9-10min 95/5 ; 2,5mL/min ; H₂O 0,1% TFA/Acétonitrile ; 10min) réalisée à partir d'une gamme étalon faite sur le RM2 froid. Le système HPLC utilisé est le système JASCO avec le logiciel ChromNAV, une pompe à gradient quaternaire PU-2089 PLUS, un détecteur de réseau de photodiode MD-2018 Plus, et un détecteur de radioactivité Raytest Gabi Star.

C. Étude du [⁶⁸Ga]Ga-RM2

1. Optimisation des conditions de radiomarquage au ⁶⁸Ga

Tous les essais de radiomarquage ont été effectués dans une enceinte blindée ventilée en dépression de classe A, dans une pièce ventilée de classe C. La trousse de RM2 n'étant pas sous vide (le vide étant nécessaire à l'éluion), nous avons mis un flacon sous vide (Fill-Ease™ 20mL ; Huayi Isotopes Co.) en série avec la trousse de RM2, afin d'éluier directement le ⁶⁸Ga dans la trousse. (Figure 24). Ce montage a été réalisé avec des aiguilles Sterican® en silicone et des tubulures en polyéthylène (Vygon) : une tubulure de 50cm entre le générateur et la trousse RM2, et une tubulure de 30cm entre la trousse et le flacon sous vide. Le générateur utilisé est le générateur ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga GalliAd® de la société IRE Elit, dont le certificat d'analyse est présenté dans le Tableau 5.



Figure 24 : Mise en œuvre du radiomarquage de la trousse RM2

Tableau 5 : Certificat d'analyse du générateur ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga GalliAd®

TEST	SPECIFICATIONS	RESULTS	
<i>Appearance</i>	Clear and Colourless solution or Almost Colourless Solution	Complies with the specification	
<i>Radio-nuclidic Identity</i>	Detected for ID: 511 / 1077 / 1883 keV	Complies with the specification	
<i>Identification</i>			
<i>Period Identification</i>	62 ≤ T1/2 (min) ≤ 74	68 min	
<i>Acidity test</i>	pH ≤ 2	1	
<i>Cationic Identification</i>	A3 ≥ 90 %	96 %	
<i>Chlorure Identification</i>	Positive	Positive	
<i>Chemical Impurities</i>	µg / GBq	µg / GBq	
<i>Al</i>	≤ 10	0,36	
<i>Cu</i>	≤ 10	0,02	LOD
<i>Fe</i>	≤ 10	0,41	
<i>Ni</i>	≤ 10	0,02	LOD
<i>Pb</i>	≤ 10	0,02	LOD
<i>Zn</i>	≤ 10	0,03	
<i>Ga</i>	≤ 10	0,02	
<i>Ti</i>	≤ 10	0,62	
<i>Endotoxin Concentration</i>	≤ 0,5 UE/ml	< 0.102 UE/ml	LOD
<i>Sterility</i>	Sterile	Complies with specification	
<i>Gamma Impurities</i>			
<i>Limit test</i>	≤ 1E-01 %	0E+00 %	
<i>Total ⁶⁸Ga</i>	≤ 1E-03 %	2E-05 %	
<i>Radiochemical Purity</i>	≥ 95 %	100 %	

LOD: Limit of detection
ND: Not detected

NR: Not realised
OOS: Out of specification

Les conditions de radiomarquages ont été optimisées en modulant les paramètres suivants :

- Le pH ; en modifiant la quantité d'acétate de sodium anhydre pour la préparation du tampon de radiomarquage (de 19 à 85mg ; Réf : 1.06268.0250 ; Merck),
- Le volume réactionnel (de 1,4 à 5,1mL),
- La température de chauffage (de 100 ou 120°C),
- Le temps de chauffage (de 8 à 15min).

2. Validation des conditions de radiomarquage et contrôles de qualités

Afin de remettre en solution la poudre de la trousse de RM2 et d'avoir un pH adapté pour le radiomarquage, 2mL d'HCl à 0,1M (Rotem Industries) ont été mélangés à 27mg d'acétate de sodium anhydre. Puis le ^{68}Ga est élué sur ce mélange réactionnel à l'aide du montage sous vide décrit plus haut. Le radiomarquage au ^{68}Ga a été effectué en chauffant à 100°C pendant 10min au bain marie sec sous agitation, suivi de 5min de retour à température ambiante. La formulation du produit final a été réalisée en ajoutant 1,9mL de PBS (Phosphate Buffered Saline) et 2mL de NaCl isotonique (Aguettant). Pour finir une filtration stérilisante (Réf : Millex GV SLGV013SL ; Merck) a été réalisée manuellement.

La pureté radiochimique a été vérifiée par chromatographie sur couche mince (CCM) et par HPLC analytique.

Pour l'analyse par **CCM**, nous avons utilisé un mélange Acétate d'ammonium 50mM/MeOH 1:1 comme phase mobile et du papier ITLC-SG pour la phase stationnaire (migration sur 10cm).

L'analyse de la pureté radiochimique du produit fini a également été vérifiée par **HPLC-radio UV** (214nm) en prenant en compte les aires du ^{68}Ga Ga-RM2, du gallium-68 libre et celles des éventuelles impuretés.

L'activité volumique a été déterminée en divisant l'activité du produit fini par le volume final soit 7mL.

L'activité spécifique a été déterminée en divisant l'activité du produit fini par la masse de ^{nat}Ga Ga-RM2 (obtenue par régression linéaire de la courbe de calibration).

La demie vie du produit a été calculée avec trois mesures successives sur un intervalle de temps de 15 minutes à l'aide d'un activimètre calibré (MEDI405 : Medisystem, Guyancourt, France).

La pureté radionucléidique a ensuite été détecté par Spectrométrie gamma (Mini Gita ; Raytest) afin de vérifier la conformité à la pharmacopée européenne⁸⁸. Le rayonnement caractéristique du ^{68}Ga (photon de 0,511 MeV et 1,077 MeV, selon la géométrie de mesure, il peut apparaître un pic somme de 1,022MeV). L'identification a été réalisé avec une incertitude des pics de $\pm 10\%$, et en montrant une absence de pics parasite.

Le pH a été contrôlé par pH-mètre (Mettler Toledo ; Five Easy) et papier pH (Fix 3,1-8,3, Macherey Nagel, Lot : 35A1551, Ref : 92135). Le pH de la solution devra être compris entre 4 et 8.

Le test d'intégrité du filtre a été réalisé par la méthode du point de bulle. La pression de gaz minimal requise pour l'apparition du bullage doit être supérieure à 3,4 Bars.

La recherche d'endotoxines a été effectuée à l'aide du test de limulus (lysate d'amœbocytes de limules, ou test LAL), réalisé avec le système Endosafe® (Charles River Laboratories ; Consommable : Limulus Amebocyte Lysate ; Lot : 8545145).

La stabilité du marquage a été étudiée en quantifiant la pureté radiochimique du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ par HPLC-UV-radio et CCM 1h, 2h et 3h après la formulation.

Tableau 6 : Résumé des spécifications des contrôles qualités du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$

Test	Méthode	Spécification	Justification des spécifications
Activité volumique	Activimètre	10-100MBq/mL	Spécification interne
Activité spécifique	Activimètre et HPLC UV	$\geq 1,5\text{GBq}/\mu\text{mol}$	Spécification interne
Apparence de la solution	Contrôle visuel	Limpide et incolore	Phar. Eur. $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -édotrétotide
pH	Bandelette pH/pHmètre	4,0-8,0	Phar. Eur. $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -édotrétotide
Identification du ^{68}Ga	Spectrométrie γ	$0,511\text{ MeV} \pm 1,022\text{ MeV}$ $0,511\text{ MeV} \pm 1,077\text{ MeV}$	Phar. Eur. $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$
	Demi-vie physique	62-74 min	Phar. Eur. $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$
Pureté radiochimique du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$	CCM	$\geq 91\%$ de la radioactivité totale	Phar. Eur. $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -édotrétotide
	HPLC	$\geq 91\%$ de la radioactivité totale	Phar. Eur. $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -édotrétotide
Endotoxines bactériennes	Endosafe	$\leq 17,5\text{ U.I.}/\text{mL}$	Phar. Eur. $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -édotrétotide
Stérilité	Test du point bulle	Point bulle du filtre $\geq 3,4\text{ bars}$	Phar. Eur. Méthodes de préparation des produits stériles
	Ensemencement	Absence de pousse visible à 14 jours	Phar. Eur. Méthodes de préparation des produits stériles

3. Évaluation in vitro

a) Culture cellulaire

Les expériences ont été menées sur des cellules PC3 (connue pour surexprimer le GRP-R), une lignée cellulaire de carcinome prostatique humain de haut grade dérivé de métastases osseuses. La lignée PC-3 (passage 21) a étéensemencée dans du DMEM/F12 (v/v) (Gibco®) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Gibco®) et un mélange de streptomycine-pénicilline (100µL/mL) (Gibco®). La lignée cellulaire a été incubée dans des flasques de 175 cm² à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO₂, à l'abri de la lumière. Le milieu de culture est changé 2 fois par semaine. Lors de ce changement de milieu, le surnageant est retiré de la flasque par aspiration, puis le tapis cellulaire est rincé avec du PBS stérile sans Ca²⁺ et Mg²⁺ (Gibco®). Enfin, 15mL de milieu complet sont ajoutés dans la flasque. Pour la réalisation des expériences in vitro, des plaques de 6 puits ont étéensemencées avec 10⁶ cellules par puit 18h avant la réalisation des expériences, et incubées la nuit avec du milieu complet.

b) LogD_{7,4}

Pour l'étude du logD_{7,4}, 3,7MBq (≈10µL) de [⁶⁸Ga]Ga-RM2 ont été ajoutés dans du PBS à pH=7,4 pour obtenir un volume de solution aqueuse de 500µL. Cette solution a été mélangée à 500µL d'octanol (Sigma). Les deux phases ont été agitées à l'aide d'un vortex pendant 2min puis centrifugées pendant 3min à 4000rpm. Enfin, 100µL de chaque phase (en triplicate) ont été prélevés puis mesuré au compteur gamma. Le Log D_{7,4} est déterminé par le rapport Log (cpm (coups par minute) phase organique/ cpm phase aqueuse). Les valeurs de cpm sont corrigées de la décroissance.

c) Détermination de l'affinité par saturation

Les plaques de puits ont d'abord été déposées sur de la glace pendant 30 minutes avant le début de l'expérience pour interrompre les échanges avec le milieu extracellulaire et ainsi étudier les récepteurs. Le [⁶⁸Ga]Ga-RM2 est ensuite ajouté dans du milieu complet aux cellules à des concentrations croissantes (0,1 ; 1 ; 10 ; 25 ; 50 nM) (en triplicate) puis l'ensemble [⁶⁸Ga]Ga-RM2-cellules PC3 a été mis à incuber pendant 2h à 4°C. Afin de déterminer les liaisons non spécifiques, un excès de bombésine (IC₅₀ = 1,97 ± 0,93 nM pour le GRP-R sur PC3⁸⁹) a ensuite été ajouté à des puits choisis (concentration finale de 1µM). L'incubation a été arrêtée en retirant le milieu et les cellules sont lavées deux fois avec du PBS froid. Enfin, les cellules sont lysées avec du NaOH 1M puis la radioactivité a été mesurée à l'aide d'un compteur gamma (Compteur Gamma Wizard ; Perkin Elmer ; durée d'acquisition d'une minute, fenêtre énergétique centrée sur le pic de 511keV). La liaison spécifique a été déterminée par la soustraction de la liaison totale par la liaison non spécifique (où la bombésine était en excès). La valeur de Kd est ensuite calculée à l'aide du logiciel GraphPad® (V6.01).

d) Internalisation et fraction liée à la membrane

Le [⁶⁸Ga]Ga-RM2 a été ajouté dans du milieu complet aux cellules à une activité de 1MBq (en triplicate) puis les plaques sont mises à incuber pendant 10, 30 et 60min à 37°C. Afin de déterminer l'internalisation non spécifique, 1µM de bombésine a été ajouté à certains puits. À chaque temps, l'internalisation a été interrompue en retirant le milieu et les cellules ont été rincées à trois reprises au PBS glacé. Afin de déterminer la fraction du

radioligand lié au récepteur membranaire, un lavage acide a été effectué deux fois à l'aide de tampon acétate (pH=5 ; 20mM) à 4°C pendant 5min. Enfin, les cellules ont été traitées avec du NaOH (1M). La radioactivité du milieu de culture, des fractions liées au récepteur et internalisées ont été mesurées au compteur gamma.

e) Efflux

Le [⁶⁸Ga]Ga-RM2 a été ajouté dans du milieu complet aux différents puits à une activité de 1MBq par puit (en triplicate) puis les plaques sont mises à incuber pendant 30min à 37°C. Trois minutes avant la fin du temps d'incubation, l'internalisation a été interrompue en plaçant les plaques sur la glace et en retirant le surnageant. Chaque puit a ensuite été rincé avec 1mL de PBS froid. La fraction liée à la membrane est éliminée par rinçage à l'aide de 2mL de tampon acétate (pH=5 ; 20mM) pendant 2min et chaque puit a ensuite été rincé une deuxième fois du PBS froid. Après avoir rajouté 2mL de milieu complet à chaque puit, les cellules PC3 sont remises à l'étuve (37°C) pendant 5, 15, 30 et 45min. À chaque temps, l'efflux a été interrompu en retirant le milieu et rinçant les cellules à deux reprises avec du PBS froid. Enfin, les cellules ont été traitées avec du NaOH 1M. La radioactivité du milieu de culture, du PBS et des fractions internalisées ont été mesurées au compteur gamma.

4. Évaluation des coûts

Le coût du radiomarquage de la trousse de RM2 au ⁶⁸Ga a été comparé au coût d'un radiomarquage du RM2 sur module dans le cadre des essais cliniques UROPET (Étude de phase 2 évaluant l'efficacité diagnostique de la TEP/TDM au [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-617 avec celle au [⁶⁸Ga]Ga-RM2 chez des patients ayant un cancer de la prostate de différents risques métastatiques) et PROSTATEP (Étude de phase 2 comparant l'efficacité diagnostique de la TEP/TDM au [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-617 avec celle au [⁶⁸Ga]Ga-RM2 chez des patients ayant un cancer de la prostate avec un score de Gleason 3+4 ou avec un score de Gleason 4+3) actuellement en cours dans notre centre. Pour cela, il est nécessaire d'évaluer les coûts fixes et variables engagées dans la production du médicament radiopharmaceutique, rapportés au coût d'une synthèse de RM2.

- **Coûts fixes** : Équipement nécessaire à la production (ex : enceinte blindée haute énergie): frais d'acquisition et de maintenance. Équipement nécessaire au contrôle qualité (ex : HPLC-UV) : frais d'acquisition.
- **Coûts variables** : Équipements consommables (ex : seringues, cassettes pour module de synthèse, ...).
- **Temps d'une synthèse** : Le temps d'une synthèse à partir de l'élution du ⁶⁸Ga jusqu'à la préparation de la seringue patient a également été évalué.

D. Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée avec un test t de Student non paramétrique ($\alpha=5\%$). Tous les tests ont été effectués avec le logiciel GraphPadPrism®(V6.01). Les valeurs de p inférieures ou égales à 0,05 ont été considérées statistiquement significatives.

III. Résultats

A. Étude de la stabilité de la trousse RM2

L'étude quantitative du RM2 en HPLC sur douze mois après une conservation entre 2 et 8°C a retrouvé $108,7 \pm 6,6\%$ de RM2 intact à T4, $109,2 \pm 9,8\%$ à T6, $113,8 \pm 4,8\%$ à T8, $111,6 \pm 5,2\%$ à T10 et $112,0 \pm 12,3\%$ à T12 (Figure 25 et Figure 26). Ainsi, il n'y a pas de différence significative avec la valeur de départ de 100%.



Figure 25 : HPLC du kit RM2 à 220nm

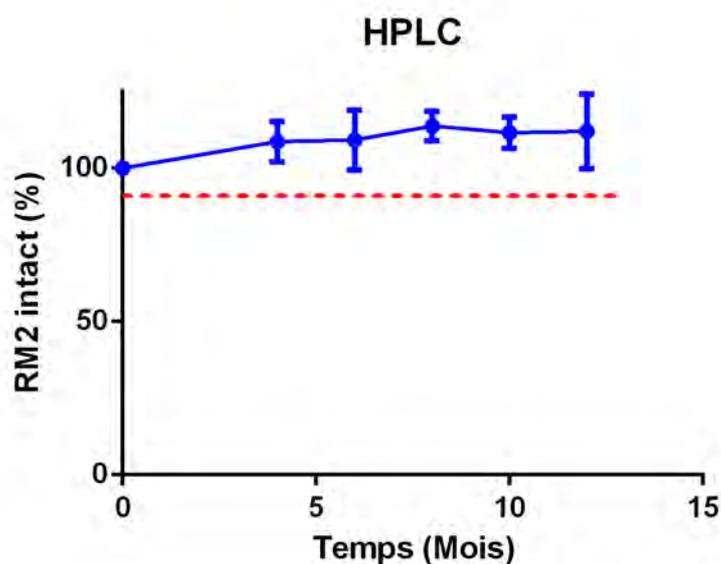


Figure 26 : Stabilité du RM2 au cours du temps (HPLC)

Afin d'approfondir l'étude de la stabilité du précurseur, la trousse de RM2 a également été étudiée par spectrométrie de masse couplée à une chromatographie liquide, ce qui a permis de qualifier et quantifier les espèces chimiques présentes dans la trousse au cours du temps (Figure 27 et Figure 28). Deux peptides ont été retrouvés dans la trousse, un fragment de 1639Da correspondant au RM2 intact (Figure 27) et un fragment de 1621Da. La Figure 28 montre l'évolution de ces deux espèces au cours du temps :

- Fragment 1639Da (RM2),
- Fragment 1621Da (Impureté).

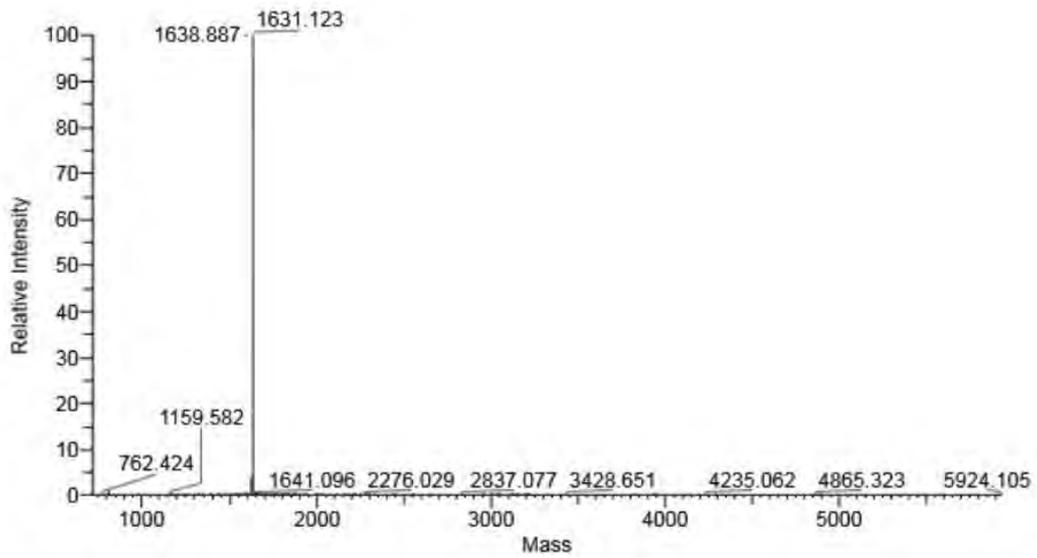


Figure 27 : Spectrométrie de masse du RM2 à t=12mois

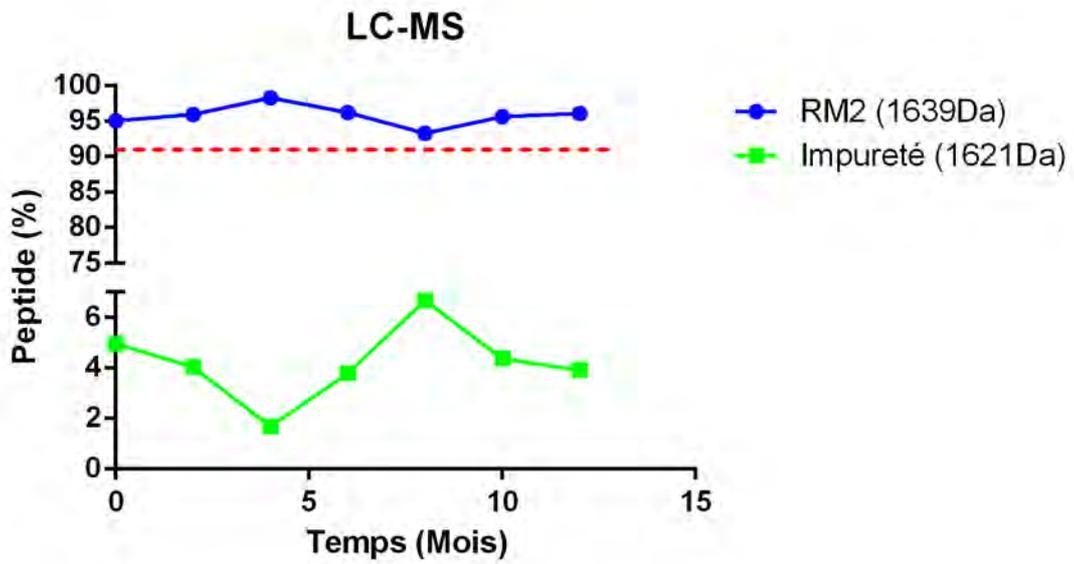


Figure 28 : Évolution des produits de différentes masses moléculaires en fonction du temps

B. Optimisation des conditions de radiomarquage

Le pH réactionnel a un effet important sur le rendement de radiomarquage de la trousse de RM2 au ^{68}Ga . Un rendement atteignant 93% (contre 5%) a été obtenu en augmentant le pH de la solution de 2,35 à 3,46. Nous avons cependant constaté une diminution du rendement du radiomarquage lorsque le pH était supérieur à 4 (Figure 29).

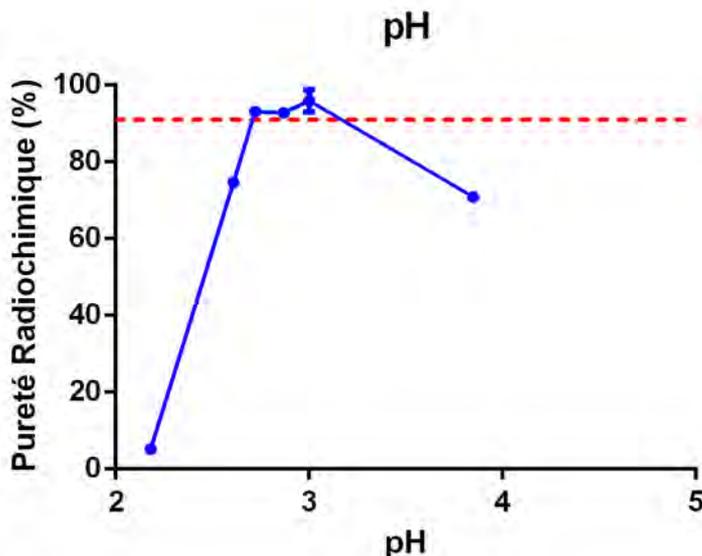


Figure 29 : Différents pH étudiés pour le radiomarquage du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$

Le temps de chauffage a également eu une influence sur le rendement du radiomarquage lorsqu'il dépassait 13 minutes. Nous avons constaté que l'allongement du temps de chauffage de 10 à 13min n'a pas significativement amélioré le rendement de marquage tel que mesuré par HPLC et CCM, passant de 93% à 94%. Par contre, le chauffage sur une durée plus longue (15min) aboutit à une diminution du rendement du marquage à 86% en CCM (Figure 30).

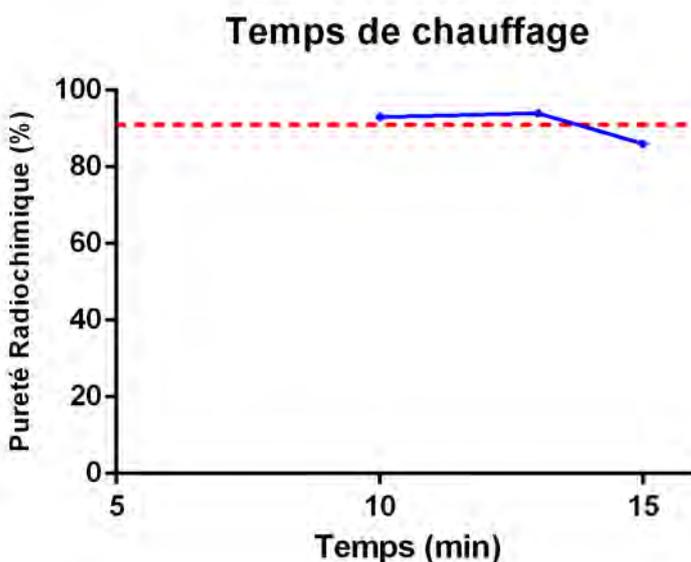


Figure 30 : Évolution de la pureté radiochimique du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ en fonction des différents temps de chauffage utilisés

Enfin, le volume réactionnel a également été étudié en vue d'améliorer le rendement de radiomarquage. Une diminution du volume réactionnel de 5,1mL à 3,1mL a majoré le rendement du radiomarquage de 3%, passant de 93 à 96%, mais une diminution trop importante du volume réactionnel à 2,5mL a entraîné une baisse du rendement à 74% en CCM (Figure 31).

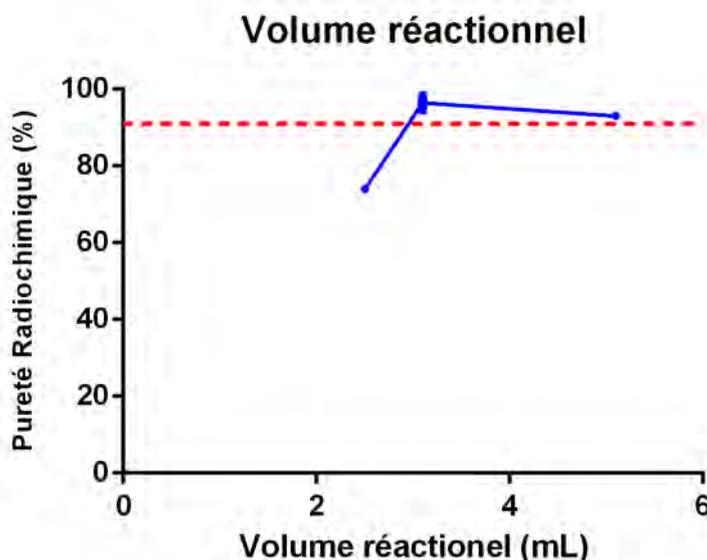


Figure 31 : Différents volumes réactionnels utilisés pour le radiomarquage du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$

Par ailleurs, au cours du processus d'optimisation du radiomarquage, nous avons constaté que les éléments suivants avaient un impact favorable sur le rendement du marquage du RM2 au ^{68}Ga :

- Agiter la solution lors de la phase de chauffage, qui a permis une amélioration de 22% à 70% avec 51mg d'acétate de sodium par exemple,
- Réaliser ensuite un retour à température ambiante pendant 5 minutes,
- Éluer le générateur 4h avant la réalisation du marquage,
- Utiliser une seringue 2 pièces au lieu d'une seringue 3 pièces (sans septum en caoutchouc) pour prélever l'acide chlorhydrique.

Enfin, le protocole retenu pour la validation de 3 lots de la trousse RM2 est le suivant :

- Injection dans la trousse de 27mg d'acétate de sodium solubilisé dans 2mL d'acide chlorhydrique à 0,1M,
- Élution du générateur dans la trousse,
- Chauffage au bain marie sec à 100°C avec agitation pendant 10minutes,
- Retour à température ambiante pendant 5min,
- Ajout de 1,9mL de PBS et 2mL de NaCl 0,9%,
- Terminer avec une filtration stérilisante du MRP.

C. Validation des conditions de radiomarquage

La validation des conditions de radiomarquage a été réalisée sur 3 lots, en suivant les méthodes et spécifications énoncées dans la monographie de la pharmacopée européenne⁸⁸ pour le [⁶⁸Ga]Ga-édotrétotide (**Tableau 7**). Avant l'étude de ces trois lots, l'efficacité du radiomarquage a été vérifiée à plusieurs reprises et au total 8 radiomarquages ont été réalisés. L'ensemble de ces marquages n'a pas été mené jusqu'à l'étape de formulation ou de filtration stérilisante.

Tableau 7 : Résultats des contrôles qualité (CQ) des lots de validation de [⁶⁸Ga]Ga-RM2

Test	Spécification	Lot n°1	Lot n°2	Lot n°3
Activité (MBq)		288,5	277,1	265,3
Activité volumique (MBq/mL)	10-100MBq/mL	22,65	28,00	20,23
Activité spécifique (GBq/μmol)	≥1,5GBq/μmol	8,29	5,8	7,6
Apparence de la solution	Limpide et Incolore	Conforme	Conforme	Conforme
pH	4,0-8,0	4,7	4,7	4,7
Identification du ⁶⁸ Ga	0,50-0,52MeV ± 1,022MeV ± 1,077MeV	Conforme	Conforme	Conforme
	62-74 min	67,17 min	67,90 min	67,61 min
Pureté radiochimique du [⁶⁸ Ga]Ga-RM2 (%)	≥91% de la radioactivité totale (CCM)	97,48	98,57	95,14
	≥91% de la radioactivité totale (HPLC)	95,28	98,31	94,39
Quantité de [⁶⁸ Ga]Ga-RM2 (μg)	<50	38,08	45,27	31,79
Endotoxines bactériennes (U.I./mL)	≤17,5	<5	<5	<5
Stérilité	Point bulle du filtre ≥3,4 bars	3,6	3,6	3,7
	Conforme	En cours	En cours	En cours

À ce jour, le [⁶⁸Ga]Ga-RM2 synthétisé par module à 23 reprises a été injecté à 22 patients à la TEP recherche (Université de Bordeaux), ce qui nous permet de comparer le radiomarquage entre ces deux méthodes (par trousse ou par module) (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Comparaison de la synthèse du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ en module ou à partir d'une trousse

	Trousse $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$	Module $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$	P
Rendement de marquage (%)	57,85 ± 4,20 (n=5)	29,30 ± 9,11 (n=23)	P<0,0001
Pureté radiochimique (%)	96,83 ± 1,36 (n=8)	99,29 ± 0,40 (n=23)	P<0,0001
Quantité $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ (µg)	38,38 ± 6,75 (n=3)	19,49 ± 6,27 (n=23)	P = 0,0015
Activité volumique (MBq/mL)	23,65 ± 3,98 (n=3)	17,08 ± 5,22 (n=23)	P = 0,0515
Activité spécifique (GBq/µmol)	7,23 ± 1,29 (n=3)	14,69 ± 5,82 (n=23)	P = 0,0312
pH	4,7 ± 0,0 (n=4)	7,17 ± 0,29 (n=22)	P = 0,0004
Temps de synthèse (min)	<20	40 ± 5	

D. Étude de la stabilité du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$

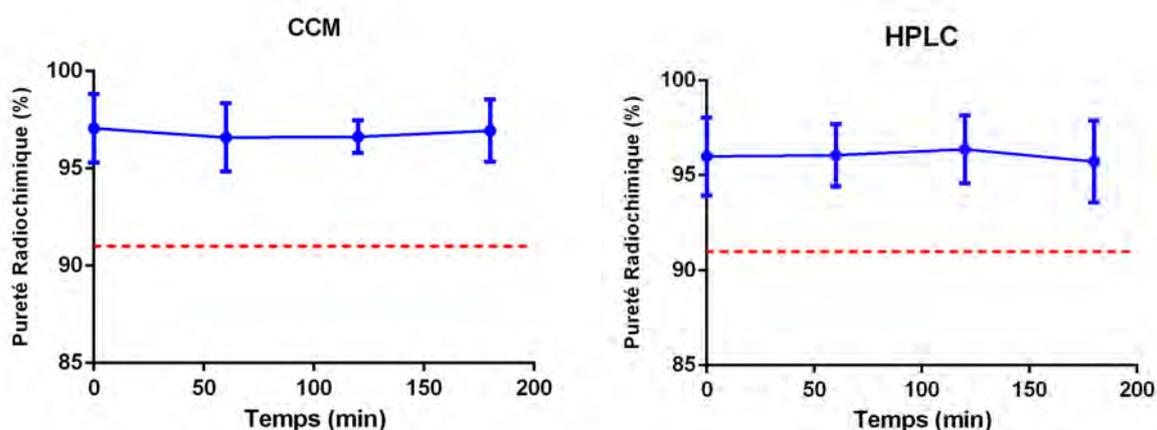


Figure 32 : Puresse radiochimique du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ en CCM et HPLC au cours du temps

La péremption du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ a été réalisée sur une période maximum de 3h. La pureté radiochimique (telle que mesurée par HPLC et CCM) reste supérieure à 91% (**Figure 32**) et ce jusqu'à trois heures après la synthèse. Elle est donc compatible avec une application en routine clinique.

1. Évaluation in vitro

a) LogD

La mesure du LogD permet de déterminer le degré d'hydrophilie ou de lipophilie de la molécule. Le $\text{LogD}_{7,4}$ mesuré pour le $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ est de $-2,54 \pm 0,04$, qui est donc une molécule hydrophile.

b) Détermination de l'affinité par saturation

L'affinité par saturation pour le GRP-R a été mesurée sur la lignée PC3 par différentes concentrations de [⁶⁸Ga]Ga-RM2 avec les trois lots radiomarqués. Le Kd du [⁶⁸Ga]Ga-RM2 obtenu est de $0,25 \pm 0,19$ nM, ce qui indique une très bonne affinité du RM2 radiomarqué pour sa cible (Figure 33).

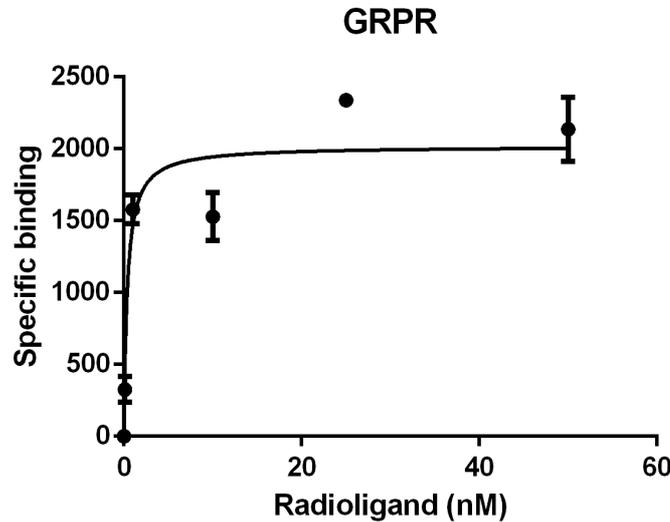


Figure 33 : Affinité du [⁶⁸Ga]Ga-RM2 pour le GRP-R sur la lignée PC3

c) Internalisation et fraction liée à la membrane

L'étude de l'internalisation du [⁶⁸Ga]Ga-RM2 médiée par le GRP-R sur la lignée PC3 révèle un taux d'internalisation de $23,9 \pm 4,1\%$ à 10min; $24,4 \pm 4,3\%$ à 30min et $18,5 \pm 5,4\%$ à 60min. (Figure 34) La fraction liée au GRP-R membranaire était quant à elle de $37,6 \pm 5,9\%$ à 10min, $41,8 \pm 9,7\%$ à 30min et $42,0 \pm 5,1\%$ à 60min. A tous les temps étudiés, la fraction liée à la membrane est supérieure à celle internalisée.

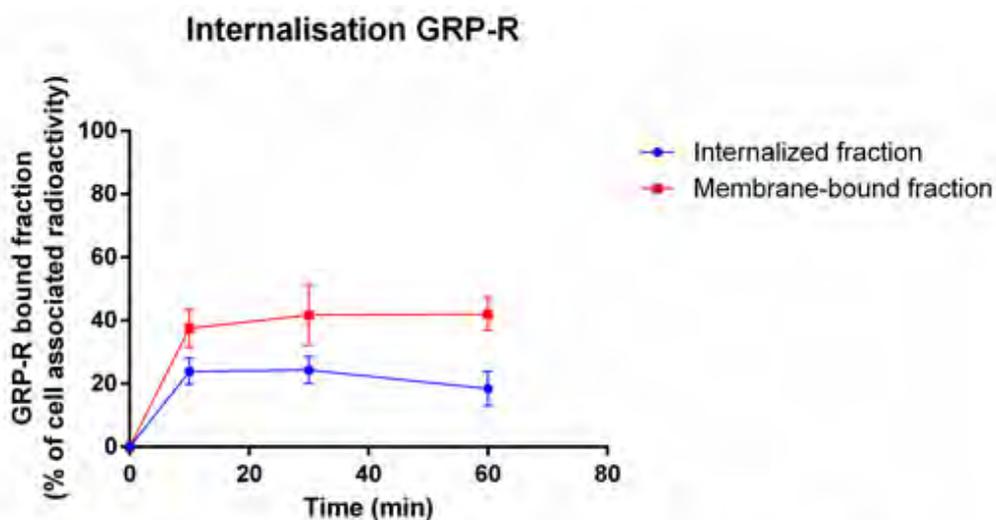


Figure 34 : Fractions du [⁶⁸Ga]Ga-RM2 liée au GRP-R sur la lignée PC3

d) Efflux

L'efflux a également été étudié sur la lignée PC3 avec les 3 lots radiomarqués, retrouvant un taux de $64,3 \pm 6,5\%$ à 5min, $74,6 \pm 7,8\%$ à 15min, $64,8 \pm 7,8\%$ à 30min et $70,8 \pm 11,7\%$ à 45min (Figure 35).

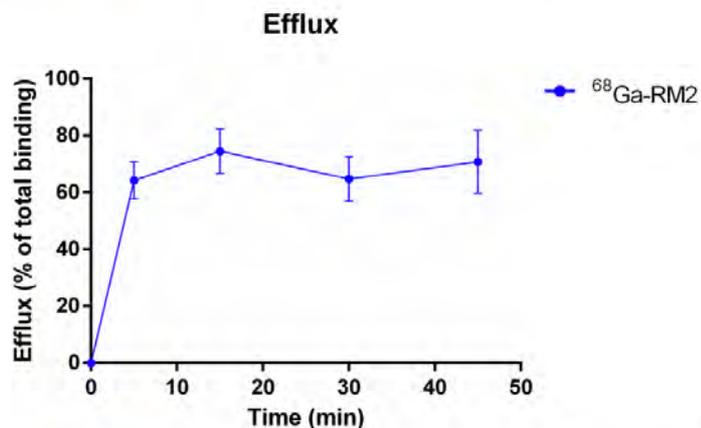


Figure 35 : Efflux du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ in vitro (lignée PC3)

2. Résumé

Tableau récapitulatif des résultats in vitro obtenus suite à l'étude des caractéristiques pharmacologiques du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ sur la lignée PC3 :

Tableau 9 : Étude du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ sur la lignée cellulaire PC3

	$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$
LogD _{7,4}	$-2,54 \pm 0,04$
Kd (nM)	$0,25 \pm 0,19$
Fixation membrane (%)	$42,0 \pm 5,1$ (1h)
Internalisation (%)	$18,5 \pm 5,4$ (1h)
Efflux (%)	$70,8 \pm 11,1$ (45min)

E. Étude pharmaco-économique

1. Détermination des postes de dépense

a) Coûts fixes

Pour la réalisation des différents radiomarquages du RM2 au ^{68}Ga , il faudra quelle que soit la méthode choisie (trousse ou module) une enceinte blindée haute énergie et un générateur $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (dans notre cas nous avons utilisé le générateur GalliAd de la société IRE Elit®).

Une enceinte blindée coûte en moyenne entre 95 000€ et 160 000€ à l'achat en plus des frais annuels de maintenance.

Un générateur $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ avec AMM coûte environ 80 000€ et doit être renouvelé tous les ans.

Pour la méthode par module, il faut également un module de synthèse tel que le module FastLab actuellement utilisé en recherche au CHU de Bordeaux et qui coûte 80 000€. Il existe également le MiniAio® de Trasis qui coûte 50 000€ et qui est actuellement employé en clinique au CHU de Bordeaux.

En plus des équipements nécessaires à la production, il faut les équipements nécessaires au contrôle qualité, à savoir :

- HPLC-UV,
- Le radiochromatographe,
- Lecteur d'endotoxines.

Ces équipements représentent un coût à l'acquisition mais n'engagent pas de frais annuels de maintenance. Les seuls frais variables concernent l'équipement consommable dont les phases mobiles et les changements de tubulures.

b) Coûts variables

Les coûts variables sont engagés à chaque production de [⁶⁸Ga]Ga-RM2 et vont recouvrir l'ensemble des équipements consommables.

Lors d'un radiomarquage par trousse, une synthèse revient ainsi en moyenne à 66€ alors qu'un radiomarquage par module coûte environ 278€ (**Tableau 10**).

Aux coûts estimés dans le tableau ci-dessous, il faudra ajouter le prix du précurseur utilisé pour le module, ainsi que le prix de la trousse de RM2 (indisponible à ce jour car non encore commercialisée).

Tableau 10 : Coût par synthèse (module et trousse RM2)

		Prix unitaire (€)	Quantité/ Synthèse MODULE	Prix par synthèse (€) MODULE	Quantité/ Synthèse TROUSSE	Prix par synthèse (€) TROUSSE
Produit chimique	Eau pour Chromatographie	5,8	1	5,8		
	Éthanol	0,044	4	0,1756		
	Acétate de sodium	0,11	2	0,2244	0,027	0,0030294
	Acide Chlorhydrique	0,412			2	0,824
	Acide Acétique	0,02		0		
	Hydrogénophosphate de Sodium	0,079	0,027	0,0021384	0,027	0,0021384
	Chlorure de sodium	0,05	3	0,13902	0,00399	0,0001849
	Dihydrogénophosphate de potassium	0,12	0,0049	0,0005831	0,0049	0,0005831
	Précurseur			0		
	Trousse RM2					0
	TFA	0,99	1	0,99	1	0,99
Consommable	Casette module	197,5	1	197,5		
	Aiguille	0,094	3	0,282		
	Seringue	0,124	3	0,372		
	Embout pipette 5mL	0,099	6	0,5916		
	Embout pipette 10µL	0,0485	2	0,097		
	Embout pipette 200µL	0,0292	2	0,0583		
	Embout pipette 1mL	0,0292	2	0,0583		
	Seringue Injeckt	0,124			1	0,124
	Aiguille Stérican	0,165			4	0,66
	Gant	0,039	10	0,39	10	0,39
	Répartition	Flacon de 15mL	4,034	4	16,136	2
Filtre GV		1,94	1	1,936	1	1,936
Seringue 3mL		0,351			1	0,351
Seringue 10mL		0,162	2	0,324		
NaCl 0,9%		0,72	1	0,72	1	0,72
Seringue 3mL		0,351	1	0,351		
Autres	Papier pH			0		0
	Module			0		
	Cartouche Endosafe	51,6	1	51,6	1	51,6
	Générateur de ⁶⁸ Ga			0		0
Coût total pour une synthèse (hors précurseur, €)				277,75		65,66

2. Temps d'une synthèse

Le temps d'une synthèse, de l'élution du ^{68}Ga jusqu'à la préparation de la seringue patient a été estimé à environ 20 minutes pour la synthèse par trousse et à 40 ± 5 minutes pour la synthèse par module.

IV. Discussion

Les médicaments radiopharmaceutiques utilisés dans un service de médecine nucléaire peuvent être des spécialités pharmaceutiques prêtes à l'emploi ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, $[^{123}\text{I}]\text{MIBG}$ par exemple) ou des préparations radiopharmaceutiques. Concernant les préparations radiopharmaceutiques, les radiopharmacies hospitalières nécessitent des protocoles de radiomarquage rapides, simples et reproductibles. La disponibilité de radio-isotopes et de trousse prêtes à l'emploi sont les conditions préalables pour une production de médicament radiopharmaceutique rapide et reproductible.

À ce jour, il n'existe qu'une seule trousse pour radiomarquage au ^{68}Ga ayant l'AMM en France (Édotrétotide ou Somatokit[®], un analogue des récepteurs de la somatostatine pour l'imagerie TEP de tumeurs neuroendocrines) ainsi que deux générateurs $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (Galliapharm[®] de la société Eckert & Ziegler et GalliAd[®] de la société IRE Elit). Le bénéfice clinique apporté par les ^{68}Ga -peptides comme le ^{68}Ga -Somakit sur le plan diagnostique est clair et doit se traduire sur la prise en charge des patients par une disponibilité accrue de ces derniers⁹⁰.

Concernant le cancer de la prostate, une trousse de PSMA-11⁹¹ a été développée et les résultats montrent une qualité des images TEP similaires avec un MRP produit en trousse ou par module. Une autre trousse de PSMA a été développée : la tris(hydroxypyridinone) (THP)-PSMA. L'avantage du THP est sa complexation rapide au $^{68}\text{Ga}^{3+}$ et ce à de faibles concentrations, à température ambiante et sur une gamme étendue de pH. Une élution directe d'un générateur $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ dans une trousse radiopharmaceutique lyophilisée est ainsi possible, en une seule étape⁹². Cette trousse radiomarkée au ^{68}Ga a été injectée à une cohorte de 8 patients montrant une captation tumorale pour 6 d'entre eux sans effets indésirables. Ces trousse participent activement à la diffusion de MRP innovants auprès des communautés médicales et des patients.

Depuis quelques années, le ciblage du GRP-R fait l'objet d'études cliniques récentes⁹³, témoignant de son intérêt grandissant pour l'imagerie de cancers de la prostate et de cancers du sein. Son intérêt serait d'autant plus important grâce à une disponibilité accrue des précurseurs sous forme d'une trousse.

Dans ce travail nous avons étudié et caractérisé une trousse de RM2 pour la production du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ en vue d'une utilisation en routine hospitalière. Le premier axe de notre travail a été de s'assurer de la stabilité de la trousse de RM2. Pour cela nous avons employé une méthodologie innovante utilisant la spectrométrie de masse couplée à une chromatographie liquide ainsi que l'HPLC-UV.

L'étude de la stabilité de la trousse dans un premier temps a été nécessaire pour déterminer une date de péremption. Les résultats obtenus lors de cette étude ont démontré une absence de dégradation du RM2 au bout de 1 an de conservation entre 0 et 8°C. Le RM2 contenu dans la trousse (PM = 1639Da) s'est avéré stable dans le temps et une impureté a été qualifiée par LC-MS (**Figure 28**), possiblement issue de la perte d'une fonction hydroxyle issue de l'un des trois acides carboxyliques du DOTA en position carboxy-terminale (Fragment de 1621Da, cf **Figure 36** ci-dessous). Cette impureté est retrouvée dès T0 et son taux est resté stable dans le temps. Cette impureté pourrait donc être un résidu de synthèse. Il s'agit de la première caractérisation d'une telle impureté. Des analyses complémentaires lors de la synthèse du RM2 sont nécessaires pour démontrer l'origine de cette impureté. Cependant, l'impact de cette impureté pourrait être mineur car le

macrocycle DOTA ne nécessite que deux de 3 acides carboxyliques pour complexer l'ion Ga^{3+} . De plus, le DOTA ne semble pas participer à la liaison du $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ au GRP-R, ainsi cette espèce de 1621Da pourrait quand même se lier au GRP-R. Par contre, dans le cas d'un radiomarquage au ^{177}Lu cette entité de 1621Da ne permettra pas de complexer l'ion Lu^{3+} car les 3 acides carboxyliques sont impliqués dans la coordination de ce cation métallique. Ainsi le rendement de marquage se retrouvera diminué d'une quantité égale au taux de présence de cette impureté (~5%) ce qui est négligeable avec des radioéléments à vie plus longues. Une étude de toxicité aiguë reste nécessaire pour démontrer son innocuité et la possibilité de l'injecter. L'étude par HPLC retrouve les mêmes résultats avec une stabilité du taux d'RM2 intact au cours du temps et l'absence d'impuretés retrouvées du fait d'une moindre sensibilité que la LC-MS (Figure 26).

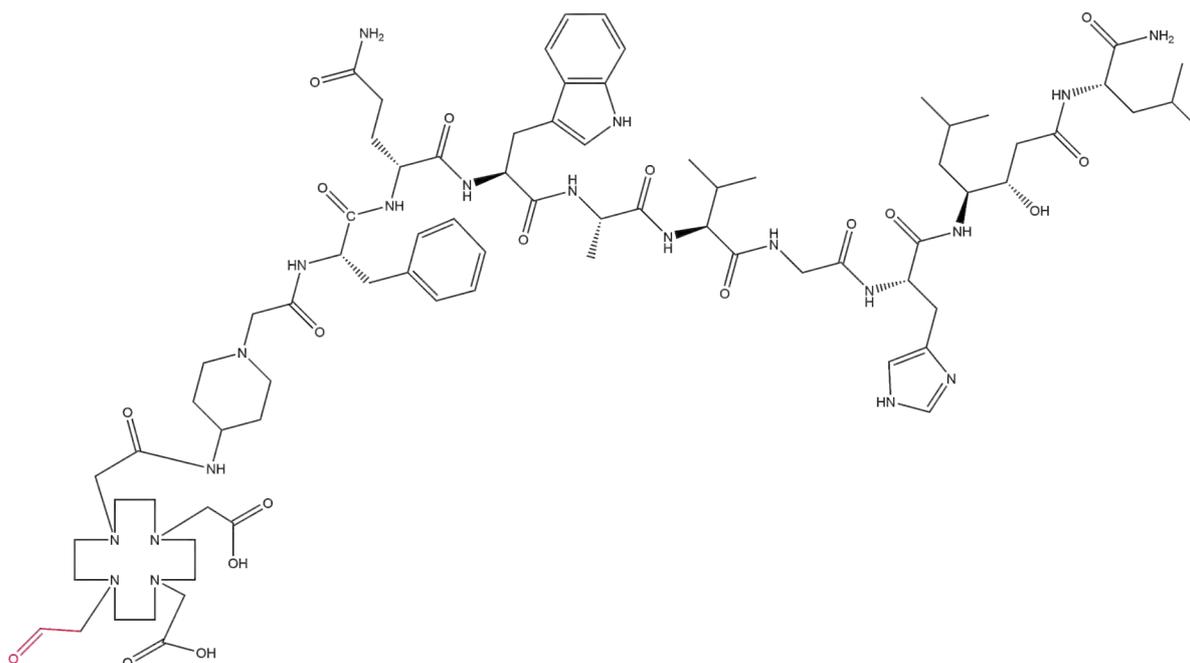


Figure 36 : Proposition de structure de l'impureté de 1621 Da détectée par LC-MS

Conscient que toutes les espèces détectées ne présentent pas la même efficacité d'ionisation et ne répondent pas exactement de la même manière en spectrométrie de masse, la quantification basée sur les données de spectrométrie de masse permet toutefois de dégager des tendances et notamment la prépondérance de l'espèce d'intérêt et de formes probablement oxydées du peptide.

Il a ensuite été nécessaire d'établir un protocole de radiomarquage remplissant les exigences de la pharmacopée européenne⁸⁸. Seul un radiopharmaceutique marqué au ^{68}Ga est autorisé en France, à ce jour : le $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga-édotréotide}$. C'est pourquoi nous avons choisi de répondre aux spécifications indiquées dans la monographie de la Ph. Eur. « *Gallium (^{68}Ga) Edotretotide injection solution* ». L'ensemble des spécifications exigées par la pharmacopée européenne⁸⁸ a donc pu être respecté une fois les conditions de radiomarquage optimisées.

L'éluion du ^{68}Ga à partir du générateur donne une solution très acide ($\text{pH} < 1$) dont il a fallu ajuster le pH entre 3 et 4⁹⁴ pour avoir un rendement de marquage du $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ maximal. Ceci est dû à la chimie du gallium qui est sous forme ionique Ga^{3+} à $\text{pH} < 3$ et lorsque le pH est supérieur à 4, induit l'apparition d'hydroxyde de gallium ($\text{Ga}(\text{OH})_3$) insoluble, qui diminue le rendement du radiomarquage. Ainsi, la complexation du Ga^{3+} avec

le macrocycle DOTA est optimale à pH 3-4⁹⁴. C'est pourquoi l'optimisation du tampon est une phase cruciale pour le radiomarquage au ⁶⁸Ga. Pour la réalisation du tampon de marquage, il est préférable d'utiliser le tampon acétate par rapport au tampon HEPES car il a été approuvé pour une utilisation humaine¹¹ et que l'utilisation du tampon HEPES nécessite une étape de purification supplémentaire. Une poudre d'acétate de sodium anhydre a donc été utilisée, solubilisée dans de l'acide chlorhydrique. Cet acide a dû être prélevé avec une seringue 2 pièces pour éviter le relargage de métaux (Zn,...) contenu dans le caoutchouc des septums des seringues 3 pièces, ce qui pourrait créer une compétition entre les impuretés métalliques et le ⁶⁸Ga pour la liaison au DOTA⁹⁵.

Les deux autres éléments étudiés pour optimiser le radiomarquage sont le volume réactionnel et le temps de chauffage de la trousse. La diminution du volume réactionnel ainsi que la mise sous agitation de la trousse permettent d'augmenter la probabilité de rencontre de la molécule vectrice avec le ⁶⁸Ga³⁺. Le chauffage est une étape obligatoire car cela déforme le cycle permettant ainsi la liaison du gallium au DOTA⁹⁶. Il a fallu trouver un compromis entre un temps de chauffage assez long pour permettre un rendement de marquage suffisant, mais assez court pour que la demi-vie du ⁶⁸Ga (67,7 minutes) n'empêche pas son utilisation en clinique ensuite. Après le temps de chauffage, un temps de retour à température ambiante a été mis en place pour permettre de terminer le radiomarquage avec l'énergie thermique résiduelle du flacon, avant la réalisation de la formulation. La formulation permet l'obtention d'un radiopharmaceutique compatible avec une injection à l'Homme et conforme aux exigences de la pharmacopée européenne⁸⁸. En outre, la stabilité du [⁶⁸Ga]Ga-RM2 dans le solvant de formulation a été étudiée sur 3h après le radiomarquage, confirmant la possibilité d'une utilisation en routine hospitalière, tout en permettant une flexibilité du service de médecine nucléaire en cas d'imprévu pour l'injection du patient.

En résumé, le radiomarquage avec le générateur IRE Elit de la trousse RM2 a été réalisé et validé selon les spécifications de la pharmacopée européenne⁸⁸, pour une future application clinique. Néanmoins, un écueil de ce travail est l'absence de validation de cette trousse avec le générateur Gallipharm qui aurait pu fournir un travail plus complet et facilement transposable dans les radiopharmacies quel que soit le générateur à disposition. Malheureusement nous ne disposons pas d'un tel générateur actuellement.

Une autre trousse destinée au radiomarquage du RM2 a été étudiée par l'équipe de Kusum Vats et al⁹⁴, avec l'utilisation de 3 générateurs ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga différents (iThemba Labs, Eckert&Ziegler, iTG), qui se sont avérés compatibles avec un radiomarquage en routine clinique avec un rendement >98% dans les 3 cas. La concentration de RM2 dans chacune des trousse était de 40µg (contre 50µg dans celle étudiée ici) et les conditions de radiomarquage étaient similaires à celles choisies ici avec un pH de 3 et un chauffage de 10min à 90°C (contre 100°C dans notre étude). La différence majeure avec notre étude sont les différents générateurs employés, dont deux n'ayant pas d'autorisation d'utilisation en clinique. Les résultats obtenus par Kusum Vats et al sont similaires aux nôtres d'un point de vue du rendement du marquage (98% vs 96% ici).

Avec l'avènement du ⁶⁸Ga, de plus en plus de molécule sont radiomarquées avec du ⁶⁸Ga. Habituellement, la première étape est une synthèse manuelle qui a pour défauts une exposition aux radiations pour le manipulateur et une potentielle variabilité de la qualité du produit obtenu. Afin d'éviter ces problèmes lors de l'utilisation en clinique, deux méthodes de radiomarquage sont possibles : soit le radiomarquage automatisé par module de synthèse, soit le radiomarquage manuel d'une trousse.

Il est donc intéressant de comparer le coût des deux méthodes afin de pouvoir proposer celle qui s'avère la plus économique et ainsi faciliter l'accès aux MRP au plus grand nombre de patients. En effet, moins un médicament est coûteux, plus il a de chances d'être disponible pour un grand nombre de patients, notamment au sein de petites structures.

Dans cette étude, nous avons pu comparer les différents critères qualité du radiopharmaceutique selon le mode de production (trousse vs module – [Tableau 8](#)). Dans les deux cas, la pureté radiochimique du produit obtenu est conforme aux exigences de la pharmacopée européenne⁸⁸, avec cependant une meilleure PRC dans le cas de marquage par module ($p < 0.0001$) en raison de la présence d'une étape supplémentaire de purification. Par ailleurs, la trousse induit nécessairement le radiomarquage d'une quantité pondérale de RM2 plus importante en raison de (i) une quantité plus importante de précurseur engagé dans la réaction de radiomarquage (40 μ g en module vs 50 μ g en trousse qui est la quantité pondérale maximale autorisée à l'injection chez l'Homme d'après la Pharm. Eur.) et (ii) d'un meilleur rendement de marquage obtenu en trousse ($p < 0,0001$). Ceci a comme conséquence l'obtention d'une activité spécifique plus faible ($p = 0,03$) en cas de marquage par trousse mais qui reste suffisamment élevée pour des perspectives d'imagerie moléculaire. Enfin, il n'y a pas de différence significative dans l'activité volumique finale obtenue par les deux méthodes mais il y a une forte tendance à l'obtention d'une meilleure activité volumique en trousse ($p = 0,0515$). La synthèse par trousse s'est avérée près de deux fois plus rapide que par module (20min vs 40min), ce qui est un avantage majeur devant la demi-vie courte du ⁶⁸Ga (67,7min), permettant ainsi d'obtenir une activité plus importante disponible à l'injection au patient. En considérant une élution de 1GBq, l'activité supplémentaire disponible grâce à ce gain de temps et de rendement est d'environ 300MBq ce qui permettrait d'injecter au moins deux patients supplémentaires. L'utilisation de trousse permet donc d'avoir une approche plus efficace des médicaments radiopharmaceutiques. Elle présente par ailleurs l'avantage de ne pas contenir d'éthanol dans sa formulation, contrairement au module. En effet, la synthèse par module comprend une étape de purification nécessitant l'utilisation d'éthanol pour récupérer le [⁶⁸Ga]Ga-RM2, ce qui requiert ensuite une dilution importante du produit obtenu (maximum 10% d'éthanol⁸⁸) afin de permettre son injection chez l'Homme.

Lors d'une synthèse par trousse, il faut prendre en compte le prix de la trousse mais également des équipements nécessaires à la synthèse et au contrôle qualité. Contrairement à la synthèse par trousse, le radiomarquage par module nécessite beaucoup plus de moyens matériels à savoir un laboratoire et une salle de contrôle qualité pleinement équipée, et cette méthode produit plus de déchets contaminés que la méthode par trousse¹³. Dans notre étude, la synthèse par trousse s'avère bien plus économique que celle par module avec un coût environ quatre fois moindre par synthèse (66€ vs 278€) et des équipements nécessaires également nettement moins onéreux (un module de synthèse coûtant environ 80 000€). Cependant, l'analyse budgétaire effectuée ici a été limitée à la radiopharmacie responsable de la synthèse et du contrôle du MRP. Elle n'a pas pris en compte l'impact potentiel sur le personnel du service de médecine nucléaire impliqué dans la réalisation et l'interprétation de l'examen. De plus, il manque dans notre analyse le coût de la trousse une fois qu'elle sera commercialisée ainsi que celui du précurseur du RM2 nécessaire à la synthèse par module.

Le développement des MRP marqués au ⁶⁸Ga encourage les radiopharmacies à s'équiper avec le matériel nécessaire (générateur ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga, enceinte blindée haute énergie...). Il serait intéressant de voir arriver davantage de trousse permettant la synthèse de MRP au ⁶⁸Ga sur le marché. Leur moindre coût (notamment par l'absence de nécessité

d'un module) et leur plus grande facilité d'emploi encouragerait les plus petits centres hospitaliers à faire l'acquisition d'un générateur $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ permettant ainsi l'accès à ces MRP à un plus grand nombre de patients en routine hospitalière. Ceci implique qu'une radiopharmacie employant des trousse devra disposer de l'équipement nécessaire à la préparation et au contrôle qualité conformément aux instructions du fournisseur. En cas d'utilisation de trousse ne disposant pas de l'AMM, il faudra s'assurer de la conformité à la Pharmacopée Européenne.

Le deuxième axe de notre travail a été l'étude in vitro du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ car la littérature à ce sujet est sommaire.

De façon surprenante, le $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ a été très peu étudié in vitro et injecté directement chez la souris et chez l'Homme⁹³. Les seules études in vitro détaillées de RM2 radiomarké portent sur du RM2 radiomarké à l'indium-111⁷⁷ et au lutétium-177⁷⁹. Nous avons donc souhaité étudier les propriétés radiopharmaceutiques in vitro du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ après production en trousse. Comme rapporté dans le **Tableau 11**, le $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ présente une meilleure affinité pour le GRP-R que le $[^{111}\text{In}]\text{In-RM2}$ ⁷⁷. Cette bonne affinité est nécessaire pour obtenir des images précises des processus tumoraux afin d'effectuer au mieux le diagnostic ainsi que d'évaluer le plus précisément l'efficacité de la thérapeutique mise en place. L'impact du radiométal sur l'affinité d'un peptide a déjà été mis en évidence par les travaux majeurs de Reubi⁹⁷ ainsi que par les travaux récents de notre équipe⁹⁸. En effet, nous démontrons une différence d'un facteur 10 entre l'affinité d'un long peptide de 36 acides aminés marqué à l' ^{111}In vs ^{nat}Tb (meilleure affinité avec l'indium).

Tableau 11 : Comparaison de l'étude du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ sur la lignée cellulaire PC3 aux études cellulaires du RM2 radiomarké dans la littérature

	$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$	$[^{111}\text{In}]\text{In-RM2}$ ⁷⁷	$[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-RM2}$ ⁷⁹
LogD_{7,4}	-2,54 ± 0,04	N/A	N/A
Affinité (nM)	0,25 ± 0,19	2,9 ± 0,4 (Kd)	N/A
Fixation membrane (%)	42,0 ± 5,1 (1h)	15,9 ± 0,9 (4h)	11,2 ± 0,8 (4h)
Internalisation (%)	18,5 ± 5,4 (1h)	3,7 ± 0,4 (4h)	4,5 ± 0,6 (4h)
Efflux (%)	70,8 ± 11,1 (45min)	N/A	N/A

Le caractère hydrophile de la molécule (LogD négatif) laisse supposer que le $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ ne passera pas la barrière hémato-encéphalique et sera éliminé majoritairement par voie rénale.

L'étude de l'internalisation médiée par le GRP-R et la fraction de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ liée au GRP-R membranaire montre des valeurs 2 à 3 fois plus importantes que celle des résultats rapportés dans la littérature avec l' $[^{111}\text{In}]\text{In-RM2}$ et le $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-RM2}$ ^{77,79,94}, ceci est certainement en lien avec la meilleure affinité constatée pour le $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$. Cependant, le ratio fraction liée à la membrane/fraction internalisée du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ est similaire à celui du $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-RM2}$ à 1h c'est-à-dire ~ 2 – 2,5 témoignant de la fiabilité et de la robustesse de nos méthodes et résultats.

Enfin, nous avons souhaité caractériser l'efflux du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-RM2}$ en raison de son internalisation d'environ 20%. Il est intéressant de noter, que dans la littérature nous ne trouvons aucune donnée à ce sujet concernant l' $[^{111}\text{In}]\text{In-RM2}$ et le $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-RM2}$. Ceci est dû au fait que le RM2 est un antagoniste dont l'internalisation est très faible. La

conservation du caractère antagoniste du RM2 après radiomarquage au ^{68}Ga n'a pas été démontrée, mais est probable en raison de sa faible internalisation malgré une bonne affinité pour le récepteur et de conservation du ratio fraction membranaire/fraction internalisée. Le caractère antagoniste nécessite d'être confirmé par des expériences de mobilisation du calcium intracellulaire qui n'aurait pas retrouvé d'augmentation du Ca^{2+} cytoplasmique. Dans notre étude nous avons pu estimer l'efflux à environ 78%. Cette valeur importante n'empêche toutefois pas l'obtention d'images de qualité en clinique (**Figure 20** et **Figure 21**) et est vraisemblablement maximaliste car ne prend pas en compte les mécanismes de redistribution du radiopharmaceutique après efflux.

En raison de la surexpression du GRP-R dans divers cancers tel que le cancer de la prostate et le cancer du sein, les indications du ciblage de ce récepteur sont vastes et pourrait apporter un potentiel bénéfique à de nombreux patients. Par ailleurs, le DOTA contenu dans le RM2 permet le radiomarquage non seulement au ^{68}Ga (à visée diagnostique), mais également au ^{177}Lu (à visée thérapeutique). Le traitement au ^{177}Lu -RM2 a d'ailleurs déjà été étudié chez quatre patients présentant un cancer de la prostate métastatique résistant à la castration, et a montré une bonne captation tumorale ainsi qu'une bonne tolérance clinique. Malgré une captation pancréatique importante, la clairance pancréatique rapide aboutit à des doses absorbées au niveau pancréatique acceptables, ne contre-indiquant pas son emploi en pratique clinique⁹⁹. Afin de faciliter l'accès à ce MRP prometteur, il faudrait que des troussees validées soient facilement disponibles.

V. Conclusion

La disponibilité de trousse est un élément indispensable pour faciliter l'accès aux MRP marqués au ^{68}Ga à un nombre plus important de patients. Nous avons pu démontrer ici une qualité équivalente du ^{68}Ga RM2 obtenu par trousse à celui synthétisé par module. L'emploi de la trousse s'avère par ailleurs plus avantageux sur le plan économique et plus simple d'emploi que la synthèse par module qui nécessite des équipements spécifiques coûteux et encombrants.

Pour développer encore plus l'imagerie moléculaire dans la prise en charge de pathologies cancéreuses, l'étude de nouvelles molécules et de nouvelles cibles (récepteurs) est indispensable. Notre équipe s'intéresse d'ailleurs à des analogues radiomarqués ciblant des récepteurs de la neurotensine et du neuropeptide Y surexprimés dans différents cancers et dont l'intérêt en imagerie et en radiothérapie interne vectorisée est important.

Références

1. SFMN. Livre Blanc de la Médecine Nucléaire. (2013).
2. Accueil - VIDAL eVIDAL. <https://evidal.vidal.fr/> (2020).
3. Reubi, J. C. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr. Rev.* **24**, 389–427 (2003).
4. Lewis, M. R. *et al.* Production and purification of gallium-66 for preparation of tumor-targeting radiopharmaceuticals. *Nucl. Med. Biol.* **29**, 701–706 (2002).
5. Gallium-68 : considérations pratiques pour le succès des applications cliniques au sein d'un service de médecine nucléaire. *Médecine Nucl.* **38**, 229–234 (2014).
6. Production of Long Lived Parent Radionuclides for Generators: 68Ge, 82Sr, 90Sr and 188W. <https://www.iaea.org/publications/8268/production-of-long-lived-parent-radionuclides-for-generators-68ge-82sr-90sr-and-188w> (2019).
7. Fani, M., André, J. P. & Maecke, H. R. 68Ga-PET: a powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals. *Contrast Media Mol. Imaging* **3**, 67–77 (2008).
8. Kumar, K. The Current Status of the Production and Supply of Gallium-68. *Cancer Biother. Radiopharm.* (2020) doi:10.1089/cbr.2019.3301.
9. Riga, S. *et al.* Production of Ga-68 with a General Electric PETtrace cyclotron by liquid target. *Phys. Medica PM Int. J. Devoted Appl. Phys. Med. Biol. Off. J. Ital. Assoc. Biomed. Phys. AIFB* **55**, 116–126 (2018).
10. Waterhouse, N. N., Amor-Coarasa, A., Nikolopoulou, A. & Babich, J. W. Otto: a 4.04 GBq (109 mCi) 68Ge/68Ga generator, first of its kind - extended quality control and performance evaluation in the clinical production of [68Ga]Ga-PSMA-11. *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **5**, 5 (2020).
11. Velikyan, I. 68Ga-Based radiopharmaceuticals: production and application relationship. *Mol. Basel Switz.* **20**, 12913–12943 (2015).

12. Nalin, L. *et al.* Positron emission tomography imaging of the glucagon-like peptide-1 receptor in healthy and streptozotocin-induced diabetic pigs. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **41**, 1800–1810 (2014).
13. Meisenheimer, M., Kürpig, S., Essler, M. & Eppard, E. Manual vs automated ⁶⁸Ga-radiolabelling-A comparison of optimized processes. *J. Label. Compd. Radiopharm.* (2019) doi:10.1002/jlcr.3821.
14. Decristoforo, C. *et al.* A fully automated synthesis for the preparation of ⁶⁸Ga-labelled peptides. *Nucl. Med. Commun.* **28**, 870–875 (2007).
15. Velikyan, I., Rosenstrom, U. & Eriksson, O. Fully automated GMP production of [⁶⁸Ga]Ga-DO3A-VS-Cys40-Exendin-4 for clinical use. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **7**, 111–125 (2017).
16. Bahri, Z., Rezai, B. & Kowsari, E. Selective separation of gallium from zinc using flotation: Effect of solution pH value and the separation mechanism. /paper/Selective-separation-of-gallium-from-zinc-using-of-Bahri-Rezai/f4aa3a500adfd5ab992628c1a9d762a5f4771075 (2016).
17. 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.* **110**, 2858–2902 (2010).
18. Giuliano, B., Dolmella, A., Tisato, F., Porchia, M. & Refosco, F. Mononuclear six-coordinated Ga(III) complexes: A comprehensive survey. *Coord. Chem. Rev.* **253**, 56–77 (2009).
19. Green, M. A. & Welch, M. J. Gallium radiopharmaceutical chemistry. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B* **16**, 435–448 (1989).
20. Bartholomä, M. D., Louie, A. S., Valliant, J. F. & Zubieta, J. Technetium and gallium derived radiopharmaceuticals: comparing and contrasting the chemistry of two important radiometals for the molecular imaging era. *Chem. Rev.* **110**, 2903–2920 (2010).

21. Berry, D. J. *et al.* Efficient bifunctional gallium-68 chelators for positron emission tomography: tris(hydroxypyridinone) ligands. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **47**, 7068–7070 (2011).
22. Decristoforo, C., Pickett, R. D. & Verbruggen, A. Feasibility and availability of ⁶⁸Ga-labelled peptides. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **39 Suppl 1**, S31-40 (2012).
23. Harris, W. R. & Pecoraro, V. L. Thermodynamic binding constants for gallium transferrin. *Biochemistry* **22**, 292–299 (1983).
24. Morgat, C., Hindié, E., Mishra, A. K., Allard, M. & Fernandez, P. Gallium-68: chemistry and radiolabeled peptides exploring different oncogenic pathways. *Cancer Biother. Radiopharm.* **28**, 85–97 (2013).
25. Heppeler, A. *et al.* Radiometal-Labelled Macrocyclic Chelator-Derivatised Somatostatin Analogue with Superb Tumour-Targeting Properties and Potential for Receptor-Mediated Internal Radiotherapy. *Chem. – Eur. J.* **5**, 1974–1981 (1999).
26. Šimeček, J. *et al.* Complexation of metal ions with TRAP (1,4,7-triazacyclononane phosphinic acid) ligands and 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid: phosphinate-containing ligands as unique chelators for trivalent gallium. *Inorg. Chem.* **51**, 577–590 (2012).
27. Eplatténier, F. L., Murase, I. & Martell, A. E. New Multidentate Ligands. VI. Chelating Tendencies of N,N'-Di(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-diacetic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 837–843 (1967).
28. Eder, M. *et al.* ScVEGF-PEG-HBED-CC and scVEGF-PEG-NOTA conjugates: comparison of easy-to-label recombinant proteins for [68Ga]PET imaging of VEGF receptors in angiogenic vasculature. *Nucl. Med. Biol.* **37**, 405–412 (2010).
29. Pan, D. *et al.* A new (68)Ga-labeled BBN peptide with a hydrophilic linker for GRPR-targeted tumor imaging. *Amino Acids* **46**, 1481–1489 (2014).

30. Amouroux, G. *et al.* Imaging Bradykinin B1 Receptor with ⁶⁸Ga-Labeled [des-Arg¹⁰]Kallidin Derivatives: Effect of the Linker on Biodistribution and Tumor Uptake. *Mol. Pharm.* **12**, 2879–2888 (2015).
31. Kraeber-Bodéré, F. *et al.* A pretargeting system for tumor PET imaging and radioimmunotherapy. *Front. Pharmacol.* **6**, 54 (2015).
32. Yao, J.-F., Yang, H., Zhao, Y.-Z. & Xue, M. Metabolism of Peptide Drugs and Strategies to Improve their Metabolic Stability. *Curr. Drug Metab.* **19**, 892–901 (2018).
33. Velikyan, I. Prospective of ⁶⁸Ga-Radiopharmaceutical Development. *Theranostics* **4**, 47–80 (2013).
34. Reubi, J. C. Old and new peptide receptor targets in cancer: future directions. *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer* **194**, 567–576 (2013).
35. Mach, R. H. Small Molecule Receptor Ligands for PET Studies of the Central Nervous System-Focus on G Protein Coupled Receptors. *Semin. Nucl. Med.* **47**, 524–535 (2017).
36. Anastasi, A., Erspamer, V. & Bucci, M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians Bombina and Alytes. *Experientia* **27**, 166–167 (1971).
37. McDonald, T. J. *et al.* Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**, 227–233 (1979).
38. Minamino, N., Kangawa, K. & Matsuo, H. Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **114**, 541–548 (1983).
39. Nagalla, S. R. *et al.* Cloning of a receptor for amphibian [Phe¹³]bombesin distinct from the receptor for gastrin-releasing peptide: identification of a fourth bombesin receptor subtype (BB4). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 6205–6209 (1995).
40. Kroog, G. S., Jensen, R. T. & Battey, J. F. Mammalian bombesin receptors. *Med. Res. Rev.* **15**, 389–417 (1995).

41. Jensen, R. T., Battey, J. F., Spindel, E. R. & Benya, R. V. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol. Rev.* **60**, 1–42 (2008).
42. Markwalder, R. & Reubi, J. C. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. *Cancer Res.* **59**, 1152–1159 (1999).
43. Albrecht, M. *et al.* Proliferation of prostate cancer cells and activity of neutral endopeptidase is regulated by bombesin and IL-1beta with IL-1beta acting as a modulator of cellular differentiation. *The Prostate* **58**, 82–94 (2004).
44. Aprikian, A. G., Tremblay, L., Han, K. & Chevalier, S. Bombesin stimulates the motility of human prostate-carcinoma cells through tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and of integrin-associated proteins. *Int. J. Cancer* **72**, 498–504 (1997).
45. Bologna, M., Festuccia, C., Muzi, P., Biordi, L. & Ciomei, M. Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer* **63**, 1714–1720 (1989).
46. Festuccia, C. *et al.* Bombesin-dependent pro-MMP-9 activation in prostatic cancer cells requires beta1 integrin engagement. *Exp. Cell Res.* **280**, 1–11 (2002).
47. Beer, M. *et al.* Profiling gastrin-releasing peptide receptor in prostate tissues: clinical implications and molecular correlates. *The Prostate* **72**, 318–325 (2012).
48. Körner, M., Waser, B., Rehmann, R. & Reubi, J. C. Early over-expression of GRP receptors in prostatic carcinogenesis. *The Prostate* **74**, 217–224 (2014).
49. Gugger, M. & Reubi, J. C. Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. *Am. J. Pathol.* **155**, 2067–2076 (1999).
50. Reubi, J. C., Wenger, S., Schmuckli-Maurer, J., Schaer, J.-C. & Gugger, M. Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand (125)I-[D-TYR(6), beta-ALA(11), PHE(13), NLE(14)] bombesin(6-14). *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **8**, 1139–1146 (2002).

51. Morgat, C. *et al.* Expression of Gastrin-Releasing Peptide Receptor (GRPR) in Breast Cancer and its Association with Pathological, Biological and Clinical Parameters: A Study of 1432 Primary Tumors. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* (2017) doi:10.2967/jnumed.116.188011.
52. Stoykow, C. *et al.* Gastrin-releasing Peptide Receptor Imaging in Breast Cancer Using the Receptor Antagonist (68)Ga-RM2 And PET. *Theranostics* **6**, 1641–1650 (2016).
53. Sun, B., Schally, A. V. & Halmos, G. The presence of receptors for bombesin/GRP and mRNA for three receptor subtypes in human ovarian epithelial cancers. *Regul. Pept.* **90**, 77–84 (2000).
54. Cornelio, D. B., Meurer, L., Schwartzmann, G. & Roesler, R. The gastrin-releasing peptide receptor as a marker of dysplastic alterations in cervical epithelial cells. *Oncology* **82**, 90–97 (2012).
55. Moody, T. W., Pert, C. B., Gazdar, A. F., Carney, D. N. & Minna, J. D. High levels of intracellular bombesin characterize human small-cell lung carcinoma. *Science* **214**, 1246–1248 (1981).
56. Moody, T. W. *et al.* GRP receptors are present in non small cell lung cancer cells. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **24**, 247–256 (1996).
57. Laukkanen, M. O., Gutkind, J. S. & Castellone, M. D. Sonic Hedgehog in SCLC. *Aging* **7**, 605–606 (2015).
58. Radulovic, S., Miller, G. & Schally, A. V. Inhibition of growth of HT-29 human colon cancer xenografts in nude mice by treatment with bombesin/gastrin releasing peptide antagonist (RC-3095). *Cancer Res.* **51**, 6006–6009 (1991).
59. Frucht, H., Gazdar, A. F., Park, J. A., Oie, H. & Jensen, R. T. Characterization of functional receptors for gastrointestinal hormones on human colon cancer cells. *Cancer Res.* **52**, 1114–1122 (1992).

60. Carroll, R. E., Ostrovskiy, D., Lee, S., Danilkovich, A. & Benya, R. V. Characterization of Gastrin-Releasing Peptide and Its Receptor Aberrantly Expressed by Human Colon Cancer Cell Lines. *Mol. Pharmacol.* **58**, 601–607 (2000).
61. Carroll, R. E., Matkowskyj, K. A., Chakrabarti, S., McDonald, T. J. & Benya, R. V. Aberrant expression of gastrin-releasing peptide and its receptor by well-differentiated colon cancers in humans. *Am. J. Physiol.* **276**, G655-665 (1999).
62. Ferris, H. A., Carroll, R. E., Lorimer, D. L. & Benya, R. V. Location and characterization of the human GRP receptor expressed by gastrointestinal epithelial cells. *Peptides* **18**, 663–672 (1997).
63. Zhang, H. *et al.* DOTA-PESIN, a DOTA-conjugated bombesin derivative designed for the imaging and targeted radionuclide treatment of bombesin receptor-positive tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **34**, 1198–1208 (2007).
64. Cagnolini, A. *et al.* Automated synthesis, characterization and biological evaluation of [(68)Ga]Ga-AMBA, and the synthesis and characterization of (nat)Ga-AMBA and [(67)Ga]Ga-AMBA. *Appl. Radiat. Isot. Data Instrum. Methods Use Agric. Ind. Med.* **68**, 2285–2292 (2010).
65. Dam, J. H., Olsen, B. B., Baun, C., Høilund-Carlsen, P.-F. & Thisgaard, H. In Vivo Evaluation of a Bombesin Analogue Labeled with Ga-68 and Co-55/57. *Mol. Imaging Biol.* **18**, 368–376 (2016).
66. Schroeder, R. P. J., van Weerden, W. M., Bangma, C., Krenning, E. P. & de Jong, M. Peptide receptor imaging of prostate cancer with radiolabelled bombesin analogues. *Methods San Diego Calif* **48**, 200–204 (2009).
67. Bodei, L., Ferrari, M. & Nunn, A. D. 177Lu-AMBA bombesin analogue in hormone refractory prostate cancer patients: a phase I escalation study with single-cycle administrations. (2007).
68. Baum, R. *et al.* Molecular imaging of bombesin receptors in various tumors by Ga-68 AMBA PET/CT: First results. *J. Nucl. Med.* **48**, 79P-79P (2007).

69. Sonni, I., Baratto, L. & Iagaru, A. Imaging of Prostate Cancer Using Gallium-68-Labeled Bombesin. *PET Clin.* **12**, 159–171 (2017).
70. Cescato, R. *et al.* Bombesin receptor antagonists may be preferable to agonists for tumor targeting. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **49**, 318–326 (2008).
71. Nock, B. A. *et al.* Theranostic Perspectives in Prostate Cancer with the Gastrin-Releasing Peptide Receptor Antagonist NeoBOMB1: Preclinical and First Clinical Results. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **58**, 75–80 (2017).
72. Dalm, S. U. *et al.* ⁶⁸Ga/¹⁷⁷Lu-NeoBOMB1, a Novel Radiolabeled GRPR Antagonist for Theranostic Use in Oncology. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **58**, 293–299 (2017).
73. Varasteh, Z. *et al.* In vitro and in vivo evaluation of a (¹⁸F)-labeled high affinity NOTA conjugated bombesin antagonist as a PET ligand for GRPR-targeted tumor imaging. *PLoS One* **8**, e81932 (2013).
74. Varasteh, Z. *et al.* The effect of mini-PEG-based spacer length on binding and pharmacokinetic properties of a ⁶⁸Ga-labeled NOTA-conjugated antagonistic analog of bombesin. *Mol. Basel Switz.* **19**, 10455–10472 (2014).
75. Zang, J. *et al.* ⁶⁸Ga-NOTA-RM26 PET/CT in the Evaluation of Breast Cancer: A Pilot Prospective Study. *Clin. Nucl. Med.* **43**, 663–669 (2018).
76. Tokita, K. *et al.* Molecular basis for selectivity of high affinity peptide antagonists for the gastrin-releasing peptide receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 36652–36663 (2001).
77. Mansi, R. *et al.* Development of a potent DOTA-conjugated bombesin antagonist for targeting GRPr-positive tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **38**, 97–107 (2011).
78. Mansi, R. *et al.* Evaluation of three different families of bombesin receptor radioantagonists for targeted imaging and therapy of gastrin releasing peptide receptor (GRP-R) positive tumors. *J. Med. Chem.* **58**, 682–691 (2015).
79. Popp, I. *et al.* Approaches to improve metabolic stability of a statine-based GRP receptor antagonist. *Nucl. Med. Biol.* **45**, 22–29 (2017).

80. Dumont, R. A. *et al.* Targeted radiotherapy of prostate cancer with a gastrin-releasing peptide receptor antagonist is effective as monotherapy and in combination with rapamycin. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **54**, 762–769 (2013).
81. Roivainen, A. *et al.* Plasma Pharmacokinetics, Whole-Body Distribution, Metabolism, and Radiation Dosimetry of ^{68}Ga Bombesin Antagonist BAY 86-7548 in Healthy Men. *J. Nucl. Med.* **54**, 867–872 (2013).
82. Kähkönen, E. *et al.* In vivo imaging of prostate cancer using [^{68}Ga]-labeled bombesin analog BAY86-7548. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **19**, 5434–5443 (2013).
83. Touijer, K. A. *et al.* Prospective Study of the Radiolabeled GRPR Antagonist BAY86-7548 for Positron Emission Tomography/Computed Tomography Imaging of Newly Diagnosed Prostate Cancer. *Eur. Urol. Oncol.* **2**, 166–173 (2019).
84. Minamimoto, R. *et al.* Pilot Comparison of ^{68}Ga -RM2 PET and ^{68}Ga -PSMA-11 PET in Patients with Biochemically Recurrent Prostate Cancer. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **57**, 557–562 (2016).
85. Iagaru, A. Will GRPR Compete with PSMA as a Target in Prostate Cancer? *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **58**, 1883–1884 (2017).
86. Schollhammer, R. *et al.* ^{68}Ga -PSMA-617 Compared With ^{68}Ga -RM2 and ^{18}F -FCholine PET/CT for the Initial Staging of High-Risk Prostate Cancer. *Clin. Nucl. Med.* **44**, e535–e536 (2019).
87. Varasteh, Z. *et al.* Synthesis and characterization of a high-affinity NOTA-conjugated bombesin antagonist for GRPR-targeted tumor imaging. *Bioconjug. Chem.* **24**, 1144–1153 (2013).
88. Pharmacopée Européenne en ligne. <http://online.pheur.org/FR/entry.htm>.
89. Lantry, L. E. *et al.* ^{177}Lu -AMBA: Synthesis and characterization of a selective ^{177}Lu -labeled GRP-R agonist for systemic radiotherapy of prostate cancer. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **47**, 1144–1152 (2006).

90. Rufini, V., Calcagni, M. L. & Baum, R. P. Imaging of neuroendocrine tumors. *Semin. Nucl. Med.* **36**, 228–247 (2006).
91. Calderoni, L. *et al.* Automated synthesis module and sterile cold kit for ⁶⁸Ga-PSMA-11 do not show differences in PET/CT image quality. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* (2019) doi:10.2967/jnumed.119.231605.
92. Hofman, M. S. *et al.* Cold Kit for Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) PET Imaging: Phase 1 Study of ⁶⁸Ga-Tris(Hydroxypyridinone)-PSMA PET/CT in Patients with Prostate Cancer. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **59**, 625–631 (2018).
93. Minamimoto, R. *et al.* Prospective Evaluation of ⁶⁸Ga-RM2 PET/MRI in Patients with Biochemical Recurrence of Prostate Cancer and Negative Findings on Conventional Imaging. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **59**, 803–808 (2018).
94. Vats, K., Sharma, R., Kameswaran, M., Satpati, D. & Dash, A. Single vial cold kits optimized for preparation of gastrin releasing peptide receptor (GRPR)-radioantagonist ⁶⁸Ga-RM2 using three different ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generators. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **163**, 39–44 (2019).
95. Breeman, W. A. P. *et al.* (⁶⁸Ga)-labeled DOTA-peptides and (⁶⁸Ga)-labeled radiopharmaceuticals for positron emission tomography: current status of research, clinical applications, and future perspectives. *Semin. Nucl. Med.* **41**, 314–321 (2011).
96. Heppeler, A. *et al.* Radiometal-Labelled Macrocyclic Chelator-Derivatised Somatostatin Analogue with Superb Tumour-Targeting Properties and Potential for Receptor-Mediated Internal Radiotherapy. *Chem. – Eur. J.* **5**, 1974–1981 (1999).
97. Reubi, J. C. *et al.* Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. *Eur. J. Nucl. Med.* **27**, 273–282 (2000).
98. Chastel, A. *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of a multifunctional neuropeptide-Y conjugate for selective nuclear delivery of radiolanthanides. *EJNMMI Res.* **10**, 16 (2020).

99. Kurth, J. *et al.* First-in-human dosimetry of gastrin-releasing peptide receptor antagonist [177Lu]Lu-RM2: a radiopharmaceutical for the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **47**, 123–135 (2020).

TITRE : Mise au point du radiomarquage au gallium-68 et validation d'une trousse pour le ciblage du récepteur du Gastrin-Releasing Peptide (GRP-R)

RESUME : Les médicaments radiopharmaceutiques sont en plein développement pour l'imagerie et la thérapie de cancers. Dans ce travail de Thèse, nous avons étudié le radiomarquage au ^{68}Ga d'une trousse au RM2, un antagoniste du récepteur du gastrin-releasing peptide (GRP-R) connu pour être surexprimé dans plusieurs cancers. Les conditions radiomarquage ont été optimisées pour être conforme à la pharmacopée européenne, puis les coûts de l'emploi de cette technique en routine clinique comparée à un marquage par module ont été évalués. Enfin, le [^{68}Ga]Ga-RM2 a été caractérisé sur la lignée cellulaire PC-3 connue pour fortement exprimer le GRP-R.

MOTS-CLÉS : Gastrin Releasing Peptide Receptor, GRP-R, RM2, Oncologie, Radiopharmaceutique, Gallium-68, Trousse, Module

TITLE : Development of gallium-68 radiolabelling and validation of a kit for targeting the Gastrin-Releasing Peptide receptor (GRP-R)

ABSTRACT : Radiopharmaceuticals are in full development for imaging and cancer therapy. In this thesis work, we studied ^{68}Ga radiolabelling of an RM2 kit, an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor (GRP-R), known to be overexpressed in several cancers. The radiolabelling conditions were optimized to comply with the European Pharmacopoeia, then the costs of using this technique in clinical routine compared to labeling by module were evaluated. Finally, [^{68}Ga] Ga-RM2 was characterized on the PC-3 cell line, known to strongly express GRP-R.

KEY WORDS : Gastrin Releasing Peptide Receptor, GRP-R, RM2, Oncology, Radiopharmaceuticals, Gallium-68, Kit, Module

DISCIPLINE administrative : Pharmacie hospitalière

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

CNRS - INCIA UMR 5287 - Université de Bordeaux

146 Rue Léo Saignat 33076 Bordeaux

Directeur de thèse : Dr MORGAT Clément